



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ENDOMETRİAL KANSERLERDE METASTAZ
GELİŞİMİNDE OSTEOPONTİNİN ROLÜ VE
EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞTE SİNYAL
YOLAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. EVRİM KARDELEN

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi TOLGA ATAKUL

AYDIN-2020

T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ENDOMETRİAL KANSERLERDE METASTAZ
GELİŞİMİNDE OSTEOPONTİNİN ROLÜ VE
EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞTE SİNYAL
YOLAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. EVRİM KARDELEN

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi TOLGA ATAKUL

AYDIN-2020

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF- 18055 Numaralı proje olarak desteklenmiştir

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca gösterdiği destek ve yardımlarının yanı sıra bilgi ve deneyimleriyle farklı bir bakış açısı kazandıran, sezaryen ve myomektomiği öğreten değerli hocam Prof. Dr. Arif Aktuğ Ertekin'e,

Hasta etiği konusunda ve cerrahi eğitimde ilham olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Samet Kafkas'a,

Histerektomiği öğreten, her konuda rehber olan sayın jinekolojik onkolog hocam Prof. Dr. Hasan Yüksel'e,

Eğitim hayatıma katkısının yanı sıra her başvurduğumda yol gösteren perinatoloji hocam Prof. Dr. Hamit Alper Tanrıverdi'ye,

Tüm asistanlığım boyunca her daim yanımda olduğunu hissettiren ve ilk düğümlerimi atmaya öğreten çok değerli hocam Prof. Dr. Selda Demircan Sezer'e,

Vaginal histerektomiği ve ürojinekolojik cerrahiği öğreten çok kıymetli hocam Doç. Dr. Sümeyra Nergiz Avcıoğlu'na,

Ultrasonun incelikleri ve amniosentez konusunda bilgi ve tecrübelerini aktaran hocam Doç. Dr. Emre Zafer'e

Bir gün tekrar aramıza döneceğine olan inancımı hiç yitirmediğim, çok değerli hocam Doç. Dr. Sündüz Özlem Altinkaya'ya,

Asistanlık eğitimime katkısı olan vakalara yaklaşımıyla örnek aldığım hocam Dr. Öğr. Üyesi Özgür Deniz Turan'a,

Genel cerrahi rotasyonumda cerrahi batın anatomisi öğreten çok kıymetli hocam Prof. Dr. Pars Tunçyürek'e,

Tezimde çok büyük katkısı olan, yanımda varlığını hep hissettiğim tez sürecinde elimi hiç bırakmayan sayın hocam Prof. Dr. Çiğdem Yenisey'e

Yine tezime olan katkılarından dolayı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mehmet Babür Kaleli'ye,

Asistanlık sürecimin her döneminde beni yönlendiren, laparoskopi ve ürojinekolojik cerrahiyi öğreten, her daim karakteri ve duruşu ile örnek aldığım ve tez sürecimde bana katkı sağlayan, kıymetli önerilerini sunan tez danışmanım, sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Tolga Atakul'a,

Eğitimime katkısı olan diğer tüm hocalarıma,
Çok sevgili sorumlu hemşiremiz, ablam Vesile Ünay'a

Ve birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan, hemşire, ebe, sekreter ve personel arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitimim boyunca moral ve motivasyonumu yükselten 20 senelik çok değerli dostum, kardeşim Fuat Unat'a, çok sevdiğim arkadaşlarım, benim kıymetlilerim Nesrin Karabulut'a ve Melek Aras'a, arkadaşım ve hemşirem Anıl Turan'a, personelimiz, abim Hüseyin Aslan'a, kardeşim Dr. Sabri Anıl As'a,

Hayatımın her anında en büyük destekçilerim, ders çalışırken, tez yazarken yanımda olan, asistanlığın zorlu süreçlerinde hep güç veren canım kız kardeşim Elvin Kardelen'e, annem Handan Kardelen'e, babam Eşber Kardelen'e,

Tüm kalbimle teşekkür ederim...

Saygı ve Sevgilerimle.

Dr. Evrim Kardelen

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLO DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
GRAFİK DİZİNİ.....	vii
RESİM DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Endometrium Kanserlerinde Tanı Süreci.....	3
2.2. Normal Hücre Gelişimi ve Kanser Oluşumunda Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm.....	3
2.3. Osteopontin Molekülü ve Sinyal Yolakları.....	7
2.4.Kanserin İlerlemesinde Osteopontinin Rolü.....	11
2.5.Tümörlerin İlaç Tedavisine Dirençli Olmasında OPN'nin Rolü Nedir?.....	13
2.6.Terapötik Hedef Olarak Osteopontin.....	14
2.7. ERK1/2 (Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2) Sinyal Yolağı.....	16
2.8. PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) Sinyal Yolağı.....	16
2.9. Anjiyogenez Nedir ve Tümör Oluşumu için Neden Gereklidir?.....	17
2.10. Anjiyogenez Önlenmesinin Kanser Tedavisindeki Önemi.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Gereçler.....	20
3.1.1. Kullanılan Malzemeler.....	20
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	21
3.2. Yöntemler.....	21

3.2.1. HUVEC(Human Umbilical Vein Endothelial Cell) Hücre Hatlarının Temini ve Hücre Ekimi	21
3.2.2. Ishikawa (ISH, Endometrial Kanser) Hücre Hatlarının Temini ve Hücre Ekimi..	23
3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi	24
3.2.4. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü.....	24
3.2.5. Tümör Hücreleri Ortam Medyumlarının Elde Edilmesi	25
3.2.6. MTT Deneyi ile Hücre Proliferasyonunun Saptanması.....	25
3.2.7. Migrasyon (İnvazyon) Deneyi	29
3.2.8. <i>İn vitro</i> anjyogenez (<i>In vitro</i> Tube Assay) Deneyi	32
3.2.9. Tümör Hücreleri Ortam Medyumunda PI3K ve ERK1/2 Moleküllerinin Saptanması.....	35
3.2.10. İstatistiksel Yöntemler.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Hücre Proliferasyonu Sonuçları	38
4.2. Migrasyon (İnvazyon) Sonuçları	42
4.3. <i>İn Vitro</i> Tüp Oluşumu (Anjiyogenez) Sonuçları	45
4.4. PI3K ve ERK1/2 sinyal moleküllerinin ELISA testi sonuçları.....	46
5. TARTIŞMA	52
6. ÖNERİLER.....	56
ÖZET	57
ABSTRACT.....	59
KAYNAKLAR	60

TABLO DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo I. ISH hücresi + OPN proliferasyon sonuçları.....	39
Tablo II. HUVEC + OPN proliferasyon sonuçları	41
Tablo III. ISH hücresi ortam medyumunda sinyal moleküllerinin değerlendirilmesi	47
Tablo IV. HUVEC ortam medyumunda sinyal moleküllerinin değerlendirilmesi	49

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 1. EMT süresince tümör hücrelerinin dönüşümü.....	6
Şekil 2. OPN'nin mekanizmasına genel bir bakış.....	9
Şekil 3. Tümörün ilerlemesinde OPN sinyal yolağı.....	10
Şekil 4. Kanser hücrelerinin metastazında OPN'nin rolü.....	13
Şekil 5. <i>İn vitro</i> anjiyogenez.....	19
Şekil 6. Migrasyon deneyinin şematik olarak gösterilmesi.....	30
Şekil 7. <i>İn vitro</i> tüpe benzer yapıların oluşturulduğu deney düzeneği.....	34

GRAFİK DİZİNİ

Grafik1. ISH hücrelerinde OPN'nin etkisinin grafiksel gösterilişi.....	40
Grafik 2. HUVEC hücrelerinde OPN'nin etkisinin grafiksel gösterilişi	42
Grafik 3. ISH hücresi ortam medyumlarında PI3K düzeylerinin grafiksel gösterilişi.....	48
Grafik 4. ISH hücresi ortam medyumlarında ERK1/2 düzeylerinin grafiksel gösterilişi.....	49
Grafik 5. HUVEC ortam medyumlarında PI3K düzeylerinin grafiksel gösterilişi.....	51
Grafik 6. HUVEC ortam medyumlarında ERK1/2 düzeylerinin grafiksel gösterilişi.....	51

RESİM DİZİNİ

Resim 1. HUVEC hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü (1. Pasaj)	22
Resim 2. ISH hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü.	23
Resim 3. Otomatik hücre sayım cihazı ve Thoma lamı.....	25
Resim 4. MTT hücre canlılığı deneyinin şematik olarak gösterilmesi.	26
Resim 5. ISH hücrelerinin plağa ekilmiş hali.	27
Resim 6. MTT çözeltisinin oluşturduğu formazan.	27
Resim 7. HUVEC hücrelerinin plağa ekilmiş hali.....	28
Resim 8. Formazan oluşumunun invert mikroskoptaki görüntüsü.	28
Resim 9. Hücre kültüründe kullanılan mikroplak okuyucu.	28
Resim 10. Migrasyon deneyi (A) çizgi yöntemi; (B) insert kullanılmış.....	29
Resim 11. Migrasyon deneyi plağı.	30
Resim 12. Kuyucuklara insertlerin yerleştirilmiş hali.	31
Resim 13. Migrasyon deney düzeneği ve insertlerin boyanmış hali.	31
Resim 14. Migrasyon deneyinde kullanılan insert.....	31
Resim 15. Ticari olarak satılan bazal membran ekstraktı (Matrigel).....	33
Resim 16. ELISA’da kullanılan enkübatör ve mikroplak okuyucu.....	35
Resim 17. PI3K molekülünün ELISA deneyi resimleri.....	36
Resim 18. ERK1/2 molekülünün ELISA deneyi resimleri.....	37
Resim 19. ISH hücrelerinin OPN etkisi ile proliferasyonunun gösterilmesi.	38
Resim 20. HUVEC hücrelerinin OPN etkisi ile proliferasyonunun gösterilmesi.....	40
Resim 21. Ishikawa (kontrol) hücrelerinin migrasyonu.	42
Resim 22. Ishikawa hücrelerinin migrasyonuna OPN (400 ng/ML) etkisi.	43
Resim 23. HUVEC hücrelerinin migrasyonuna OPN (400 ng/mL) etkisi.....	44
Resim 24. İnsert kullanılarak yapılan HUVEC migrasyon deneyi.	44
Resim 25. HUVEC (kontrol); OPN eklenmeden tüp yapılarının oluşması.	45
Resim 26. HUVEC hücrelerine 400 ng/mL OPN eklendikten sonra anjiyogenez.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARK.:	Arkadaşları
BİLTEM:	Bilim ve Teknoloji Merkezi
CM:	Control Medium
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EMT:	Epithelial Mesechymal Transition
FBS:	Fetal Bovine Serum
GM:	Growth Medyum
MET:	Mesechymal Epithelial Transition
MEM:	Minimum Essential Medium Eagle
MTT:	3-(4,5-Dimetiltiyazol2-Y1)-2,5-Difeniltetrazolyum-Bromür
NEAA:	Non Essential Amino Acids
PIK3	Phosphatidlyinositol 3-kinases
PTEN:	Phosphatase and Tensin homologue
ERK1/2:	Extracellular signal regulated kinases
MEK:	Mitogen activated protein kinase
SiRNA:	Small interfering RNA
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
HUVEC:	Human umbilical ven endothelial cell
MAPK:	Mitogen activated protein kinase
MMP:	Metalloproteinase
JNK1/2:	c-Jun-N-terminal kinase
SPSS:	Statistical Package for the Social

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometrial karsinom kadınların %2-3'ünü etkileyen genital sistemin en yaygın görülen malign hastalığıdır. Endometrial kanserlerde majör problem kanserin iyi yönetilmesi ve uzak organlara metastaz yapmasının önlenmesidir. Osteopontin (OPN) bir ekstrasellüler matriks (Extracellular Matrix, ECM) molekülü olup, hücre adhezyonu, anjiyogenez ve tümör metastazını da içeren birçok fizyolojik ve patolojik durumlarda yer almakta ve endometrial kanser de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin ilerlemesi ile ilişkilidir. OPN, endometrial kanserler de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde ilerlemesinde birçok fonksiyonu olduğu bildirilmiştir. OPN, embriyonun implantasyonu sırasında hücre adhezyon ve migrasyonun sürdürülmesi için endometriyumda hücre yüzeyinde integrin reseptörüne bağlandığı öne sürülmektedir. Yüksek oranda metastatik değişime uğramış hücreler tümör oluşturmeyen hücrelerle kıyaslandığında yüksek OPN düzeylerine sahiptir. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), embriyonik gelişimde kompleks bir süreç olup 1980'lerin başında embriyogenezdeki önemi farkedilmiştir. EMT tümörün migrasyonunda, invazyon sürecinde ve özellikle hücre invazyonunu ve kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinin artmasında önemli rolü vardır. Bu süreç sırasında, epitel hücreler karakteristiklerini kaybederek, ki bunlar hücre-hücre adhezyonunun kaybı, hücre hareketliliğinin artması ve yayılımı, apoptoza direnç ve hücre morfolojinin değişmesi ile mezenkimal özellikleri kazanırlar. EMT'nin metastaz oluşmasında ve tümör invazyonunda, hücrelerin kendi konumlarından ayrılarak ve kan ve lenfatik damarlar yoluyla göç ederek farklı organlara yayılmasında başı çektiği tanımlanmıştır. Söylenebilir ki, EMT tümör hücrelerini daha invaziv özellikler kazandırmaktadır. Sonuç olarak, OPN'nin hücre adhezyonu, hücre-hücre etkileşimi, invazyon ve deneysel sistemlerde tümör hücrelerinde koloni oluşturması, bu molekülün tümörlerde prognostik bir belirleyici olabileceğini ve metastazın kontrol edilmesinde tedaviye aracılık edebilecek potansiyel bir belirleyici olabileceğini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, rekombinant OPN'nin farklı iki sinyal yolak üzerinden İshikawa hücrelerindeki tümör oluşturucu etkilerini nasıl etkilediğini, hücrelerde farklı rhOPN konsantrasyonlarını denemek yoluyla hem tümör hücrelerinde hem de HUVEC (Human Umbilical Ven Endothelial Cell) insan göbek kordonu hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve yeni kan damarları oluşumu olan tüpe benzer yapıları *in vitro* olarak göstermek suretiyle saptayacağız. Ayrıca, her iki sinyal yolakta önemli

moleküller olan PI3K ve ERK1/2 moleküllerini hücre ortam medyumlarında saptamak yoluyla, sinyal moleküllerin ekspresyonlarını araştırılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ishikawa cell lines, osteopontin, PI3K, ERK1/2, endometrial kanser



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endometrium Kanselerinde Tanı Süreci

Endometrial kanseler en yaygın görülen jinekolojik malignitedir. Kadınlarda en yaygın görülen kanser tipleri olan meme, akciğer ve kolon kanselerinden sonra dördüncü en sık görülen kanser tipidir. Servikal kanserin erken tanısında çok etkili olan Pap smear testi, endometrial kanselerde bazen erken tanı sağlamaktadır, fakat çoğu vakalar bu test ile saptanamamaktadır (Braun ve ark., 2016). CA125 ve CA15.3 gibi serum tümör belirleyiciler, endometrium kanselerinde diagnostik ve prognostik belirleyiciler olarak kullanılsa da, çok değerli olamamaktadırlar. Hali hazırda, endometrial kanseleri taramada ve hastalığın nüksünün izlenmesinde kullanılabilen biyobelirleyiciler yoktur. Çeşitli klinikopatolojik parametreler adjuvan terapi ihtiyacını belirlemede ve bu hastalığın sonuçlarını saptamada kullanılabilir. Bunlar; cerrahi evre, histolojik tip, grade, miyometrial invazyonun derinliği, servikal stromal invazyon, lenfovasküler invazyon ve peritoneal sitolojiyi içermektedir. Diğer prognostik risk faktörleri; p53'ün (*kanser vakalarında mutasyonu en fazla olan gen*) ekspresyonunun artması, yüksek S-fazı (*hücre döngüsünde DNA sentezi fazı*) fraksiyonu, çekirdekte p16 (*tümör baskılayıcı protein*) ekspresyonunun azalması, progesteron reseptörünün ekspresyonu, PTEN (*Protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu tümör baskılayıcı gen*) tümör baskılayıcı genlerin azalmasıdır. Bununla birlikte, bu parametrelerin büyük çoğunluğu subjektif olup tartışılabilir. Halen, özellikle lokalize tümörü olan hastalarda, ek prognostik faktörlerin tanımlanması, hastalığın nüks etme ve ölüm riski olan hastaların belirlenmesi açısından çok önemlidir (Cho ve ark. 2009).

2.2. Normal Hücre Gelişimi ve Kanser Oluşumunda Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm

Kanser metastazı, kanser morbiditesi ve mortalitesinin ana nedenidir. Bu aşama, kanser ölümlerinin yaklaşık yüzde %90'ından sorumludur. EMT (Epitelial Mesechymal Transition) kanser hücrelerinin en büyük özelliğidir. EMT, epitelyal ve mezenkimal eksenler boyunca hücre durumlarındaki değişiklikleri yöneten ve epitel hücreleri üzerinde epitelyal-

mezenkimal esneklik kazandıran doğal bir karşı değişim mekanizmasıdır. Özellikle, epitel hücreleri yüksek düzeyde farklılaşmış, polarize ve organize hücrelerden farklılaşmamış, izole edilmiş göçen ve yayılma özellikleri olan mezenkimal benzeri hücrelere dönüştürülür. EMT, doğal olarak oluşan bir karşı farklılaşma programıdır. Normal adult hücreler terminal farklılaşmış hücreler olup pluripotent kök hücrelerin yeniden programlanması sonucudurlar. EMT doğal olarak meydana gelen transdiferansiyasyon programları arasında en önemli hücre biyolojisi programıdır. MET süreci mezenkimal hücreleri epitel hücrelerine dönüştürür. Veriler EMT'nin farklı hücre tiplerinin oluşumunda kullanılan hücrelerin dönüşümünü sağlamakta olduğu ve böylece karmaşık çok hücreli organizma ve organların oluşum organizasyonu meydana geldiğini öne sürmektedir (Sun ve ark. 2016).

Malign tümörlerin yaklaşık % 80'i akciğer, kolon, meme, pankreas, prostat, mesane, over, böbrek ve karaciğer tümörleri gibi yaygın kanserlere neden olan epitelyal dokulardan kaynaklanmaktadır. Erken evre tümörlerdeki tümör hücreleri sürekli bir hücre tabakası oluşturma kapasitesi ve hareketliliği olmayan epitelyal hücrelerinin ana biyolojik fenotipleri olarak kalır. Bu nitelikler, sıklıkla tümör ilerlemesi olarak adlandırılan kompleks sıralı bir sürecin ürünleri olan ilerlemiş kanser hücreleri ile keskin bir karşıtlık göstermektedir. Yüksek invaziv tümör hücreleri motilite ve invazyon gibi mezenkimal özellikler gösterir ve invazyon metastaz ile ilişkilidir. Bu malign özelliklerin kazanılması mekanizma düzeyinde tümörün ilerlemesi boyunca tümör hücrelerinde önceden uyku halinde olan EMT'nin aktive olması ile açıklanabilir. Meme kanserinde mezenkimal özelliklerin edinilmesi, tümörün ilerlemesi ve hastalığın agresif alt tipi ile pozitif ilişkilidir. Ksenograf tümör modellerinde işlev kazanımının ve kaybının büyük kısmının araştırılması, EMT'nin aktivasyonu ile bir tümörün malignite derecesi arasındaki bağlantıyı tanımlamak için doğrudan bir araçtır. Kanser ilerleme sürecinde EMT aktivasyonu pleiotropik fonksiyona sahip olup, çeşitli agresif kanser hücreleri ile ilişkili invaziv kanserler birçok rapor ile doğrulanmıştır. Birçok klinik patolojik yüksek dereceli kanserlerin oluşumunda EMT programının önemli olduğunu düşünmediği için bu programın birçok yaygın kanser türü ile ilişkisi saptanamamıştır. Klinik biyopsinin tüm belirteçlerini skorlama mümkün olsa da, EMT gelişen kanser hücrelerini normal konakçı hücrelerden ve tümörü saran bağ dokusundan ayırt etmek de oldukça zordur. Meme kanseri hastasında EMT gelişmesi sistemik yayılmayı arttırmakta olup, aynı zamanda ilaç direnci ve hastalığın rekürrensi açısından da majör bir faktördür. Her-2 (*insanlarda ERBB2 geni tarafından kodlanan bir proteindir. ERBB, kuş genomundan izole edilen bir gen olan eritroblastik onkogen B'den kısaltılır*) ile indüklenen fare tümörü modelinde aynı olay

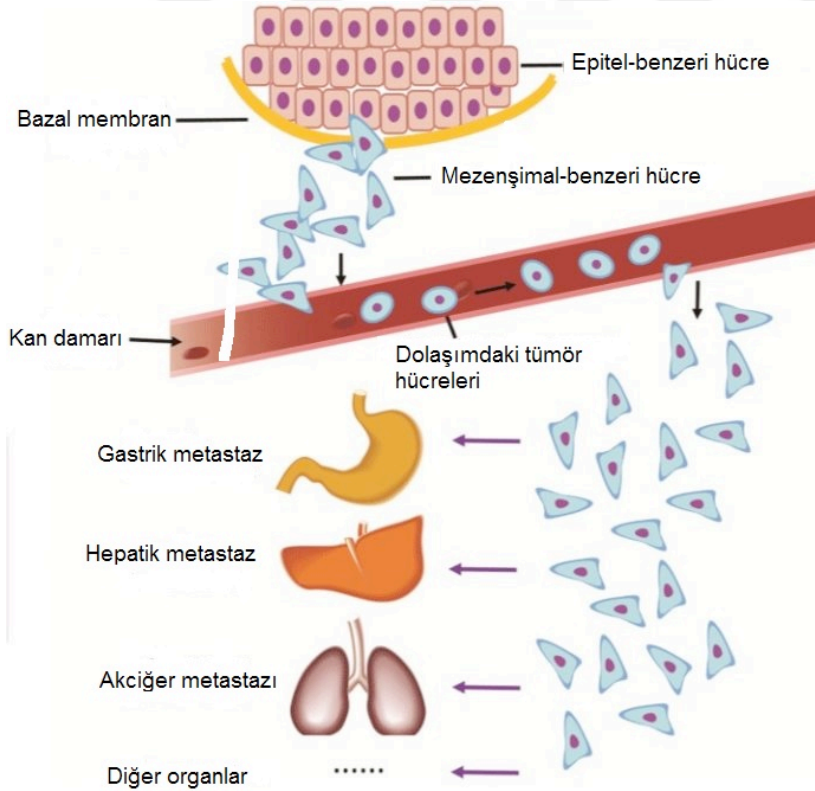
görülmekte olup *in vivo* tekrarlayan malignitelerde tümörleri yüksek mezenkimal fenotipe dönüştürmektedir. Bu sonuçlar, EMT aktivasyonu ile tümörün tekrarlamasının ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, EMT aktivasyonu ve artmış tümör oluşumu arasındaki bağlantı, birçok insan kanser hücre dizilerinde gösterilmiştir. EMT'nin plastisitesinin inhibisyonu kanser hücrelerinin zayıf tümör oluşturan durumdan yüksek tümör oluşturuca duruma geçişini baskılamaktadır. Ayrıca, ilerlemiş prostat ve meme kanseri hastalarının periferel kanlarından izole edilen tümör hücrelerinin bir kısmının hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçler gösterdikleri saptanmıştır (Sun ve ark. 2016).

Kan veya lenfatik sistem yoluyla tümör hücreleri primer alandan uzaklaşabilmekte ve daha sonra tümör metastaz oluşumu için uzak bir yere yerleşmekte ve büyümektedir. Bu süreç, tümör oluşumunda, malignite düzeyinde ve tümör hastalarının %90'ından fazlasının ölümünde anahtar rol oynamaktadır. Birçok çalışma tümör metastazının oluşumunun aslında kolay olmadığını göstermektedir. Tümör hücrelerinin çoğunluğu kan ve lenfatik sistem içine girebilmekte, fakat sadece küçük bir kısım mikrometastaz oluşturabilmekte ve hatta daha az kısmı gerçek metastaz yapabilmekte ve spesifik organ afinitesi göstermektedir. Ayrıca, farklı tümörlerin metastaz yapma süreleri aynı değildir. Bu nedenle bu sürecin anlaşılması önemli olup, EMT'nin önemi farklı yönlerden tartışılmalıdır. EMT, çoğu metastatik hücrelerin bir özelliği olup, özellikle yüksek derecede farklılaşmış epitel hücreleri, migrasyon ve invaziv özellikleri olan farklılaşmamış ve izole olan ektomezenkimal hücrelere dönüştürülmektedir. Migrasyon tümör hücresi metastazındaki dört temel adımdan biridir. Ekstrasellüler matriks (Extracellular Matrix, ECM) bileşenleri ve büyüme faktörleri, sekresyon faktörleri gibi çeşitli maddeler tümör hücrelerinin migrasyonunu uyarabilmektedir. Böylece, tümör hücreleri göç edebilmekte ve metastaz yapabilmektedirler. Tümör hücrelerinin migrasyon yeteneği metastaz potansiyeli ile ilişkilidir (Sun ve ark., 2016).

Epitel hücreleri sıkı bağlarla bağlı polarize(apikal bazal yönelimli) epitel hücrelerinden oluşur ve çevresel hasara karşı koruyucu bir bariyer görevi görür. Yapısal rijidite, ki güçlü hücre-hücre ve hücre matriks etkileşimleri anlamına gelmekte, epitel doku fonksiyonlarını yerine getirmek için esastır. Diğer taraftan mezenkimal doku erken embriyonel dönemde bulunan farklılaşmamış bir gevşek bağ dokusudur. Epitel hücrelerinden farklı olarak, mezenkimal hücreler direkt hücre-hücre bağlantısı ve polaritesi olmayan, yüksek hareketliliğe sahip fibroblast benzeri şekilli hücrelerdir. Mezenkimal hücreler aynı zamanda adipositler,

kondroblastlar ve osteoblastları içeren diğer hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip olup, kök hücre özelliği göstermektedir (Demirel ve ark., 2013).

EMT, ciddi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucu polarize epitel hücrelerinin mezenkimal özellik kazanmasını sağlayan biyolojik bir süreçtir. Bu nedenle, EMT embriyogenez ve yetişkinlik dönemi boyunca hücresel farklılaşma için bir mekanizma olarak kabul edilir. Sonuç olarak, EMT’de epitel hücrelerinin epitelyal belirteçleri baskılanır ve rigid yapı gibi epitelyal özellikleri azalır ve mezenkimal belirteçleri artar, fibroblast benzeri şekil, hareketlilik ve apoptoza direnci içeren mezenkimal özellikler kazanır. Tüm bu değişiklikler epitelyal dokuda hücre-hücre, hücre-matriks bağlarını değiştirir, epitel hücrelerinin esas epitel tabakasından serbestleşmesine ve normal gelişim, doku rekonstrüksiyonu ve onarım sırasında vücudun diğer bölgelerine göç etmesine izin verir. Mezenkimal hücreleri yerli yerine geldikten sonra mezenkimal epitelyal değişim denilen ters biyokimyasal değişikliklerle tekrar orijinal epitelyal özelliklerini kazanabilmektedir (Demirel ve ark., 2013).



Şekil 1. EMT sürecinde tümör hücrelerinin dönüşümü

EMT sürecinde tümör hücreleri epitelyal-benzeri hücrelerden mezankimal-benzeri hücrelere dönüşürler (Sun ve ark., 2016)

Embriyonik gelişim için esas olmasına ek olarak, EMT'nin epitelyal kanser hücrelerinin metastatik davranışı ve invazivitesini yükselten tümör oluşumunda anahtar rol oynadığı birkaç hayvan tümör modelinde ileri sürülmüştür. Embriyonik gelişimdeki EMT ile ilişkili çeşitli genler ve sinyal yolları kanser oluşumu sırasındaki EMT'de de izlenmiştir. EMT nedeniyle hareketli olan ve birbiriyle bağlantı kaybı olan metastaz bölgelerinde primer tümörden yayılan primer tümör hücrelerinin epitel hücreleri olduğu tartışmalıdır. EMT kaynaklı invaziv ve göçen kanser hücreleri metastaz yaptıkları uzak yerlerde tipik olarak sekonder tümör oluştururlar. Bu sekonder alanlarda kanser hücreleri artık mezankimal özellikler göstermez ve epitelyal özelliklerini mezankimal-epitelyal dönüşüm (Mesenchymal-Epithelial Transition, MET) aracılığıyla (sekonder tümörler oluşturur) yeniden kazanır. Meme, over, kolon ve özefagus kanser modelleri için EMT görülmesi karakteristiktir (Demirel ve ark., 2013).

EMT epitel hücrelerinin mezankimal hücrelere dönüşümü olarak tanımlanmaktadır. EMT, apikal-bazal polaritenin kaybı, hücre hareketliliğinin artması ve hücre iskeletinin tekrardan yapılanması ile karakterizedir. OPN'nin yara iyileşmesi ve kanser metastazında önemli rolü olduğu gösterilmiştir.

2.3. Osteopontin Molekülü ve Sinyal Yolakları

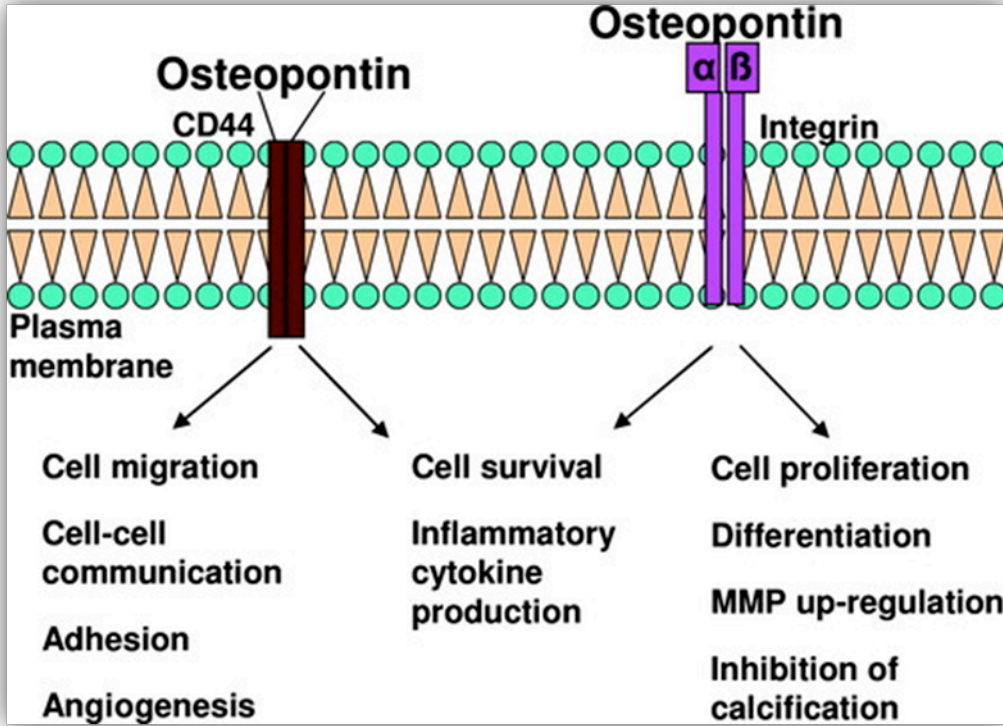
Osteopontin (OPN), 1986 yılında osteoblastlardan izole edilip tanımlanmış olup SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-Linked Glycoprotein) yapısındadır. OPN başlıca osteoblastlardan ve diğer hematopoietik hücrelerden sentezlenmektedir. Bunun yanı sıra, nötrofillerden, dentrik hücrelerden, NK (Natural Killer) hücrelerden, T ve B hücrelerinden de sentezlenmektedir. OPN, bir ekstrasellüler matriks molekülü olup, hücre adhezyonu, anjiyogenez ve tümör metastazını da içeren birçok fizyolojik ve patolojik durumlarda yer almaktadır. OPN birçok fonksiyonları olan bir molekül olup, endometrial kanser de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin ilerlemesi ile ilişkilidir. OPN, endometrial kanserler de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin ilerlemesinde birçok fonksiyonu olduğu bildirilmiştir. OPN, embriyonun implantasyonu sırasında hücre adhezyon ve migrasyonun sürdürülmesi için endometriyumda hücre yüzeyinde integrin

reseptörüne bağlandığı öne sürülmektedir. Çeşitli çalışmalarda yükselmiş OPN sekresyonu ile meme ve prostat kanseri, skuamöz hücre karsinomu, melanom, osteosarkom ve glioblastom gibi çeşitli maligniteler ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda OPN negatif meme kanserlerinde yüksek konsantrasyonlarda OPN cDNA düzeylerinin anjiyogenezi teşvik ettiği ve böylece iskelet sisteminde metastazı başlattığı ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Cho ve ark., 2009;Zhao ve ark., 2018).

OPNsadece önemli bir non-kollajen kemik matriks proteini olmayıp, aynı zamanda diğer sistemlerde de rol oynamaktadır. Örneğin, bağışıklık sisteminin intriksik bir bileşeni olan OPN, sitokin üretimini kontrol eder ve hücre trafiğini düzenler. OPN yaklaşık 44 kDAağırlığında bir moleküler kütleyle sahip arginin-glisin-aspartat içeren bir asidik yapılandırıcı bir glikoproteindir. OPN başlıca osteoblastlar, osteositler ve diğer hemapoyetik hücreler tarafından sentezlenir. Ayrıca, OPN nötrofiller, dentritik hücreler, NK hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri tarafından salgılanmaktadır. OPN'nin yapısı kısmen basittir, 33 kDa ağırlığında tek zincirli 300 amino asit içeren polipeptid yapıda olan bir protein olarak ifade edilmektedir (Zhao ve ark., 2018).

Multiple tümör oluşumu durumunda, örneğin meme, servikal, over ve endometrial kanserde, hücre yüzeyi reseptörü CD44'ü aşırı üretmektedir. CD44 ligandlarından biri bir çok hücre tarafından salgılanan ve hücre içi bir formda üretilen çok işlevli bir fosfoglikoprotein olan OPN'dir. OPN, en yüksek miktarda kemikte bulunmakta ancak aynı zamanda böbrek, beyin, düz kas dokusu, makrofajlar ve ayrıca bir çok başka epitel ve kanser hücresinde de üretilmektedir. OPN'nin aşırı üretilmesi tümörün onkojenik potansiyeli ile ilişkilidir. Genel olarak tümör hipoksisi çeşitli kanserlerde, örneğin baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, serviks kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi kötü prognoz ile ilişkilidir. Bununla birlikte, hipoksiye yönelik girişimleri araştıran çalışmalar rastgele hastalarda büyük ölçüde çalışmış olup sonuçlar genellikle hayal kırıklığı yaratmaktadır. Sonuç olarak, tümör hipoksisi ile ilgili olarak, hastaların bireysel değerlendirilmesinde ideal hipoksi görüntüleme veya kan hipoksi belirleyicileri aracılığıyla değerlendirilmesine gerek vardır. OPN, RGD (Arg-Gly-Asp) peptidini içermektedir. Bu element parçası CD 44 bağlama alanını integrinler için başka bir bağlama alanından ayırmaktadır. Bu, N-terminal RGD alanı trombinden ayrıldıktan sonra aktive olmakta ve bu OPN-fragmanı fosforilasyondan sonra integrinleri bağlayabilirken, OPN molekülünün C-terminal kısmı, CD44 reseptörlerini bağlamaktadır. Bu

nedenle OPN sitokin, kemotaktik ve hücre sinyal fonksiyonlarına sahiptir ve farklı sinyallere aracılık etmektedir. OPN, MMP'leri (matriks metalloproteinazlar) bağlayabilen ve onların fonksiyonlarını değiştirebilen ekstrasellüler matriksin bir parçasıdır. OPN, hücrelerin adhezyon ve migrasyonunu etkilemekte ve bu nedenle anjiyogenez, metastaz ve invazyon gibi tümör oluşumlarının doğrudan etkilenmesini sağlayabilmektedir. Ayrıca, OPN üretimi bir çok tümör varlığında PI3K/Akt sinyal ileti yolağının aktivasyonu ile ilişkilidir ve apoptoza karşı bir direnç oluşturduğu tartışmalıdır (Hahne ve ark., 2013)

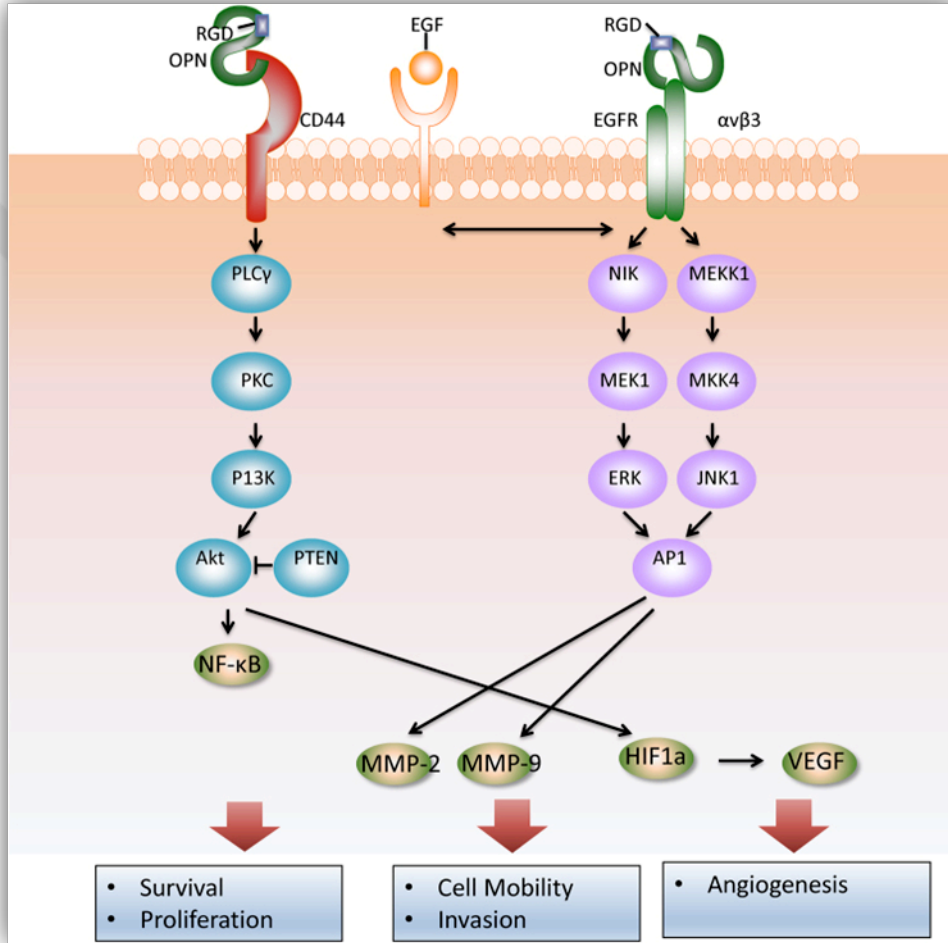


Şekil 2. OPN'nin mekanizmasına genel bir bakış.

OPN ekstrasellüler matriks proteinlerine (örn; integrin) ve adhezyon moleküllerine (örneğin; CD44) bağlanmakta ve vasküler hastalıkları regüle etmektedir (Shaheen ve Weintraub 2007).

OPN birçok fizyolojik olaylarda aktif olarak yer almaktadır. Kemik şekillenmesinde ve kemiklerin mineral matriksi için osteoklast sağlamada önemli bir faktördür. Ek olarak, OPN hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemlerini düzenlemektedir. OPN, Tip-1 yardımcı hücre sitokinlerine benzer bir şekilde fonksiyon göstererek hücre aracılı immun yanıtı desteklemektedir. OPN, immun sistemde gen ekspresyonunu regüle eden hücre içi yolları da

aktive edebilmektedir. Hücre farklılaşmasında OPN'nin önemli rolü tümüyle araştırılmış olup, integrin- $\alpha_v\beta_1$ ile etkileşerek mezenkimal kök hücrelerin osteogenik değişimini ve adipogenik farklılaşmayı baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, OPN sitokin üretimini düzenlemektedir. Özetle, OPN'nin kemik mineralizasyonunun regülasyonu, makrofajların toplanması, hücresel adhezyon ve migrasyonun kolaylaştırılması gibi birbirinden farklı fonksiyonları bulunmaktadır (Zhao ve ark., 2018).



Şekil 3. Tümörün ilerlemesinde OPN sinyal yolağı

Osteopontin (OPN), RGD (Arg-Gly-Asp) peptidine bağlı yolda ve RGD'ye bağlı olmayan yolda çeşitli integrin molekülleri ile etkileşebilmektedir. OPN aynı zamanda CD44 ailesi reseptörleri ile de etkileşebilmektedir. Reseptörlere bağlanmasıyla, OPN canlılığı, motiliteyi ve tümörün ilerlemesi gibi hücresel reaksiyonları tetiklemektedir. CD44 reseptörü ile etkileşimi yoluyla OPN tümör hücrelerinde anti-apoptotik sinyalleri PLCγ-PKC ve PI3K

yoluyla aktive etmektedir. $\alpha_v\beta_3$ reseptörüne bağlanarak ERK'nın fosforilasyonuna yol açarak tümör hücrelerinde hücrelerde motiliteyi, invazyonu ve her iki reseptör yoluyla da anjiyogenezi stimüle etmektedir (Zhao ve ark. 2018)

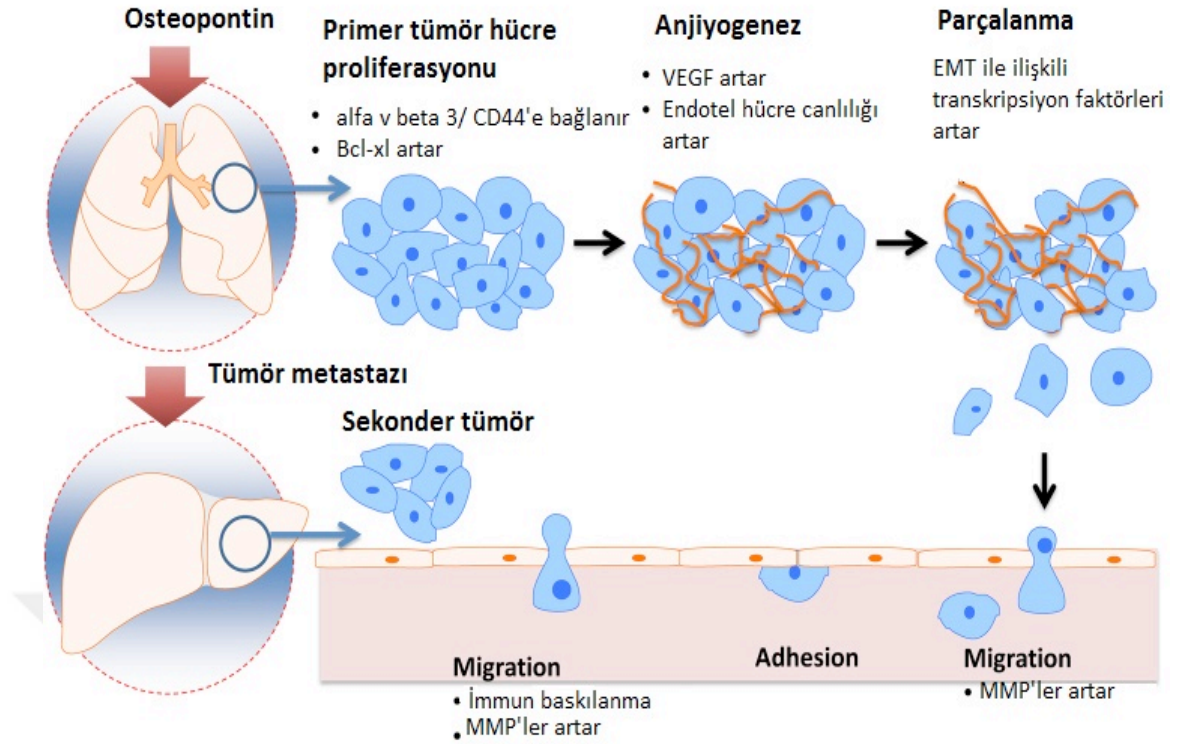
2.4. Kanserın İlerlemesinde Osteopontinin Rolü

OPN bir fosfoprotein olup, tümör metastazının gelişiminde önemli bir aracı moleküldür ve ilerlemiş vakalarda metastazın regülasyonunda potansiyel tedavi yaklaşımını belirlemek için biyomarker olarak kullanılması araştırılmıştır. OPN'nin DNA sekansı yüksek oranda karmaşık olup önemli fonksiyonel protein içerikleri olan $\alpha_v\beta_3$, integrinler ve CD44 bağlanma bölgeleri içermektedir. Yüksek OPN düzeyleri tümörün invazyonu, ilerlemesi ve birçok kanserde metastaz yapması ile ilişkilidir. Çalışmalar OPN'nin bu moleküler mekanizmaları apoptozu önleyerek, ekstrasellüler matriksin parçalanmasını ve tekrar modellenmesini indükleyerek, hücre migrasyonunu teşvik ederek, konakçı immun sistemden hücreleri koruyarak ve neovaskülerizasyonu tetikleyerek yaptığını göstermiştir. Ayrıca, klinik çalışmalarda metastatik kanserlerde plazma OPN düzeylerinin kontrollere göre oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Bir çok tümör örneklerindeki histolojik analizlerde ise, OPN ekspresyonunun artmasının invazyon, hastalığın ilerlemesi ve metastaz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu kanserler; meme, mide, akciğer, prostat, karaciğer ve kolondur (Wai ve Kuo 2008).

Normal fizyolojik yanıtta aracılık etmedeki rolüne ek olarak, OPN'nin kanser progresyonundaki sinyal yollarındaki rolü gittikçe daha fazla tanınmaktadır ve tümör metastazının çoklu aşamalarında yer aldığı gösterilmiştir. Bir çok çalışmada, OPN salgılanması ile meme, prostat kanseri, skuamöz hücreli karsinom, melanom, osteosarkom gibi çeşitli maligniteler arasındaki ilişki gösterilmiştir. OPN negatif meme kanseri hücrelerinde, yüksek OPN cDNA konsantrasyonunun anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiş olup, bu nedenle iskelet metastazını ve tümörün ilerlemesini arttırmaktadır. Bunun yanısıra, OPN'nin invaziv melanomda tümör hücresinin büyümesini sağlaması ile ilişkili olarak, OPN ekspresyonunu bloke etmek, *in vitro* melanom hücre sayılarını azalttığı rapor edilmiştir. Bu bulgular OPN'nin melanom gelişiminde erken bir belirteç olabileceğini göstermektedir. OPN, bir integrin olan ve özellikle endotel hücrelerinde bulunan $\alpha_v\beta_3$ reseptörü (*adhezyon proteini olup, endotel hücrelerde ve osteoklastlarda yüksek oranda bulunmaktadır. Osteoklastların*

olgunlaşmasında ve kemik rezorpsiyonu aktivitesi için gereklidir. Osteoporozu neden olan osteoklastogenez sırasında bu molekül azalmaktadır)içinyüksek afinite göstermesinden dolayı anjiyogenezde önemli bir rol oynamaktadır. Endotel hücrelerin canlılığı için $\alpha_v\beta_3$ yoluyla sinyal mekanizması önemlidir ve OPN'nin bu hücrelerin canlı kalmasını teşvik ettiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, *in vivo* olarak anjiyogenez ve OPN arasında korelasyon olduğuna dair güçlü bir kanıt bulunmamakta ve OPN'nin diğer pro-anjiyogenik moleküller ile etkileşip anjiyogenezi stimüle ettiği daha olasılık dahilinde olduğu öne sürülmüştür. Kanser hücrelerinin metastaz yapması oldukça kompleks bir proses olup şu basamakları gerektirmektedir; primer tümörden kanser hücrelerinin ayrılması, yayılması, kanser hücrelerinin dolaşımında olması, kan damarlarına yapışması, damar dışına göç etmesi ve sekonder tümör oluşturması. Her ne kadar, OPN'nin rolü bu proseslerdeki rolü tam anlaşılmamış olsa da, meta-analizlerde kolorektal kanser, akciğer kanseri ve melanomların metastazı ile OPN'nin yakın ilişkisi rapor edilmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Aşağıda şekilde de gösterildiği üzere, kanser hücre metastazında OPN'nin multi-step rolleri vardır. OPN'nin sekresyonunun artması yoluyla protein yapısında farklı aracı moleküllerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Primer tümör vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) gibi çeşitli büyüme faktörleri ile anjiyogenez yoluyla vaskülarizasyona gitmektedir. Kanser hücrelerinin birbirlerinden ayrılması sonrasında iç kısımlara göçüş başlamakta, tümör hücreleri vasküler sisteme girmektedirler. Kan damarlarından dışarıya çıkmadan önce tümör hücreleri kan damarlarının duvarlarına tutunmakta ve kan damarlarını terk etmektedirler. Daha sonra tümör hücreleri ikinci bir tümör gibi büyümeye devam etmekte ve metastaza neden olmaktadır (Zhao ve ark., 2018).



Şekil 4. Kanser hücrelerinin metastazında OPN'nin rolü

OPN'nin aşırı eksprese edilmesi farklı protein aracı moleküllerini aktive etmekte ve bu da kanser hücrelerinin metastazında çoklu basamaklarda indüklemektedir. Primer tümör salgıladığı VEGF gibi çeşitli büyüme faktörleri yoluyla anjiyogenez oluşması sonucunda vaskülarizasyona uğramaktadır. Kanser hücrelerinin tümörden kopmasını damar içine vasküler sisteme girmesi izlemektedir. Bundan sonra tümör hücreleri kan damarlarına bağlanmakta, damarlardan dışarıya çıkmakta ve dolaşımı terk etmektedir. Bunun sonucunda tümör hücreleri metastaz oluşturmaktadır (Zhao ve ark., 2018).

2.5. Tümörlerin İlaç Tedavisine Dirençli Olmasında OPN'nin Rolü Nedir?

Pre-klinik çalışmalarda elde edilen bulgular OPN'nin ilaç tedavisine direnci indüklediği yolunda olup, bu konuda OPN'nin rolü halen araştırılmaktadır. OPN ve kemorezistans arasındaki ilişki konusunda iki teori mevcuttur. Otofaji, evrim kuralları gereğince hücreler strese maruz kalınca, organellerin lizozomlar tarafından parçalanması olarak tanımlanan, katabolik prosesleri yani hücrelerdeki yıkım olaylarını içine alan oldukça karmaşık bir süreçtir. Kemoterapiyi izleyen otofajinin paradoksal bir rolü olduğu konusunda gittikçe artan

kanıtlar ortaya çıkmakta olup bu görüşler ise OPN'nin kemoterapinin anti-kanser aktivitesini hem azaltabildiği hem de arttırabildiği yönündedir. Otofajinin bazı kanser hücrelerinde kemoterapi esnasında ilaç tedavisine direnci arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, otofajinin aynı zamanda otofajik hücre ölümünü (*hücre ölümünün apoptozdan farklı bir formu*) indükleyebileceği kanıtlanmıştır. Şimdiki literatür bilgilerine dayanarak, otofajinin regülasyonunun artması yoluyla ilaç tedavisine direncin artabileceği kesindir. Son çalışmalar ise, OPN/NF- κ B yolunun aktivasyonu ile OPN ile indüklenen otofajinin pankreatik kanser hücrelerinde gemcitabine direnç gelişmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir. OPN ekspresyonunun sessiz kalmasının (*OPN artıyor fakat işlevini yapmıyor*) insan pankreas hücrelerinde ilaç direncinin gelişmesine neden olduğu öne sürülmüştür. Buna benzer bir sonuç hepatosellüler karsinom hücrelerinde elde edilmiş olup, OPN aynı ilaç direncini otofajiyi $\alpha_v\beta_3$ reseptörü / MEK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) / ERK 1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) yoluyla aktive etmesiyle göstermiştir. İkinci teori ise, OPN ve ilaç direnci arasında bir ilişki olduğu ve OPN'nin kanser hücreleri üzerinde anti-apoptotik etkilerinin olabileceği yönündedir. Çok yeni bir çalışmada ise, OPN ekspresyonunun meme kanseri hücrelerinde siRNA (*Small interfering RNA; küçük girişime neden olan RNA yeni tanımlanmış olup genlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir*) ile baskılanması yoluyla ve meme kanseri hücrelerinin yaşlandırılması ile doksorubisine yanıtı arttığı gösterilmiştir. Araştırmacıların çoğu, bu bulguların PI3K/Akt sinyal yolağı ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Buna ek olarak, başka bir grup, OPN-üretmeyen (knockout) meme kanseri hücrelerinde yüksek doz siklofosfamid tedavisinin normal meme kanseri hücreleri ile kıyaslandığında hücreleri apoptoza götürdüğü saptanmıştır. Bunun sonucunda, araştırmacılar OPN'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki anti-apoptotik etkilerini p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*) yolağı ile gösterdiğini bulmuşlardır (Zhao ve ark., 2018).

2.6. Terapötik Hedef Olarak Osteopontin

Tümörlerden sentezlenen OPN molekülünün önemli bir parçasının eksik olduğu ve bu nedenle yapısal olarak diğer tip OPN'lerden farklı olduğu ileri sürülmektedir. Bunun sonucunda, üretiminin bloklanmasının tümörün progresyonunu durdurmak için kullanılabileceği bildirilmiştir. Halihazırda, RNA düzeyinde OPN'nin gen ekspresyonunu azaltmanın iki yolu bulunmaktadır. Bununla birlikte her iki metod da sınırlıdır, çünkü nükleik asidlere etkili ilaçların hücre içine taşınması zordur. OPN proteininin inhibisyonu için

antikorlar ve sentetik peptidler denenmiştir. OPN üzerinde spesifik bölgeleri tanıyan çeşitli antikorlar geliştirilmiştir. İnsan prostat karsinoma hücrelerinde OPN'ye karşı kullanılan poliklonal antikorların tümör büyümesini engellediği, sıçanlardan elde edilen murine anti-human OPN'nin meme kanseri hücrelerinde adhezyonu önlediği rapor edilmiştir. Epitel hücrelerde adhezyonu inhibe etmek yoluyla apoptozun artırıldığı saptanmış ve böylece kanser hücrelerinin adhezyonunun önlenmesinin (kan damarları içinde) tümör hücrelerinde apoptozu arttırabileceği, böylece kanserin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Zhao ve ark, OPN geninin bulunmadığı kolon kanseri hücrelerinde, OPN'nin sessiz kalması (silencing) sonucunda sinyal yolakta aşağı doğru VEGF(*Vascular Endothelial Growth Factor*), MMP2(*Metalloproteinase-2*) ve MMP9(*Metalloproteinase-9*) ekspresyonlarının azaldığı saptanmış olup, bu da klinik olarak kanser hücrelerinin invazyonu, anjiyogenez ve metastazın görülmeceği anlamına gelmektedir. Ayrıca, OPN'nin bağlanarak sinyal yolağı aktivasyonunu başlattığı reseptörler olan CD44 ve $\alpha_v\beta_3$ -integrin proteinlerini hedef alarak bloke eden antikorlar ile ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Son olarak, bir RNA aptameri (*aptamer, oligonükleotid veya peptid yapısında bir molekül olup, hedef genlere bağlanmaktadır*) olan OPN-R3 kullanılarak bir çalışma planlanmış olup, OPN'nin sinyal ileti yolağında PI3K, JNK1/2 (*c-Jun N-terminal Kinase*), Src (*bir proto-onkogenik tirozin kinaz grubudur. Çok hücreli organizmalarda hücreler arası sinyal iletiminde rol oynarlar. Ayrıca, hücre büyüme ve embriyonik gelişimin düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir*) ve Akt molekülleri, aynı zamanda ekstrasellüler matriksin parçalanması yolunda önemli moleküller olan MMP2 ve MMP9 matriks metalloproteinaz moleküllerinin sentezinde önemli azalmalar olduğu saptanmıştır. Yine, *in vitro* bir modelde OPN-R3 aptamerinin meme kanseri hücrelerinde adhezyonu % 60, migrasyonu % 50 ve invazyonu % 65 oranında azalttığı ve *in vitro* meme kanseri ksenograf (*burada bir hücrenin bir canlıda tümör oluşturması anlamında kullanılmıştır*) modelinde aptamerin tümörün lokal olarak ilerlemesini ve uzak metastazları önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Zhano ve ark., 2018).

Sonuç olarak, OPN'nin hücre adhezyonu, hücre-hücre etkileşimi, invazyon ve deneysel sistemlerde tümör hücrelerinin koloni oluşturmasını tetiklediği ve bu molekülün tümörlerde prognostik bir belirleyici olabileceğini, metastazın kontrol edilmesinde tedaviye aracılık edebilecek potansiyel bir belirleyici olabileceğini göstermektedir.

2.7. ERK1/2 (Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2) Yolağı

Protein kinazlar ailesi içindeki, MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) tüm ökaryotik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir. Birçok kanser türünde, obesitede, polikistik böbrek hastalığında, Alzheimer's hastalığında, astım, kardiyovasküler hastalıklar gibi durumlarda MAPK yolunun anormal regülasyonu saptanmıştır. MAPK ailesinin en az dört üyesi tanımlanmıştır: ERK 1/2, JKN, p38 ve ERK5. Her ne kadar, ERK aktivasyonunun hücrelerin survisi ve proliferasyonu ile ilgili olduğu kabul edilsede, birçok çalışmada bunun hücre tipine ve uyarana bağlı olduğu, ERK'nın aktivasyonunun hücre ölümüne yol açabileceği rapor edilmiştir. Bazı çalışmalar, pro-/anti-apoptotik sinyallerin yoğunluğu arasındaki dengenin ve sürekliliğinin, ERK1/2 molekölü yoluyla iletilmesinin hücreleri ya proliferasyona veya apoptoza götürdüğu öne sürmüştür. Bununla birlikte, ERK aracılığı ile hücre ölümünün mekanizması halen tam aydınlatılamamıştır (Mebratu ve Tesfaigzi 2009).

ERK sinyal yolağının aktivasyonu daha çok hücre membranı reseptörü olan tirozin kinaz reseptörleri, G-proteinleri ile çiftleşmiş reseptörler ve iyon kanalları yoluyla aktive olmaktadır. ERK1/2 aracılığı ile sürdürülen EMT, epitel hücreleri, mezenkimal ve fibroblast özellikleri kazanırken kritik bir rol oynamaktadır. Böylece, hücrelerarası adhezyonun ve hücre hareketliliğinin azalması ve hücre artması sırasıyla gözlenmektedir. Bu süreç, kanser hücrelerinin perifer dokulardan invazyonuna ve metastazına olanak verebilmektedir. EMT kanser hücrelerinin ilaç tedavisinde dirençli olmasının nedenlerinden biridir (Mehdizadeh ve ark., 2016).

2.8. PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) Sinyal Yolağı

PI3K lipid yapısında bir moleköl olup, tirozin kinaz reseptörü aracılığı ile sürdürülen sinyal yolağı ile ilişkili olup, üç sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I PI3K, survinin sürdürülmesi, mitojenik yanıtlar, hücre proliferasyonu, insülin sinyal yolağı ve hücre motilitesi gibi çoklu hücre süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Böylece, kanserde önemli bir hedef olmaktadır. Endometrial karsinom dünyada en yaygın görülen genital sistem malignitesi olup, sıklıkla progesteron tarafından karşılanmayan yüksek östrojen düzeyleri ve tümör supresör bir gen olan PTEN'in kaybı ile karakterizedir. Östrojen, genlerin transkripsiyonel yolla baskılanması yoluyla hücre proliferasyonunu aktive etmektedir. Östrojen, aynı zamanda ekstrasellüler signal-regulated kinase ve PI3K/AKT sinyal yolağı gibi sinyal ileti yollarını aktive

etmektedir. Bir çalışmada, östrojenin endometrial kanser hücrelerinde hızlı, nono-transkripsiyonel etkiler ile PI3K/AKT sinyal yolağını aktive edebildiği rapor edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda PI3K'nın endometrial kanserlerde hedef tedavi olabileceği öne sürülmüştür. PI3K/AKT yolunun çeşitli genetik ve epigenetik değişimler yoluyla düzensiz aktivasyonunun meme, over, akciğer prostat ve endometrial kanserleri de kapsayan yaygın görülen kanserlerde bulunduğu gösterilmiştir. Akt ve diğer efektörler yoluyla PI3K yolunun aktive olması hücre döngüsünün regülasyonu, hücre canlılığı, hücre adhezyonu, motilite, tümör oluşumu ile ilgili anjiyogenezde değişikliklere yol açmaktadır. Bu nedenle bu sinyal yolağının inhibitörlerinin, özellikle PI3K yolağının dominant olduğu kanser türlerinde, hücrelerin sürvilerinin ve büyümelerinin durdurulmasında etkili bir anti-kanser tedavi edici bir ajan olabilecekleri rapor edilmiştir. Bununla birlikte, bu sinyal yolağın, normal fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesi için gerekli olduğu ve PI3K inhibitörlerinin kullanımının öngörülemez yan etkiler geliştirebileceği öne sürülmüştür (An ve ark., 2008)

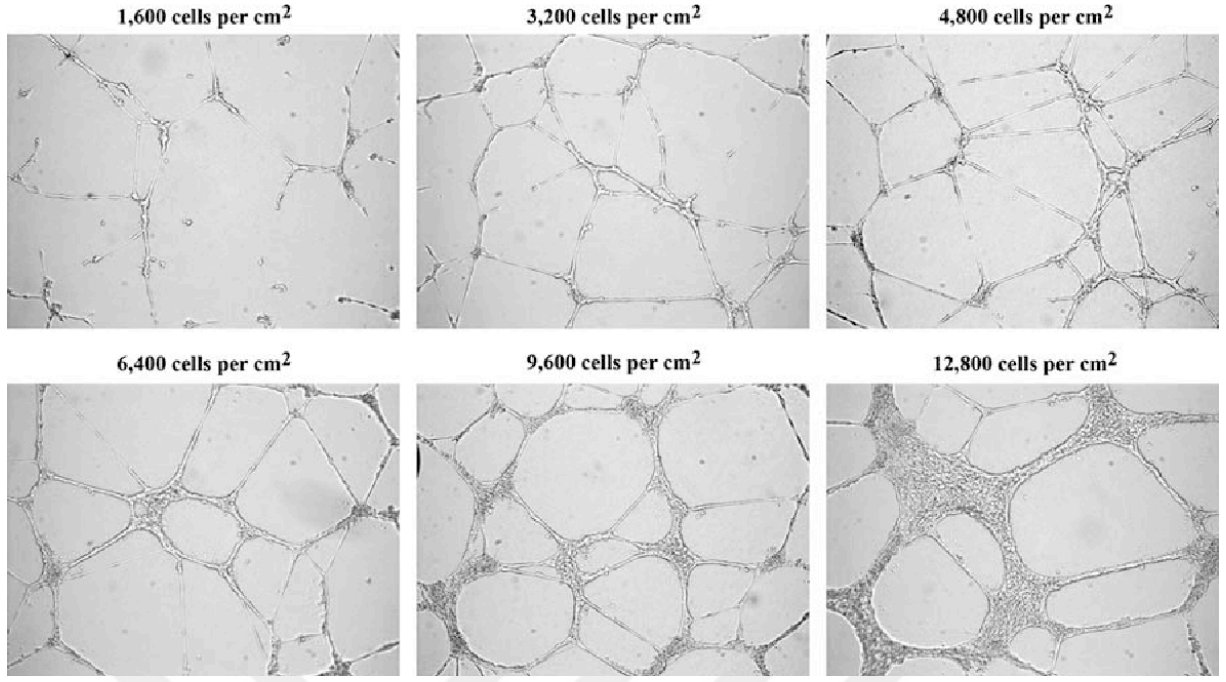
2.9. Anjiyogenez Nedir ve Tümör Oluşumu İçin Neden Gereklidir?

Anjiyogenez, hali hazırda var olan kan damarlarından, yeni kan damarlarının oluşumuna verilen bir addır. Bu işlem, yetişkinlerde çok önemli olup, besin maddeleri, çeşitli büyüme faktörleri ve moleküler oksijen tarafından desteklenmektedir. Yetişkinlerde bu işlemin var olduğu durumlar; doku tamiri, hamilelikte görüldüğü gibi doku yenilenmesinde, menstrüel döngüde rahim duvarlarının yenilenmesinde, yara iyileşmesinde ve iskemiye (oksijenin azaldığı durumda) maruz kalan dokuların tekrar damarlanmasıdır. Bununla beraber, yetişkinlerde anjiyogenezin görülmesi (yeni kan damarlarının oluşumu) kanser, romatoid artrit, retinal neovaskülerizasyon ve ateroskleroz gibi birçok ciddi hastalıkta görülmektedir. Kapiller kan damarları endotel hücrelerinden ve perisitlerden oluşmuşlardır. Bu iki hücre tipi tüp yapılarının ve tüm kan damarları ağının oluşumu için tüm genetik bilgiyi taşımaktadır. Spesifik anjiyogenik moleküller bu süreci başlatmaktadırlar (Grant ve ark., 2002; Auerbach ve ark., 2003).

1. Sitokinlere yanıt olarak, endotel hücreleri bazal membranı parçalar ve ekstrasellüler boşluğa yayılırlar
2. Endotel hücreler boşlukta olan yayılan hücrelerin yerine geçerler
3. Hücreler hedef bölgede bağ dokusuna doğru göç ederler

4.Yeni kan damarlarını ve lümenleri oluştururlar ve bazal membranını salgılamaya başlarlar

Her ne kadar vasküler sistem genellikle stabil ise de, herhangi yaralanmada ve tümör hücresi oluşumunda hızlıca değişikliğe uğramaktadır. Damarların stabilitesi üç temel hücre tipi tarafından sağlanmakta olup, bunlar endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlardır. Hepsi de, sahip oldukları ekstrasellüler matriks ve birçok sitokin ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenirler. Yeni kan damarları oluşumu, kılcal damar duvarının iç kısmında ve kapiller yataklardan sonra oluşmuş olan, daha küçük damarlarda gerçekleşmektedir. Endotel uyarıldığında ilk olarak proteazlar bazal membranı ve çevresindeki yapısal bileşenleri parçalamaktadır. Daha sonra, hücreler damar dışı bölgeye göç etmekte ve damar duvarında uzanmış olan endotel hücreleri çoğalmakta ve daha önce göç eden hücreler ile yer değiştirmektedir. Endotel hücreleri yeni damar oluşturmak üzere tekrar organize olmaya başlamakta ve yeni oluşan damar yapısını korumak üzere yeni bazal membran salgılanmaktadır. Bundan sonra damar yapısı, stabilize olmaya başlamaktadır. Matrigel, bir bazal membran ekstraktı (Engelbreth-Holm-Swarm farelerinden elde edilmiştir, EHS) olup laminin içermektedir ve epitelyal ve nöronal hücrelerin farklılaşmasını sağlamaktadır. İnsan endotel hücreleri Matrigel (Ötantik basal membran) üzerine konmuş ve yaklaşık 20 saat sonunda organize olup tüpe benzer yapılar oluşturduğu gözlenmiştir. Hem ışık hem de elektron mikroskopunda, bu kapiller damarlara benzer ağ yapılarının lümenlere sahip oldukları ve endotel hücrelerin *in vivo* durumda bulunan damarlara benzer membran özellikleri gösterdikleri ilk olarak Grant ve ark.,(1991) tarafından rapor edilmiştir (Grant ve ark., 1995; Arnaoutova ve ark., 2009).



Şekil 5. *In vitro* anjiyogenez

Endotel hücrelerinin (HUVEC) tüp oluşturmasının ortamdaki hücre sayısına göre değişimi gösterilmiştir (Arnasoutova ve ark. 2009)

2.10. Anjiyogenezin Kanser Tedavisindeki Önemi

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, proliferasyona uğrayan hücreleri hızlı bir şekilde öldürmek üzere oluşturulmuşlardır. İlaç tedavilerinin normal dokular üzerindeki toksisitesi gibi yan etkilerinden dolayı, bu ilaçların yapımında anti-tümör etkileri bazen sınırlı tutulmaktadır. Çünkü, normal hücrelerin sabit bir yenilenme hızı olup, çoğalmamaktadırlar. Kontrol edilemeyen hücre çoğalması ise neoplazi durumlarında en önemli ve kritik konu olmaktadır. Hücrelerde kansere dönüşüm başladığında, normal dokular da dönüşüme uğramaktadırlar. Kılcal damarlarının büyümesinin, başka bir deyişle anjiyogenezin kontrol edilmesi, yakın gelecekte kötü huylu tümörlerin tedavisini sağlayacaktır. Anti-anjiyogenik bir ilacın, sadece tümör hücreleri damar yapısına ait olan endotel hücrelerin büyümesini spesifik olarak inhibe ederek, tümörün büyümesini engellemesi umulmaktadır, çünkü, normal hücrelerin kapiller endotel hücreleri son derece yavaş büyümektedir, halbuki tümör hücrelerinin damarları oldukça hızlı ve katlanan bir hızla büyüme göstermektedir (Auerbach ve ark., 2003)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Malzemeler

Ürün	Ürün Kodu	Firma
Fetal Bovin Serum (FBS), 100 ml	CP-16-1265	Capricorn
Bovin Serum Albumin (BSA),100 g	A-3059	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin, 100X, 20 ml	P-4333	Sigma-Aldrich
Tripsin-EDTA (%0,25), 1X, 100 ml	T-4049	Sigma-Aldrich
L-Glutamine, 200 Mm, 100 ml	G-7513	Sigma-Aldrich
Gentamicin, 50 mg/ml	G-1397	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 500 ml	CP16-1273	Capricorn
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS), 500 ml, Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ free	D-8537	Sigma-Aldrich
Amphotericin B, 20 ml	A-2942	Sigma-Aldrich
Ishikawa Hücre Dizisi	-	ADÜ-BİLTEM
75'lik steril flask	431464U	Corning
25'lik steril flask	-	Orange Scientific
1,5 ml'lik steril eppendorf	-	Axygen Quality
15 ml'lik steril falkon	-	Orange Scientific
50 ml'lik steril falkon	31434	Sigma-Aldrich
Steril 12 kuyucuklu mikropate	3513	Costar
Pipet tek kullanımlık steril, 5 ml	160510	Sigma-Aldrich
Pipet tek kullanımlık steril, 10 ml	4488	Costar
HUVEC Hücre dizisi	ATCC-PCS-100-040, Lot No: 58769054	ATCC
Recombinant Human Osteopontin Protein, 50 mg	PKSH032000	Elabscience
PI3K Human ELISA kiti	E-0896Hu	Bioassay Technology Laboratory
ERK1/2 Human ELISA kiti	E-4633Hu	Bioassay Technology

		Laboratory
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), 100 mg	298-93-1	Sigma-Aldrich
ITS (İnsulin/Transferrin/Selenium) (ITS-G)	41400045	Gibco
EBM (Endothelial basal medium), 500 ml	B1520	Merck
BME (Basal membrane extract), growth factor reduced, 5 ml	3532-001-02	Merck
ECGS (Endothelial cell growth supplement), 5 ml	211F-GS	Merk

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

İnkübatör, Nuair

Biyogüvenlik Kabini (2.seviye), Heraeus

İnvert Mikroskop, (Olympus CK40)

UV-Visible Multiskan Spektrofotometre, (Diagnostik Automation, Inc)

Soğutmalı Santrifüj (15 ml falkon için), Hettich D78532

Soğutmalı Santrifüj (eppendorf için), Eppendorf 5415R

Mikroplate Shaker (ısıtmalı), Eksper HT

Mikroplate Yıkayıcı, Eksper

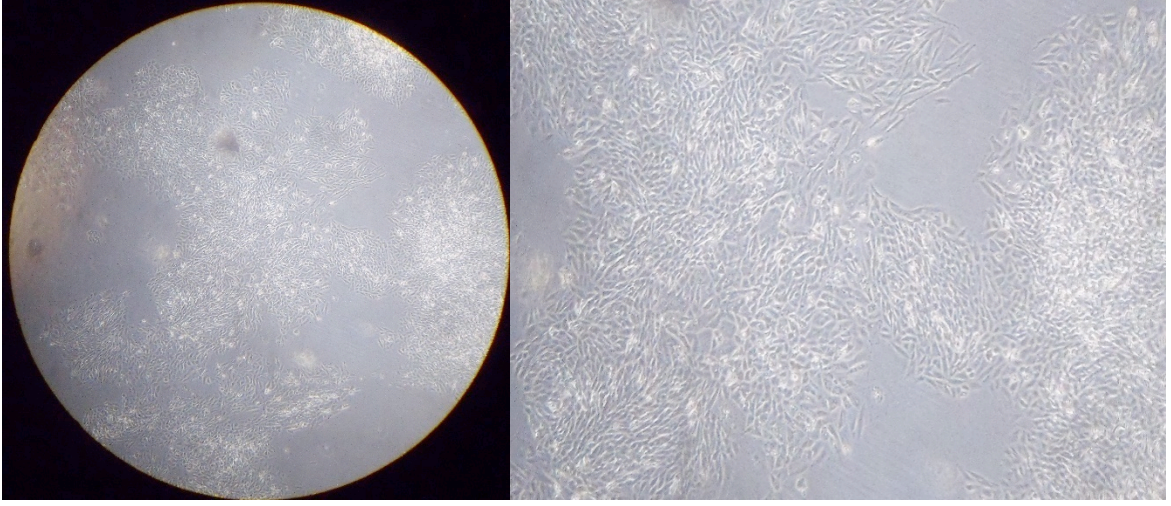
EVE™ Otomatik Hücre Sayım Cihazı, NanoEnTek

Epoch Mikroplak Okuyucu, BioTek

3.2. Yöntemler

3.2.1.HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) Hücreleri Temini ve Ekimi

HUVEC primer hücre hatları (ATCC-PCS-100-040, Lot No: 58769054) insan göbük kordonu hücrelerinden elde edilmiş olup, ATCC'den (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA) tedarik edilmiş olan ve -196 °C'de saklanmış olan hücre stoklarından elde edilmiş olup 2. ve 3. pasajlar kullanılmıştır.



Resim 1. HUVEC hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü (1. Pasaj)

HUVEC hücrelerinin besiyerinin hazırlanması ve hücrelerin canlılığının sürdürülmesi Grant ve ark., (2002), Auerbach ve ark., (2005) metodlarına göre yürütülmüştür (Grant ve ark., 2002; Auerbach et al. 2003)

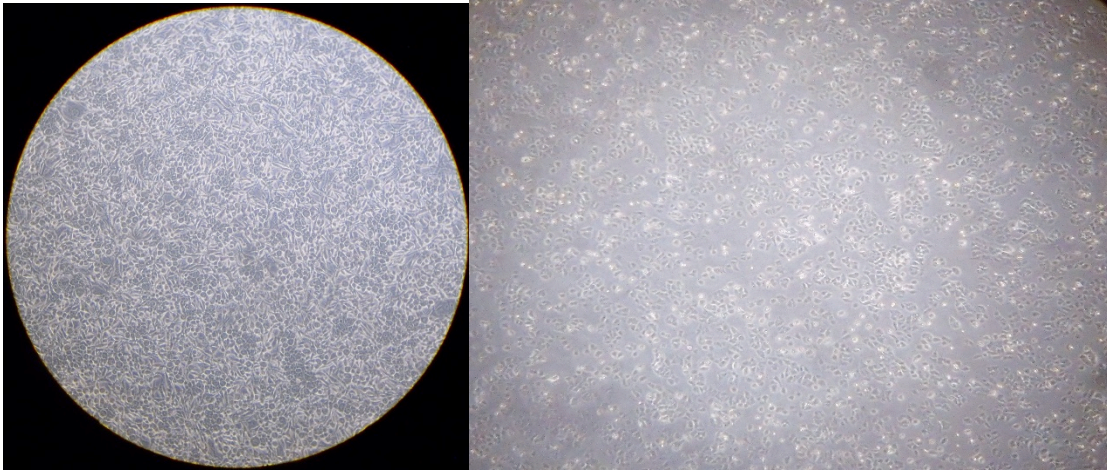
- 500 mL M199
 - 100 mL FCS veya FBS (% 20)
 - 100 mg ECGS (20 µg/ml)
 - 5 ml Glutamine
 - 250 µl Heparin (5 U/ml)
 - 5 mL Penisillin/Streptomycin
 - 5 mL Fungizone
 - 0.5 mL Gentamicin
1. 5 mL M 199, 100 mg ECGS içeren şişenin içine konular ve eritilir.
 2. 250 mL'lik steril şişe içine 100 mL FCS, 5 mL glutamine, 5 mL penisillin/streptomycin amphoterin B, 0.5 mL gentamisin, 250 µL heparin konur.
 3. Bu karışım içine, daha önce M 199 ile çözülen 5 mL'lik ECGS çözeltisi eklenir.
 4. Tüm içerik 0.22 mikron filtreden geçirilerek steril edilir ve M199 içine eklenir.
 5. Steril hale gelmiş olan HUVEC hücre besiyeri 50 mL'lik steril konik tüpler içine porsiyonlanarak kullanıma hazır hale getirilir ve +4°C ye konur.

3.2.2. Ishikawa (ISH) hücre hatlarının temini ve hücre ekimi

Ishikawa hücreleri iyi diferansiye olmuş insan endometrial adenokarsinom hücreleridir. Hem hücre kültürlerinde hem de tümör oluşumunda östrojen ve progesteron reseptörlerinin pozitif olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda kullanılan hücreler Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Merkezi (BİLTEM) laboratuvarında -196 °C sıvı azotta saklanan Tıbbi Biyokimya AD Öğretim Üyesi Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY'in hücre stoklarından elde edilmiştir. Hücreler, MEM (Minimum Essential Medium Eagle Medium) + 2 mM glutamin + % 1 NEAA (non essential amino acids) % 5 FBS (fetal bovine serum) + penisilin (100 U/ml) + streptomisin (100 µg/ml) içinde büyütülmüş olup, hücreler % 80-90 sıklığa eriştiklerinde çalışmalar yapılmıştır.

ISH Hücreleri İçin Medium Hazırlanması

- 500 ml MEM (Minimum Essential Medium Eagle Medium)
- 50 ml FBS (fetal bovine serum)
- 5 ml Penisilin-Streptomisin (100 U/mL)
- 5 ml Gentamicin (100 U/mL)
- %1 NEAA (non-essential amino acid)



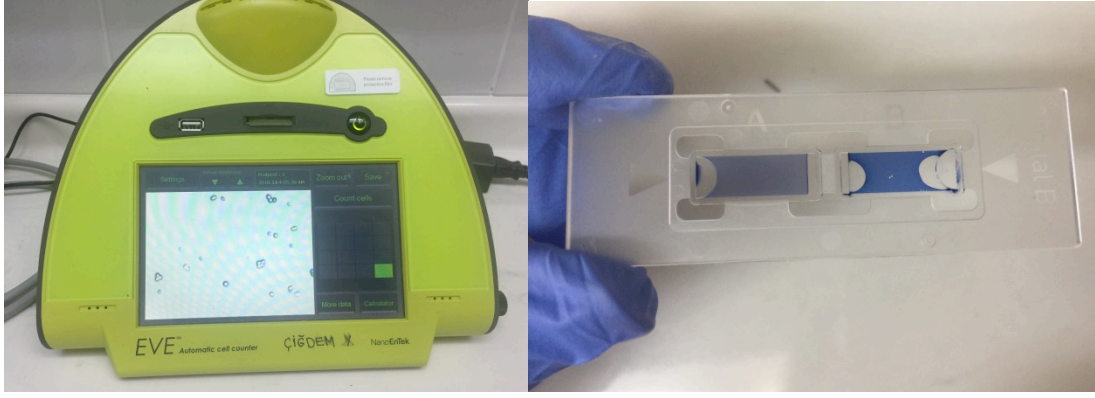
Resim 2. ISH hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü

3.2.3. Hücrelerin Çözdürülmesi

Önceden dondurulmuş olan (-196 °C, sıvı azot tankında) primer endotel hücreleri olan HUVEC ve Ishikawa endometrial kanser hücre dizisilerinin sıvı azottan çıkarılması ve kültür ortamına uygun prosedürleri takiben ekilmesi aşamasını içermektedir. Bunun için önceliklesu banyosu 37° C'ye ısıtılır, medyumların yani hücre kültür ortamının ısısının su banyosunda 37°C'ye gelmesi sağlanır. Hücreler sıvı azot tankından, -196° C'den çıkarılır çıkarılmaz 37° C'lik su banyosunda hızla çözülür. Hücreler çözüldükten sonra tüp kapağı %70'lik alkol ile silinir. 15 mL'lik santrifuj tüpüne aktarılıp üzerine 5 ml 37° C'de ısıtılmış taze besiyeri yavaşça eklenir ve ağzı sıkıca kapatılır. 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant pipetle aspire edilir ve atılır. Çöken hücre pelleti üzerine 5ml yeni ortam besiyeri eklenir ve pipetaj ile hücreler iyice süspanse edilir. 25 cm² 'lik flasklara aktarılır. Hücrelerin homojen dağılıp dağılmadığı invert mikroskop altında incelenir. %5'lik CO₂ inkübatörüne kaldırılır. Ertesi gün invert mikroskop altında hücre canlılığı incelenir. Hücreler adherent yapıda oldukları için canlı hücreler flask tabanına tutunmuş haldedirler. Ölü hücre ve artıkların ortamdandan uzaklaştırılması için eski ortam mediumu aspire edilir ve uzaklaştırılır, 6 ml yeni ortam besiyeri eklenir. Flask doluluk oranı %80-90 aralığına ulaştığı zaman 75 cm²'lik flasklara aktarılmak üzere pasajlama işlemi gerçekleştirilir.

3.2.4. Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Kontrolü

Her hücre bölünmesinde yani pasaj işleminde hücrelerin canlılığı tripan mavisi boyası (Biological, İsrail) ile kontrol edildi. Lam üzerine 10 µ hücre süspansiyonu ve 10 µl tripan mavisi koyularak karıştırıldı. EVE™ Automated Cell Counter, NanoEnTek hücre sayım cihazı kullanılarak hücreler otomatik olarak sayıldı ve canlı hücrelerin (boya almayan hücrelerin) yüzde oranı hesaplandı. Hücre sayım cihazı 1 ml'de ne kadar hücre olduğunu ve hücre canlılık yüzdesini otomatik olarak hesapladığı için cihazdaki veriler 3 tekrarlı olarak ölçülerek ortalaması alındı.



Resim 3. Otomatik hücre sayım cihazı ve Thoma lamı

3.2.5. Tümör Hücreleri Ortam Medyumlarının Elde Edilmesi

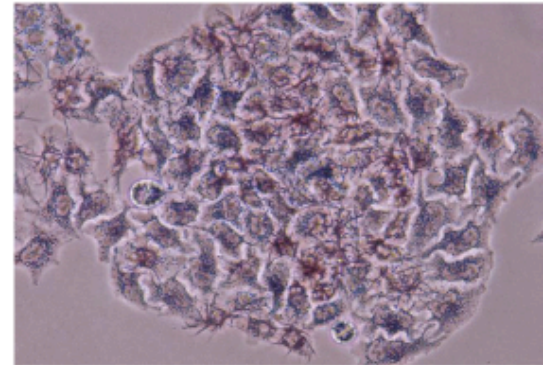
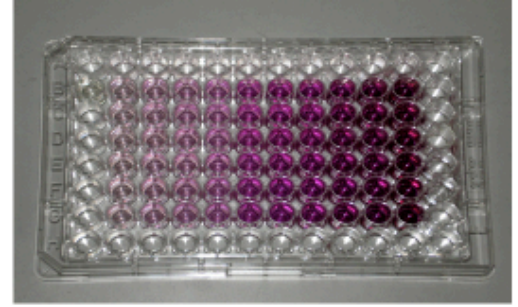
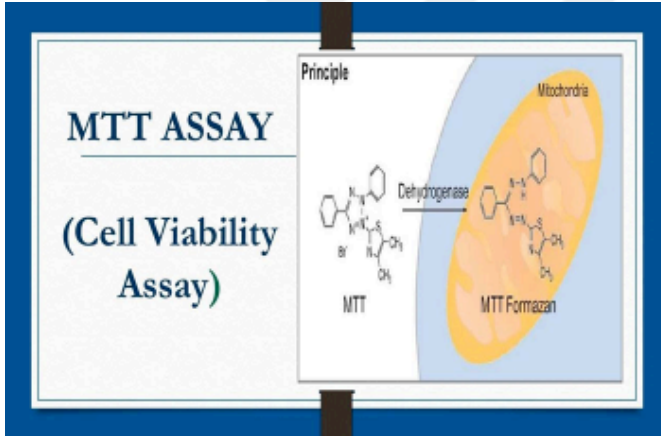
6 kuyucuklu plak içine yaklaşık 125.000 hücre ekilmiş olup, yaklaşık %80-90 doluluğa ulaştığında üstlerindeki FBS içeren medyum atılmıştır. Daha sonra FBS içermeyen medyum içinde çözünmüş olan OPN'nin farklı konsantrasyonlarını içeren medyumdan ilgili her kuyucuğa 600 µL eklenmiş olup, 48 saat sonunda hücrelerin üstündeki medyum toplanmış ve 0.22 mµ kalınlığında filtreden geçirilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere steril endorflara konulmuş ve dondurulmuştur.

3.2.6. MTT Deneyi ile Hücre Proliferasyonunun Saptanması

96 kuyucuklu plak içinde her kuyucukta 10.000 Ishikawa hücresi olacak şekilde 100 µl büyüme medyumunu olan Minimum Essential Medium Eagle Medium (MEM) içinde ekildi (Resim 5). Hücreler 37 °C'de % 5CO₂ içeren enkübatörde 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda medyum aspire edildi ve 100 µl serum içermeyen aynı medyum içinde hazırlanan OPN'nin farklı konsantrasyonlarını içeren (0, 100, 200, 300 ve 400 ng/mL) ve FBS içermeyen medyum ile hazırlanmış çözeltiler kuyucuklara eklendi. 24, 48 ve 72 saat sonra kuyucuklardaki medyum aspire edildi ve MTT çözeltisi (serum içermeyen medyum içinde 0.5 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış) 100 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Plaklar 2 saat 37 °C'de % 5 CO₂ enkübatörde bekledikten sonra (2-4 saat arası) kuyucukların dibinde formazan oluşumu gözle görülür hale gelmektedir (Resim 6). İki saatin sonunda kuyucuklardaki çözelti dikkatli bir şekilde alındı ve üzerine oluşan formazanın çözülebilmesi

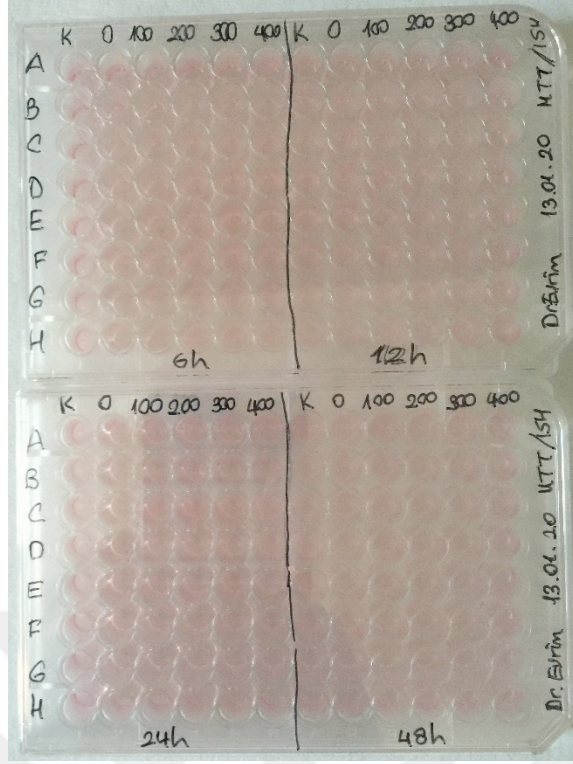
için 200 µl DMSO eklendi ve 15 dakika oda ısısında formazanın çözülmesi ve homojen dağılım sağlanması için mikropalak çalkalayıcıda çalkalandı. Bu sürenin sonunda mikropalak okuyucuda 570 nm’de absorbans okumaları yapıldı.

Çalışmamızda kontrol olarak sadece büyüme medyumunu içeren kuyucuklardaki Ishikawa hücrelerinin oluşturduğu rengin absorbansı ölçüldü (GM). Ayrıca, tezin örnek alındığı çalışmada 0 ng/mL OPN içeren bir çalışması da yapılmış olması nedeniyle, bir kuyucuğa da serum içermeyen (FBS) medyum çözeltisinden eklendi. Bu çalışmada iki kontrolün olması ise şöyle açıklanabilmektedir; bilindiği gibi hücreler büyürken mutlak suretle seruma ihtiyaç duymaktadırlar ve serum da tüm büyüme faktörlerini ve proteinleri içerdiği için, bir maddenin etkisinin değerlendirilebilmesi için serum içermeyen medyum ile çalışılan bir örneğin de dahil edilmesi gerekmektedir. OPN’nin tüm konsantrasyonları FBS içermeyen medyumlar ile hazırlanmıştır. Çalışmalar, aynı konsantrasyondaki maddeler ile 3 farklı gün 8 örnek ile tekrarlandı ve her bir maddenin hücre canlılığına olan etkisinin istatistiksel olarak gösterilebilmesi için 24 verinin ortalaması kullanıldı.

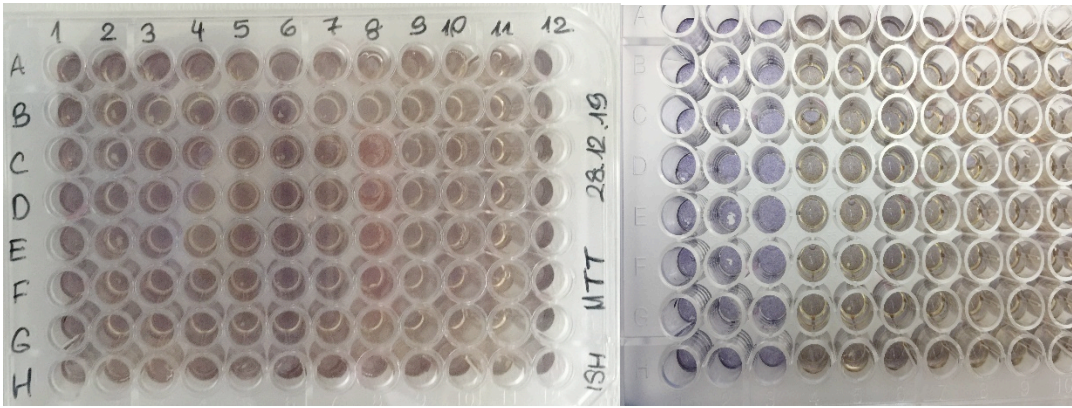


Canlı olan hücrelerin mitokondrisi boyayı almakta olup, oluşan bu renk spektrofotometrede ölçülmektedir. Hücre canlılığı azaldıkça renk azalmaktadır.

Resim 4. MTT hücre canlılığı deneyinin şematik olarak gösterilmesi



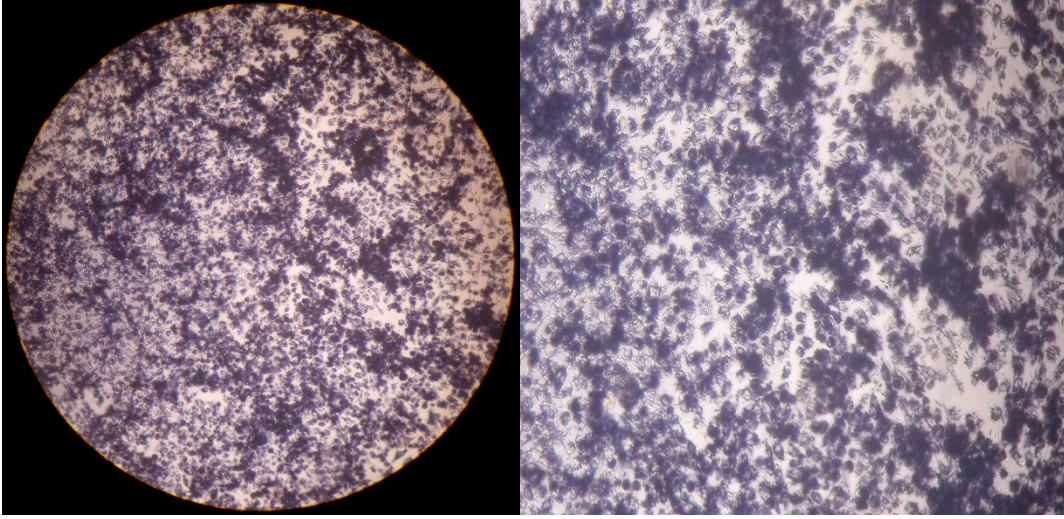
Resim 5. ISH hücrelerinin plağa ekilmiş hali



Resim 6. MTT çözeltisinin oluşturduğu formazan



Resim 7. HUVEC hücrelerinin plağa ekilmiş hali



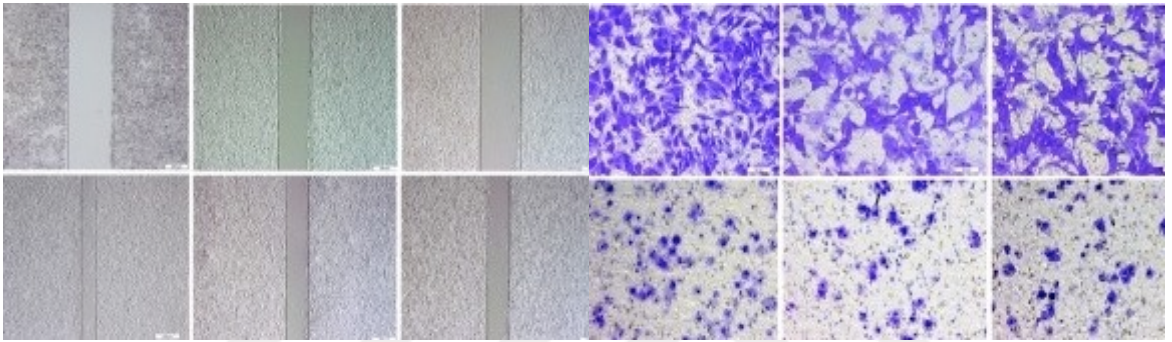
Resim 8. Formazan oluşumunun invert mikroskop görüntüsü



Resim 9. Hücre kültüründe kullanılan mikroplak okuyucu

3.2.7. Migrasyon (İnvazyon) Deneyi

Hücre migrasyonu ve invazyonu aslında çoğu zaman aynı çalışma için de kullanılan bir terim olmakla birlikte, bu iki terimi birbirinden farklı ele alan yayınlar da bulunmaktadır. Migrasyon hücre göçü anlamında kullanılmakta olup, farklı deneyler ile gösterilebilmektedir. Aynı şekilde, invazyon da hücrenin yayılımı yani bir anlamda göçü olup, yine aynı deneyler kullanılarak değerlendirilmektedir.

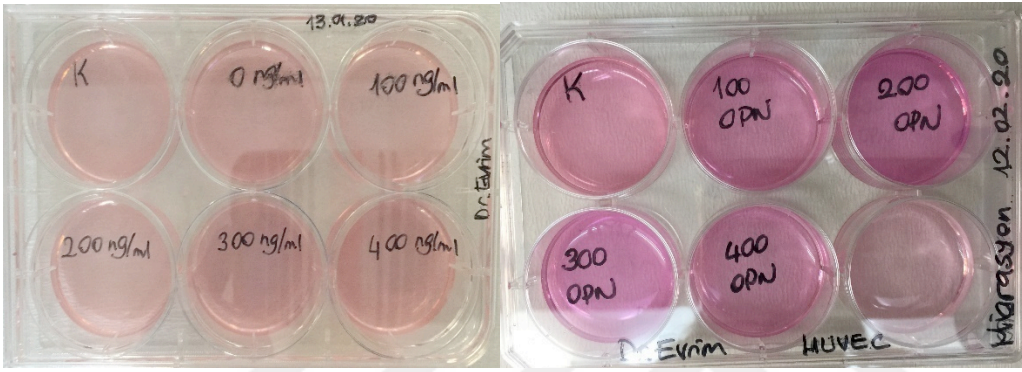


Resim 10. Migrasyon Deneyi (A) çizgi yöntemi; (B) insert kullanılmış

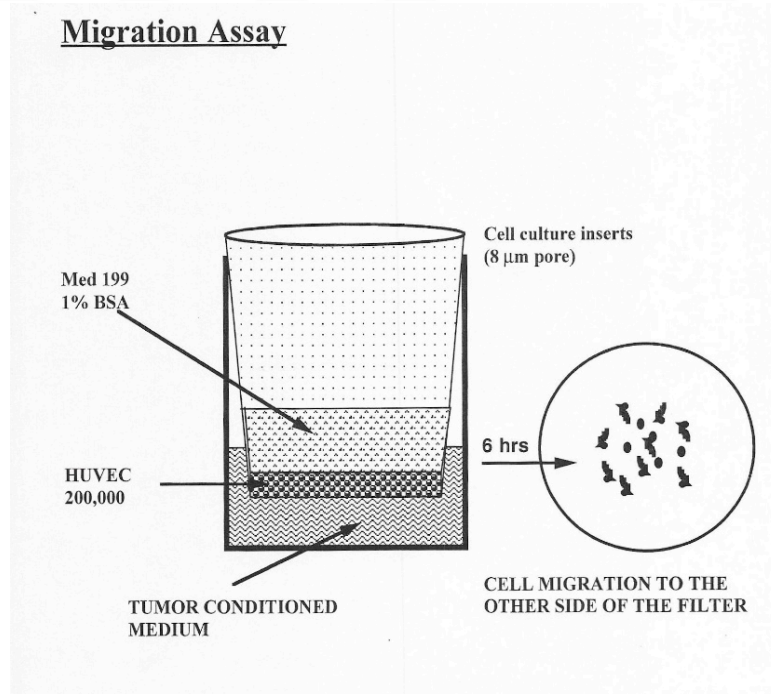
Bu deneyin amacı, maddelerin anjiyogenik ya da anti-anjiyogenik etkilerinin araştırılmasıdır. Bunun için 6 kuyucuklu plak içine hücreler ortalama 125.000 hücre olacak şekilde ekilirler. Kuyucuklar içindeki hücreler yaklaşık %90 sıklığa ulaştığında steril bir pipet ucu yardımı ile ortadan ikiye çizgi çekilir. Daha sonra OPN'nin farklı dozları eklenir ve her 12 saate bir kontrol edilir. Hücrelerin birbirlerine yaklaşması yani migrasyonu resimlendirilir. Biz en iyi sonucun geliştiği 48. saate kuyucuklardan resim aldık ve çalışmayı sonlandırdık.

İnsert (*altında süzgeç gibi çok küçük gözenekleri olan ve o hücreye özel por içeren süzgeç*) kullanılarak yapılan migrasyon çalışması HUVEC ya da farklı endotel hücreleri üzerinde daha çok gerçekleştirilen bir çalışma olup, buradaki amaç tümör hücrelerinden salgılanan büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin endotel hücrelerindeki göçü nasıl etkilediği ve metastaz oluşumuna olan katkısının araştırılmasıdır. 6 kuyucuklu plak içinde yapılan migrasyon çalışmalarında amaç, inhibitör ya da aktivatör maddenin tümör hücresi üzerindeki anti-tümöral etkilerinin gösterilmesidir.

Çalışmamız, HUVEC ve Ishikawa hücrelerini kullanarak OPN'nin hücreler üzerindeki proliferatif etkilerinin nasıl değiştiğinin araştırılmasıdır. HUVEC hücrelerinde migrasyonu değerlendirmek için OPN'nin en düşük ve en yüksek OPN dozu olan 400 ng/mL kullanılmıştır. Bilindiği gibi endotel hücreleri anjiyogenik bir madde etkisi ile önce proliferasyona uğramakta, sonra migrate etmekte, invazyon ve sonucunda yeni kan damarları oluşturmakta yani anjiyogeneze neden olmaktadır. Bu çalışmanın aynısı Ishikawa hücreleri ile yapılmış olup, OPN'nin (400 ng/mL) 48 saat sonraki migrasyondaki etkileri gösterilmiştir.



Resim 11. Migrasyon deneyi plağı

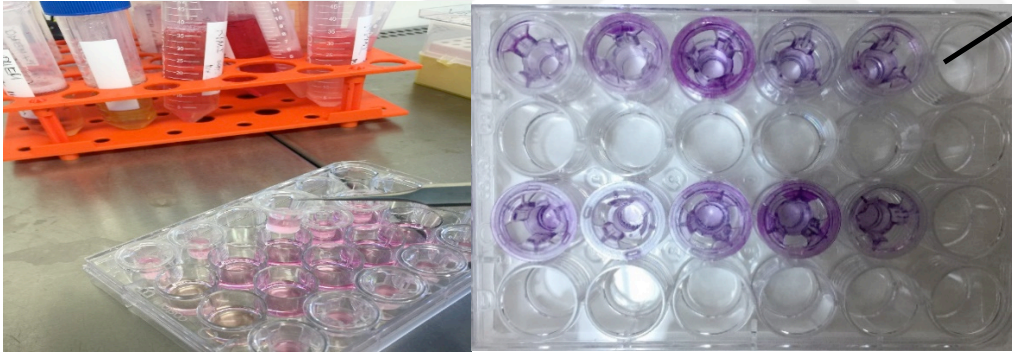


Şekil 6. Migrasyon deneyinin şematik olarak gösterilmesi

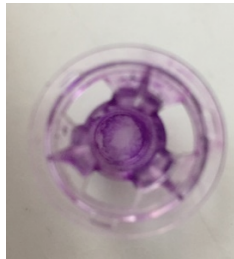
Öncelikle, 24 kuyucuklu plak içine yerleştirilmiş olan (Resim 12) 8 μm gözeneklere sahip insertin içine HUVEC hücreleri 200 μl büyüme medyumunda ekilmiş ve üzerine 200 μl daha Med199 + %1 BSA çözeltisi eklenmiştir. İnsertler 24 kuyucuklu plağa konmadan önce, kuyucuklara 100 ve 400 OPN ile enkübe edilmiş Ishikawa hücrelerinden elde edilen ortam medyumlarından 600 μl konmuş olup, insertler bu kuyucuklara yerleştirilmişlerdir. 6 saat sonra migrasyon gözlemlense de biz çalışma koşullarımızdan dolayı yaklaşık 12 saat sonra insertleri çıkardık. Çıkarılan insertler, önce 2 kez DPBS ile yıkandı, sonra taze hazırlanmış % 3.7'lik formaldehit ile 15 dk enkübe edildi ve tekrar 2 kez DPBS ile yıkandı ve Giemsa boyası ile 5 dk boyandı. Sonra, yaklaşık 20 dk oda sıcaklığında metanol ile hücreler fikse edildi ve tekrar 2 kez DPBS ile yıkandı. İnsertlerin içinde kalan ve gözeneklerden geçmemiş hücreler bir kulak pamuğu yardımı ile temizlendi ve farklı alanlardan resim çekildi.



Resim 12. Kuyucuklara insertlerin yerleştirilmiş hali



Resim 13. Migrasyon deney düzeni ve insertlerin boyanmış hali



Resim 14. Migrasyon deneyinde kullanılan insert

3.2.8. *In Vitro* Anjiyogenez (*In vitro* Tube Assay) Deneyi

In vitro anjiyogenez, başka bir deyişle *in vitro* tüpe benzer yapıların oluşturulması, yani insan vücudundaki damar yapılarının oluşmasının örneklenmesi, tümör ortam besiyeri kullanılarak endotel hücrelerinin (HUVEC) kapiller damarları oluşturması Grant ve ark., (2002) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

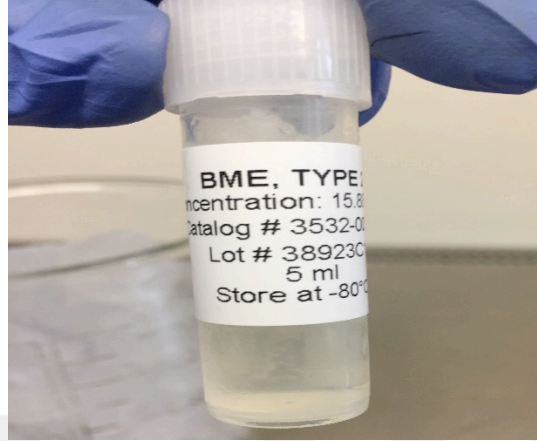
Bu denemede amacımız şöyle özetlenebilir;

Bilindiği gibi tümör hücreleri başta VEGF, bFGF, EGF olmak üzere çeşitli büyüme faktörleri salgılamakta ve tümör ortam medyumunda bu büyüme faktörleri bulunmaktadır. Grant ve ark., (2002) damar endotel hücrelerini bazal membrane matriks üzerine ekmişler ve bu hücrelerin hızlıca birbirlerine tutunduğunu, uzandığını ve kapiller damarlara benzer yapılar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bu hücreler çoğalmamakta olup, primer endotel hücrelerinin 6-20 saat içinde bu yapılarını tamamladığını göstermişlerdir. Kapiller tüp yapılarının oluşması sadece endotel hücrelerine özgü bir durum olup, diğer hücre tipleri farklı yapılar oluşturmaktadırlar. Farklı dokulardan endotel hücreler elde edilebilmektedir. Bu tüp yapılarının oluşması aynı zamanda ölçülebilir olup (tüp yapılarının uzunluğu, tüp dallanma bölgelerinin sıklığı v.b) bu yöntem ile anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin damar oluşmasında ve tümörlerin yayılım göstermesindeki etkilerinin anlaşılmasında, anjiyogenezdeki etkili mekanizmaların anlaşılmasında iyi bir model oluşturduğu belirtilmiştir. Bu model sistemi *in vitro* olarak damar oluşumlarının gösterilmesinde kullanılmaktadır (Auerbach ve ark., 2003; Kleinman ve Martin 2005).

Çeşitli çalışmalar hücrelerin bazal membran ile temas halinde olduklarında diferansiyasyona uğradıkları gösterilmiştir. Endotel hücreleri tüpe-benzer yapılar oluşturmakta ve bu morfolojik diferansiyasyon anjiyogenik ve anti-anjiyogenik bileşiklerin etkilerini incelemek için hızlı ve güvenilir bir test olmaktadır. Tüp oluşumu 16-18 saat içinde tamamlanmaktadır. Hücreler başlangıçta ekildikleri yerden hareket ederler, tekrar düzenlenirler ve birbirleri ile birleşirler. Hücreler aynı zamanda lateral hücre-hücre etkileşimi göstermekte olup, silindirik bir yapı göstermekte ve tıpkı damar oluşumuna benzemektedirler. Bu multisellüler oluşum “tüp oluşumu (tube-formation)” olarak adlandırılmaktadır.

Hazır ticari olarak satılan bazal membran -20°C’de donmuş bir halde bulunmakta olup, +4°C’de sıvı halde, 37°C’de ise katı jel hale dönüşmektedir. Bu nedenle, 24 kuyucuklu plak ile çalışırken plaklar ve pipet uçları daha önceden buzdolabında soğutulmuştur. Matrigel oda

ısısında katı hale başladığından ve 37 °C’de katı bir jel haline geçtiğinden ve bu halden sonra tekrar sıvı hale geçemediğinden, çalışma buz içinde gerçekleştirilmiş, plaklar daha sonra enkübasyona bırakılmıştır.



Resim 15. Ticari olarak satılan Basal Membran Ekstraktı (Matrigel)

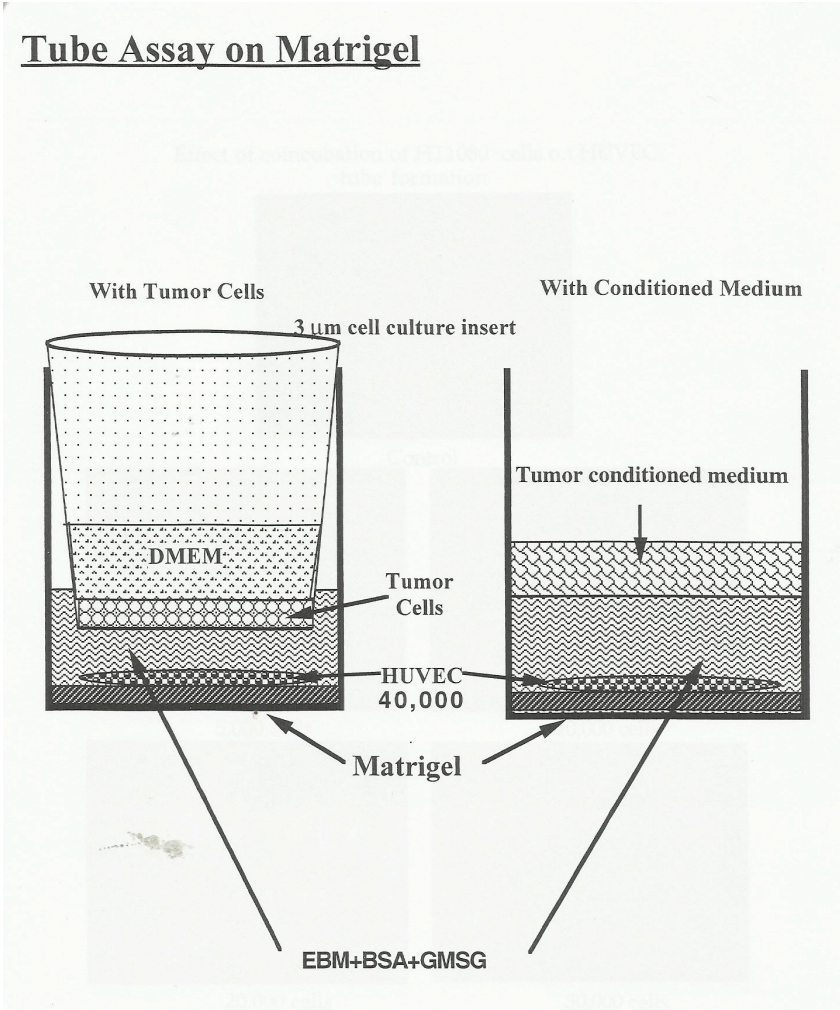
Çalışmamızda ticari olarak satın alınan aşağıdaki maddeler kullanılmıştır;

1. EBM (endotelyal bazal medium)
2. BSA (bovine serum albumin)
3. ITS (Insülin/Transferrin/Selenium). Insulin polipeptid yapısında bir hormon olup, hücrelerin glukozu almasını teşvik etmekte ve mitogen olarak etki etmektedir. Transferrin, demir taşıyıcı bir protein olup, demir gerekli bir iz elementtir, fakat serbest haldeki hali toksik olabilmektedir. Bu nedenle serumda bunun bağlı formu olan transferrin kullanılmaktadır. Selenyum da, bir iz element olup, normal halde vücutta serumda bulunmakta ve hücreleri desteklemektedir.

HUVEC hücreleri ile tüp yapıların oluşturulması

1. 96 kuyucuklu plaklarda belirlenen kuyucuklara 50 µl matrigel kondu
2. Plak 30 dakika 37°C’de/%5 CO₂’li etüvde enkübasyona bırakıldı.
3. Enkübasyon sonunda kuyucuklara 200 µl serum içermeyen besiyeri (EBM çözeltisi içinde %1 BSA ve %1 ITS) kondu.

4. Hemen ardından kuyucuklara 100 µl M199 çözeltisi içinde yaklaşık 30,000 HUVEC hücresi ekildi.
5. Bir saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde enkübasyondan sonra kuyucuklara daha önce tümör hücrelerinden elde edilen Ishikawa hücresi (OPN içeren ve içermeyen) ortam medyumlarından 100 µl kondu.
6. Plak 37°C'de %5 CO₂'li etüvde 16 saat enkübasyondan sonra besiyeri dikkatlice döküldü ve invert mikroskopta resimleri çekildi.



Şekil 7. *In vitro* tüpe benzer yapıların oluşturulduğu deney düzeni

3.2.9. Tümör Hücreleri Ortam Medyumunda PI3K ve ERK1/2 Moleküllerinin Saptanması

Tümör hücreleri ortam medyumunda (conditioned medium, CM) tüm belirleyicilerin düzeyleri ticari olarak satılan human ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kitleri ile saptanmıştır. Örnekler antijen kaplı plağın kuyucuklarına konmakta, 37 °de enkübe edilmekte, daha sonra antikor eklenmektedir. Yıkama basamaklarından sonra substrat solüsyonu eklenir ve mavi renkler oluşuktan sonra reaksiyonu sonlandırıcı reaktif eklenmekte ve oluşan sarı renk mikropalak okuyucuda (ELx800) 450 nm'de okunmaktadır. Örneklerdeki, konsantrasyonlar kitin içinden çıkan standartlar yardımı ile cihaz tarafından çizilen grafikten otomatik olarak hesaplanmaktadır.

Kitin içinden çıkan standart kullanılarak, ELISA okuyucusunda otomatik olarak grafikler çizdirilmiş ve grafiklerin R değerleri PI3K için R-Square= 0.9997 ve ERK1/2 için R-Square= 1.000 olması testin hassas ve tekrarlanabilir sonuç verecek şekilde çalışıldığının bir kanıtı olmaktadır.

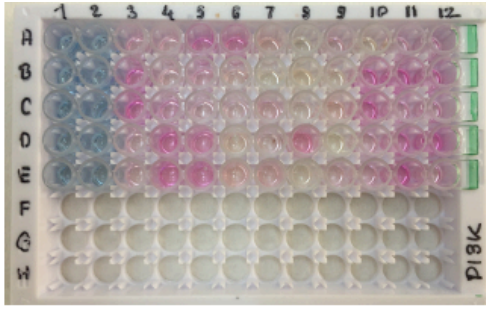


Plaklar 37°C'de enkübe edildi

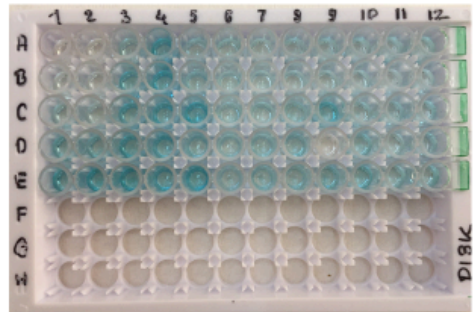


Plakların okunduğu mikropalak okuyucu

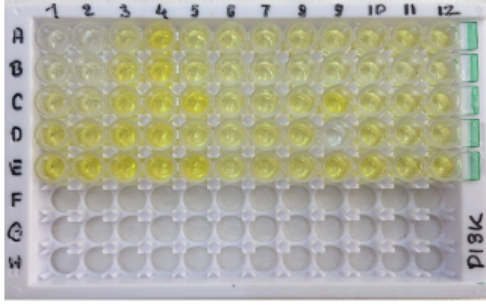
Resim 16. ELISA'da kullanılan enkübatör ve mikropalak okuyucu



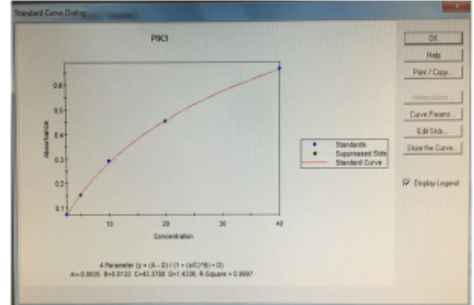
Antikor kaplı plaklara ortam medyumunu eklendi



Örneklere substrat çözeltisi eklendi



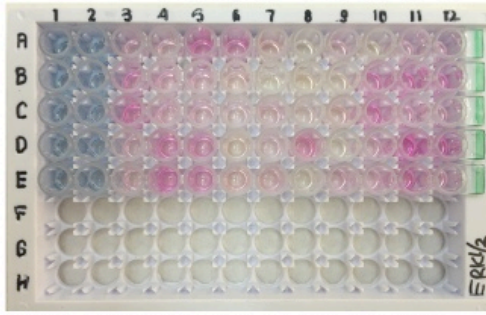
Stop solüsyonu eklendiğinde oluşan sarı renk 450 nm'de ölçüldü



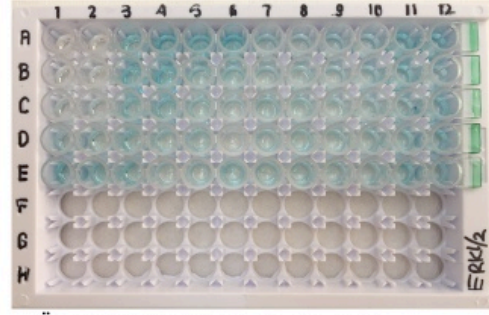
Standart eğriden sonuçlar saptandı

Resim 17. PI3K molekülünün ELISA deneyi resimleri

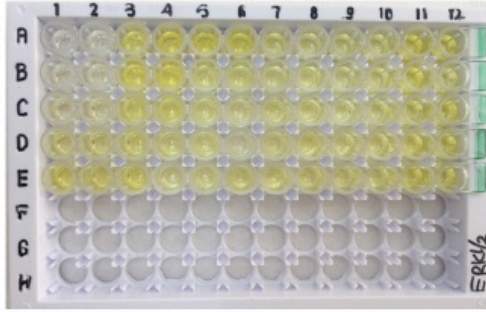
Hücre ortam medyumlarında PI3K (Phosphotylinosital 3 Kinase) düzeylerinin saptanması için ticari olarak satılan Human ELISA kiti kullanıldı (Bioassay Technology Laboratory, Katalog No: E-0896Hu). Testin sensitivitesi 0.13 ng/mL, saptama aralığı (standart eğrinin aralığı) 0.2-70 ng/mL olarak verilmiştir.



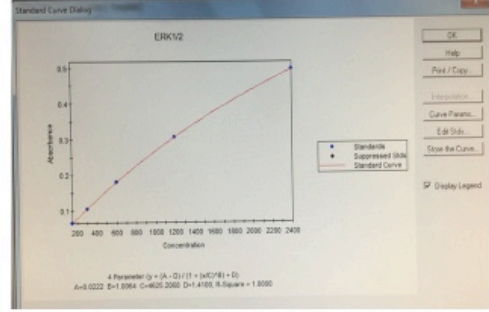
Antikor kaplı plaklara ortam medyumunu eklendi



Örneklere substrat çözeltisi eklendi



Stop solüsyonu eklendiğinde oluşan sarı renk 450 nm'de ölçüldü



Standart eğriden sonuçlar saptandı

Resim 18. ERK1/2 molekülünün ELISA deneyi resimleri

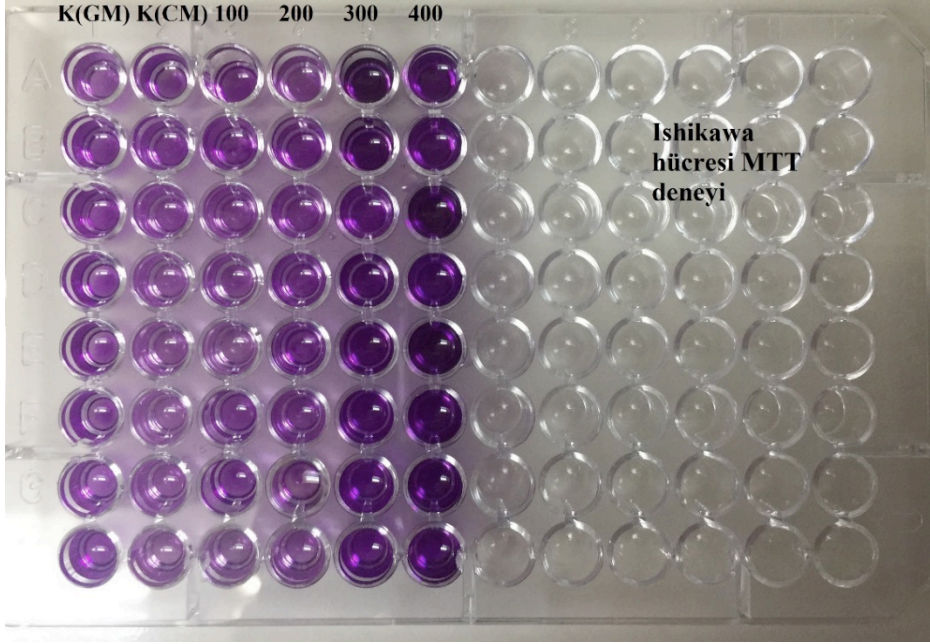
Hücre ortam medyumlarında ERK1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2) düzeylerinin saptanması için ticari olarak satılan Human ELISA kiti kullanıldı (Bioassay Technology Laboratory, Katalog No: E-4633Hu). Testin sensitivitesi 10.98 ng/mL, saptama aralığı (standart eğrinin aralığı) 20-4000 ng/mL olarak verilmiştir.

3.2.10. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25 (Released 2017, Armonk, NY: IBM Corp.) paket programında gerçekleştirildi. Nümerik değişkenlerin Normal Dağılıma uyumları, Tek Yönlü Varyans Analizinden elde edilen artık değerler üzerinden kontrol edildi. Bu amaçla yöntem olarak Kolmogorov-Smirnov ($n > 50$) yada Shapiro-Wilk ($n < 50$) Testi kullanıldı. Varyans homojenliği Levene Test ile incelendi. OPN (ng/mL) düzeyleri arasında çoklu karşılaştırmalar için F (varyanslar homojen ise) yada Welch (varyanslar homojen değil ise) istatistiği kullanıldı. İkili karşılaştırmalar Tukey HSD (F-Test sonrası) yada Dunnett T3 (Welch Test sonrası) yöntemleri ile gerçekleştirildi. Tüm hipotez testleri $\alpha = 0.05$ önem seviyesinde uygulandı.

4. BULGULAR

4.1.Hücre Proliferasyonu Sonuçları



Resim 19. Ishikawa hücrelerinin OPN etkisi ile proliferasyonunun gösterilmesi

Plaklardaki sıraların açıklaması şöyledir; K (GM): Kontrol olup Ishikawa hücreleri normal FBS içeren büyüme medyumunda büyütülmektedirler; K (CM): İkinci kontrol olup, yine Ishikawa hücreleri büyütülmüştür, fakat içinde hem FBS hem de OPN yoktur; 100, 200, 300 ve 400 ng/mL OPN olup, eklenen OPN miktarlarını göstermektedir.

Resimden de görüldüğü üzere Ishikawa hücreleri üzerinde OPN'nin etkisinin 300 ve 400 ng/mL'deki dozlarda daha etkili olarak göstermiştir. Bunu da, şöyle yorumluyoruz. Tümör hücreleri malign özellikte olmasından dolayı her ne kadar çoğu epitelyal formda olduğunu düşünsek de, transformasyona uğramış hücreler olup, OPN'nin daha düşük dozlarda bu hücrelerin proliferasyonunu arttırmasını beklemiyorduk.

Tablo I. ISH hücresi + OPN proliferasyon sonuçları

OPN Konsantrasyonu (ng/mL)	48. saat (Ortalama değer ± SD)
Kontrol (GM)	0.147 ± 0.035 ^a
0	0.153 ± 0.028 ^b
100	0.182 ± 0.022 ^c
200	0.536 ± 0.022 ^d
300	1.269 ± 0.146 ^e
400	2.804 ± 0.514 ^f

p<0.001 a ile d,e ve f kıyaslandığında

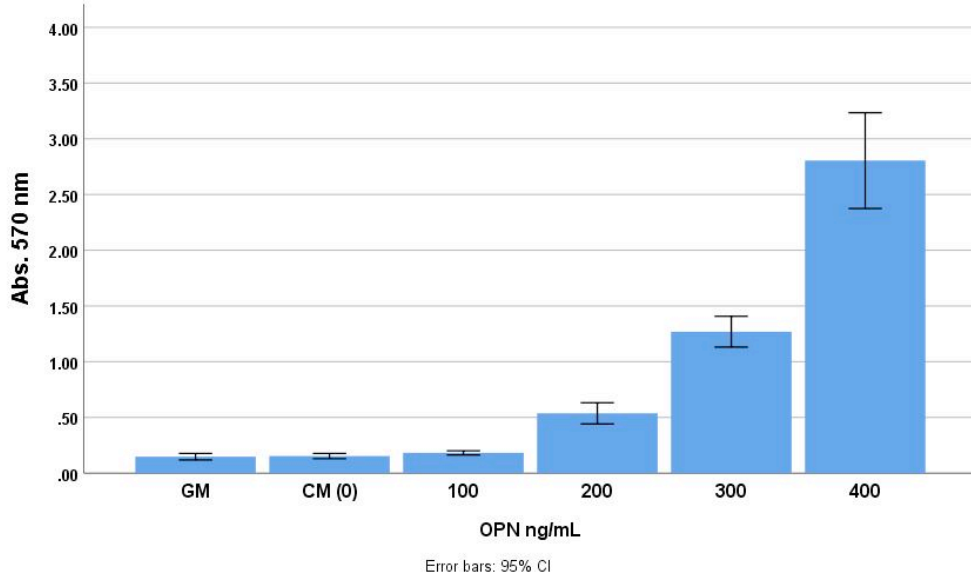
p<0.001 b ile d,e ve f kıyaslandığında

p<0.001 c ile d,e ve f kıyaslandığında

p<0.001 d ile e ve f kıyaslandığında

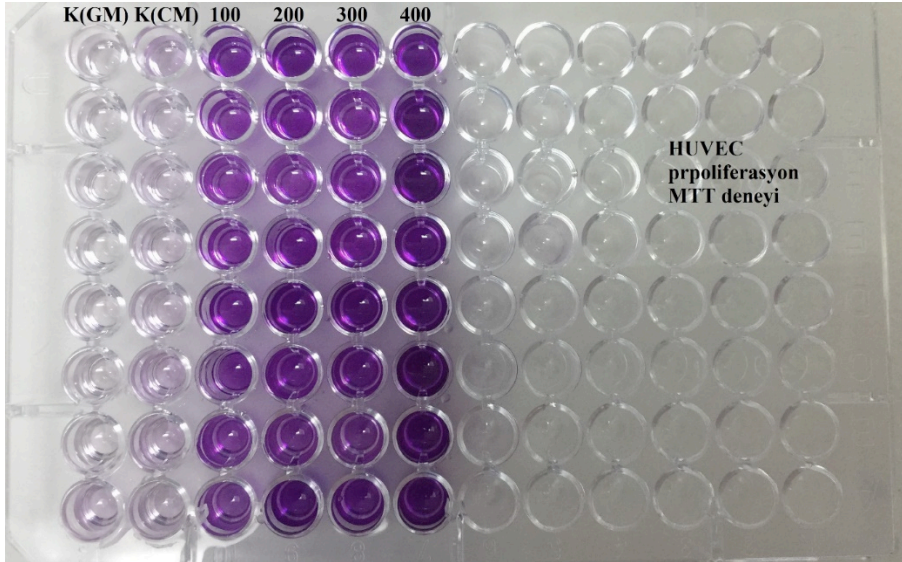
p<0.001 e ile f kıyaslandığında

Tablodan da görüleceği üzere Ishikawa hücreleri üzerinde OPN'nin etkileri incelendiğinde, kontrol ve hiç OPN eklenmeyen gruplar ile 200, 300 ve 400 ng/ml OPN verilen gruplar arasındaki ortalama değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Yine, 100 ng/mL OPN eklenen grup ile 200, 300 ve 400 ng/mL OPN eklenen grup arasındaki fark, 200 ng/mL OPN eklenen grup ile 300 ve 400 ng/mL OPN eklenen grup arasındaki fark ve 300 OPN eklenen ile 400 OPN eklenen grup arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.



Grafik 1. ISH hücrelerinde OPN'nin proliferasyona etkisinin grafiksel gösterilişi

Bu nedenle, endotel hücrelerinde bu çalışmanın tekrarlanması ve OPN'nin malign transformasyona uğramamış ama anjiyogenez oluşumunda en önemli hücreler olan primer epitel hücrelerdeki dönüşüme etkisini araştırmak istedik. Bunun için, insan göbek kordonu ven hücresi olan ve *in vitro* anjiyogenezin modellenmesinde sıklıkla kullanılan bir hücre dizisi olarak HUVEC ile çalıştık.



Resim20. HUVEC hücrelerinin OPN etkisi ile proliferasyonunun gösterilmesi

Plaklardaki sıraların açıklaması şöyledir; K (GM): Kontrol olup HUVEC hücreleri normal FBS içeren büyüme medyhumunda büyütülmektedirler; K (CM): İkinci kontrol olup, yine HUVEC hücreleri büyütülmüştür, fakat içinde hem FBS hem de OPN yoktur; 100, 200, 300 ve 400 ng/mL OPN olup, eklenen OPN miktarlarını göstermektedir.

Tablo II. HUVEC+ OPN proliferasyon sonuçları

OPN Konsantrasyonu (ng/mL)	48. saat (Ortalama değer ± SD)
Kontrol (GM)	0.059 ± 0.008 ^a
0	0.063 ± 0.011 ^b
100	0.635 ± 0.103 ^c
200	0.675 ± 0.115 ^d
300	1.358 ± 0.216 ^e
400	2.536 ± 0.622 ^f

p<0.001 a ile c, d,e ve f kıyaslandığında

p<0.001 b ile c, d,e ve f kıyaslandığında

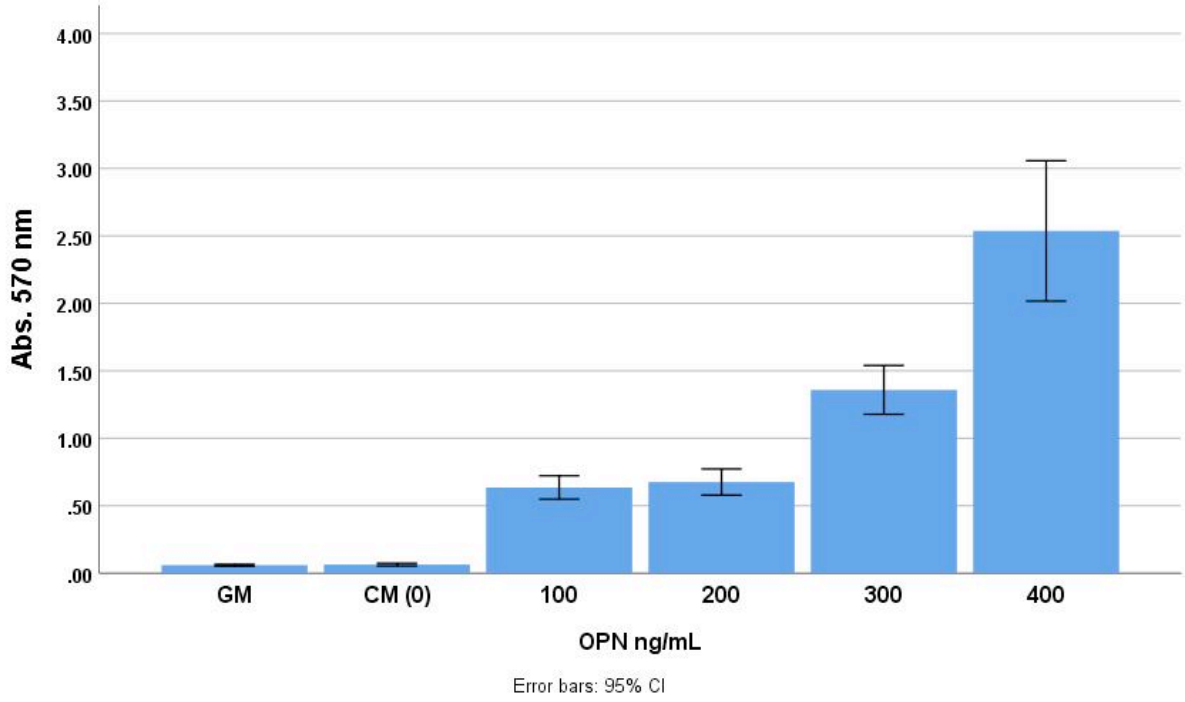
p<0.001 c ile e ve f kıyaslandığında

p<0.001 d ile e kıyaslandığında

p<0.01 d ile f kıyaslandığında

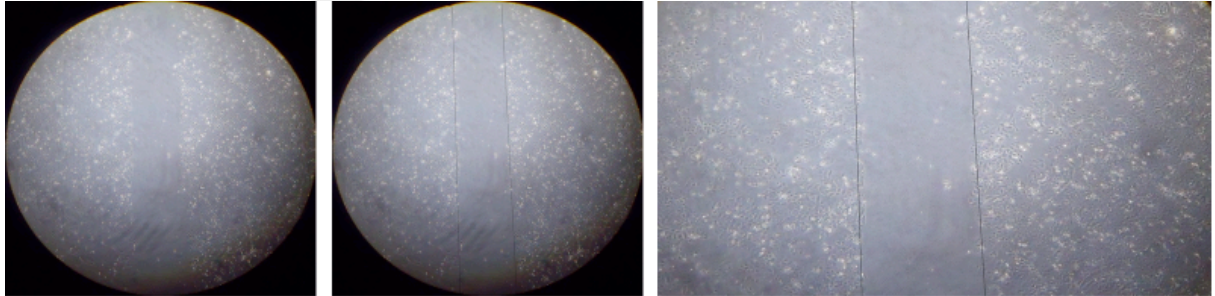
p<0.01 e ile f kıyaslandığında

Tablodan da görüleceği üzere HUVEC hücreleri üzerinde OPN'nin etkileri incelendiğinde, kontrol ve hiç OPN eklenmeyen gruplar ile 200,300 ve 400 ng/ml OPN verilen gruplar arasındaki ortalama değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Yine, 100 ng/mL OPN verilen grup ile 300 ng/mL OPN verilen grup arasındaki fark, 200 ng/mL OPN verilen grup ile 300 ve 400 ng/mL OPN verilen gruplara arasındaki fark ve 300 ng/mL OPN verilen grup ile 400 ng/mL OPN verilen grup arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

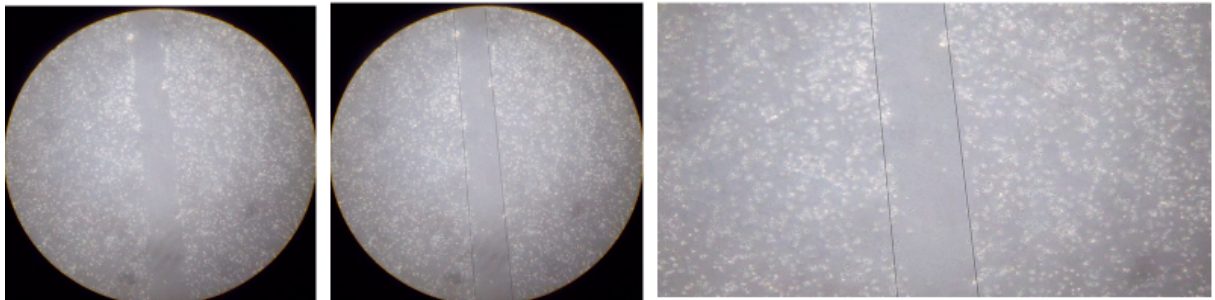


Grafik 2. HUVEC hücrelerinde OPN'nin proliferasyona etkisinin grafiksel gösterilişi

4.2.Migrasyon (İnvazyon) Deneyi Sonuçları



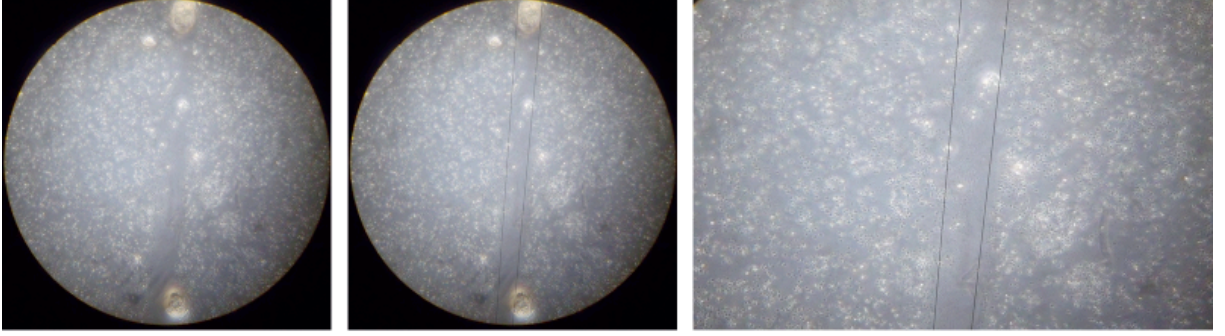
Ishikawa Kontrol 0. saat



Ishikawa Kontrol 48. saat

Resim 21. ISH (kontrol) hücrelerinin migrasyonu

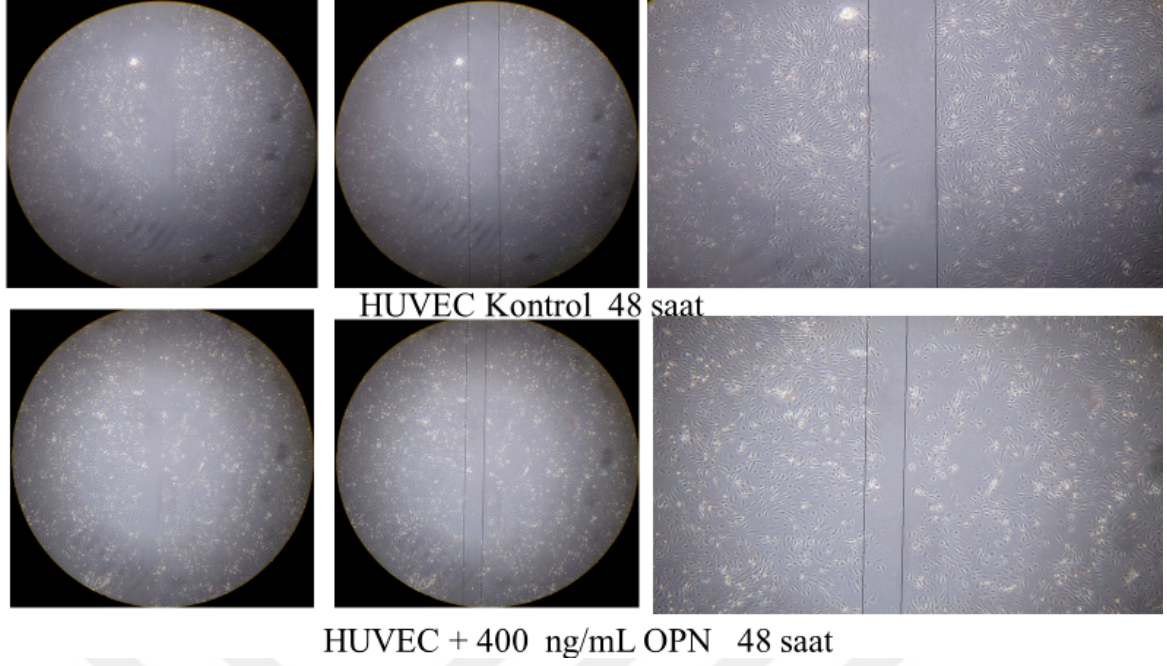
Resimden de görüldüğü üzere, işaretlenen çizgiler dikkate alındığında 0. Saat ile 48. Saat arasında Ishikawa hücrelerinin pipet ucu ile yaptığımız açıklığı kapatmaya çalıştığı ve hücrelerin göç ettiği görüyoruz. Kaldı ki, tümör hücreleri için bu beklenen bir durum olup, tümör hücreleri göç etme ve yayılım gösterme kapasitesine sahip oldukları için bu beklenen bir durumdur. Laboratuvarımızda kamera sistemimizde bu açıklığı ölçebilecek yazılım olmaması nedeniyle aradaki mesafe rakamsal değer olarak verilememiştir.



Ishikawa + OPN 400 ng /mL 48. saat

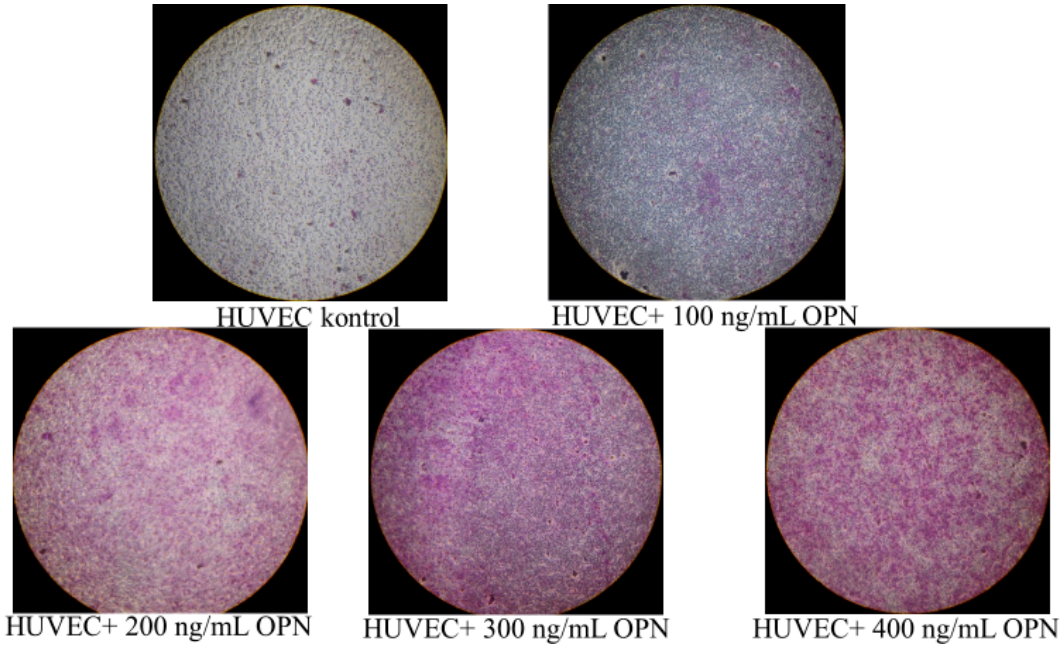
Resim 22. ISH hücrelerinin migrasyonuna OPN (400 ng/mL) etkisi

Ishikawa hücrelerine 400 ng/mL OPN eklendiğinde 48. saat sonunda aradaki mesafenin çok daha fazla kapandığını, başka bir deyişle hücrelerdeki göçün arttığı gösterilmiştir. Bu durum OPN'nin hücrelerde maligniteyi arttırdığını ve mezenkimal dönüşümü teşvik ettiğini göstermektedir.



Resim 23. HUVEC hücrelerinin migrasyonuna OPN (400 ng/mL) etkisi

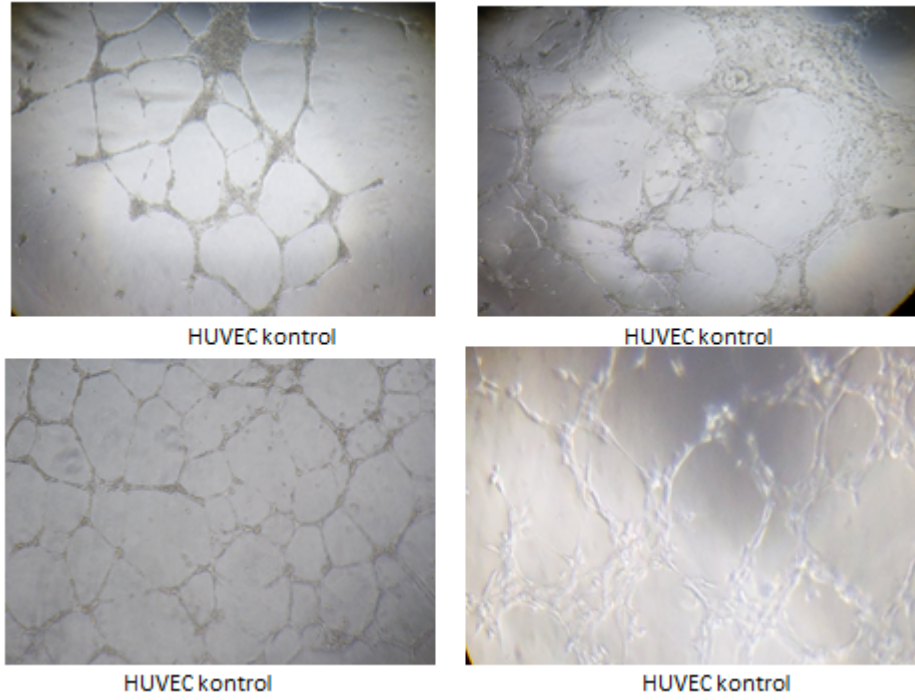
OPN'nin farklı dozlarının HUVEC hücrelerinin migrasyonuna etkisi araştırıldığında; kontrol yani hücrenin kendi medyumunu içeren ve OPN eklenmemiş durumda hücrelerde 48 saat sonra bir göçün olmadığı, fakat 400 ng/mL OPN eklendiğinde hücrelerin göçlerinin arttığı mezenkimal dönüşümün tetiklendiği görülmektedir.



Resim 24. İnsert kullanılarak yapılan HUVEC migrasyon deneyi

HUVEC hücresi ile yaptığımız diğer migrasyon deneyinde ise, hücre sayılarının kamera sisteminde yazılım olmaması nedeni ile sadece resimler ile değerlendirme yapılabilmektedir. Fotoğraflardan görüldüğü üzere OPN eklenmeyen kendi büyüme medyumunu ile ektiğimiz HUVEC kontrol grubunda hücrelerin hemen hiç migrasyona uğramadığı görülmektedir. Hücrelerin insertlerin gözeneklerinden geçip migrasyona uğradığı, insertlerden çekilen resimden gözlenmektedir. OPN'nin en düşük konsantrasyonu olan 100 ng/mL düzeyinde dahi insertlerden çekilen görüntülerde hücrelerin olduğu saptanmıştır. Böylece, OPN'nin endotel hücrelerinde göçü stimüle ettiği ve anjiyogenezi yani yeni kan damarlarının oluşumunu tetikleyebileceği ve böylece metastaz oluşumuna katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

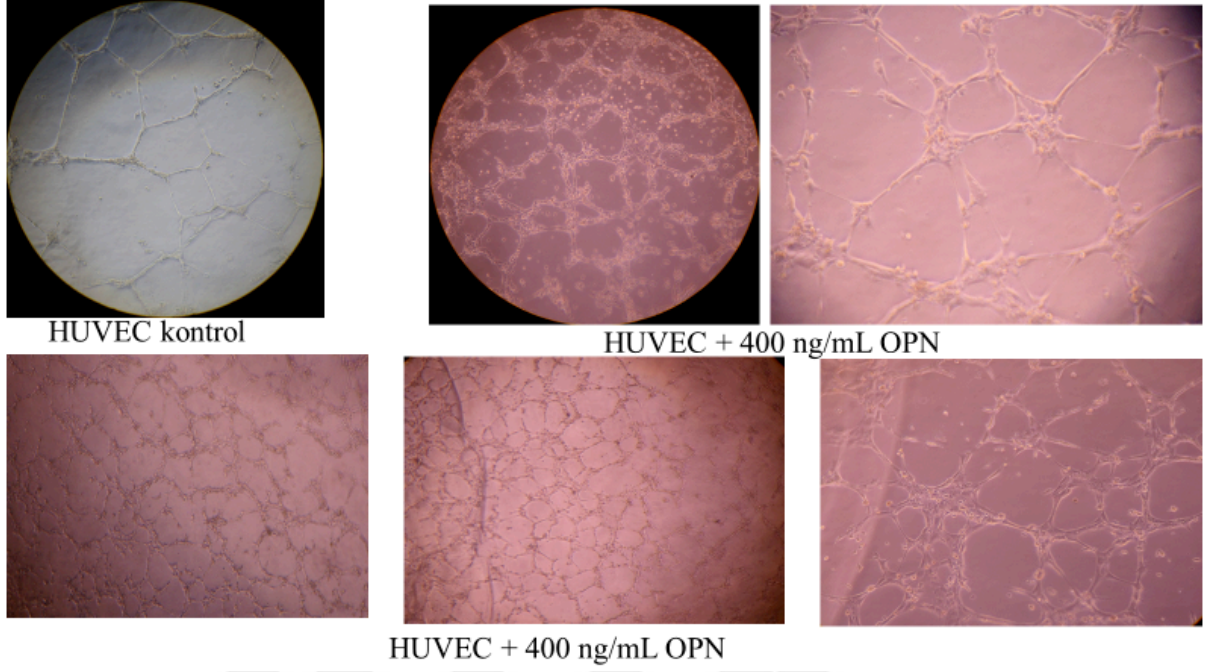
4.3. *In vitro* Tüp Oluşumu (Angienez) Sonuçları



Resim 25. HUVEC (Kontrol); OPN eklenmeden tüp yapılarının oluşması

HUVEC hücreleri, endotel hücreleri olup Matrigel üzerinde (ötantik bazal membran) 16-18 saat içinde tıpkı kan damarları gibi tüpe benzer yapılar oluşturmakta olup, bu deney *in vitro* anjiyogenezi olarak adlandırılmakta ve ilaç araştırmalarında, maddelerin anti-tümoral

etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Yukarıdaki resimde HUVEC hücrelerinin Matrigel üzerinde 16-18 saat sonraki oluşturduğu tüp yapılarını göstermektedir.



Resim 26. HUVEC hücrelerine 400 ng/mL OPN eklendikten sonra anjiyogenez

Yukarıdaki resimlerden de anlaşılacağı üzere, HUVEC hücrelerinin kendi medyumunda büyüdüğü kontrol kuyucuğundan çekilen resimlerde oluşan tüp yapıları ve 400 ng/mL OPN eklendikten sonraki oluşan tüp yapıları karşılaştırılmıştır. Diğer 5 resimde tüp yapılarının sıklığının ve dallanma noktalarının arttığı gösterilmiştir. Böylece OPN'nin kullandığımız en yüksek dozunda HUVEC hücrelerinde oluşan tüp yapılarının sıklığını başka bir deyişle anjiyogenezi arttırdığı, yani metastaz oluşumuna katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

4.4. PI3K ve ERK1/2 sinyal moleküllerinin ELISA testi sonuçları

Ishikawa hücrelerinin OPN molekülünün farklı konsantrasyonları ile muamele edilmesinden sonra elde edilen ortam medyumlarında ELISA yöntemi ile saptanan PI3K ve ERK1/2 sinyal moleküllerinin sonuçları Tablo 3. özetlenmiştir.

Tablo III. ISH hücresi ortam medyumunda sinyal moleküllerinin değerlendirilmesi

OPN Dozu (ng/mL)	PI3K (ng/mL) Mean ± SD	ERK1/2 (ng/mL) Mean ± SD
ISH (GM)	11.67 ± 2.29 ^a	1128.8 ± 72.92 ^g
0	11.61 ± 2.15 ^b	1126.4 ± 78.99 ^h
100	14.90 ± 2,47 ^c	1554.2 ± 209.7 ⁱ
200	21.75 ± 3.63 ^d	2038.2 ± 705.1 ^j
300	22.87 ± 3.14 ^e	2154.5 ± 384.4 ^k
400	30.82 ± 3.91 ^f	2920.9 ± 466.4 ^l

Her bir sütun bir sinyal molekülünü temsil etmekte olup kendi içerisinde yukarıdan aşağıya doğru OPN dozları arasındaki artışa bağlı olarak değerlendirilmiştir.

Her bir satır farklı bir OPN dozunu ifade etmektedir.

p<0.001 a ile d,e ve f kıyaslandığında

p<0.001 b ile d,e ve f kıyaslandığında

p<0.001 c ile d,e ve f ile kıyaslandığında

p<0.001 d ile f kıyaslandığında

p<0.001 e ile f kıyaslandığında

p<0.01 g ile i kıyaslandığında

p<0.05 g ile j kıyaslandığında

p<0.001 g ile k ve l kıyaslandığında

p<0.01 h ile i kıyaslandığında

p<0.05 h ile j kıyaslandığında

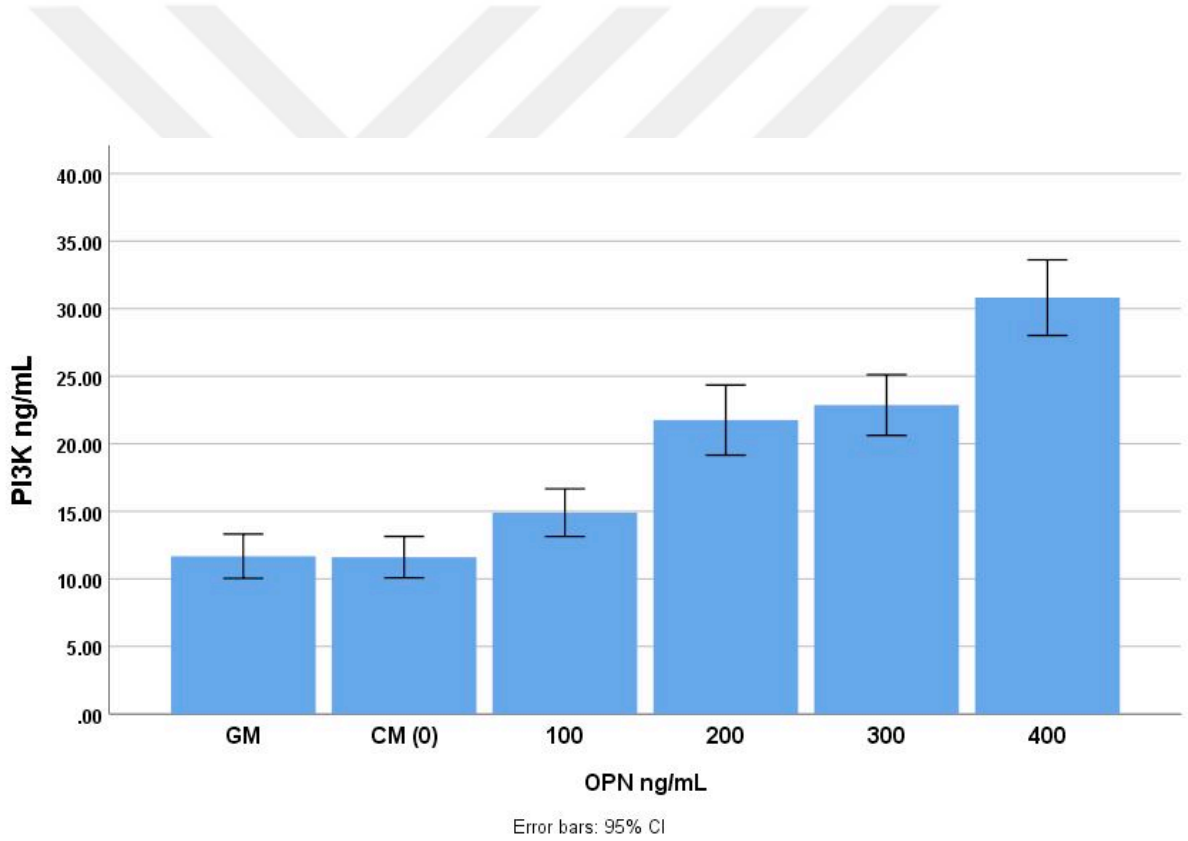
p<0.001 h ile k ve l kıyaslandığında

p<0.01 i ile k ile kıyaslandığında

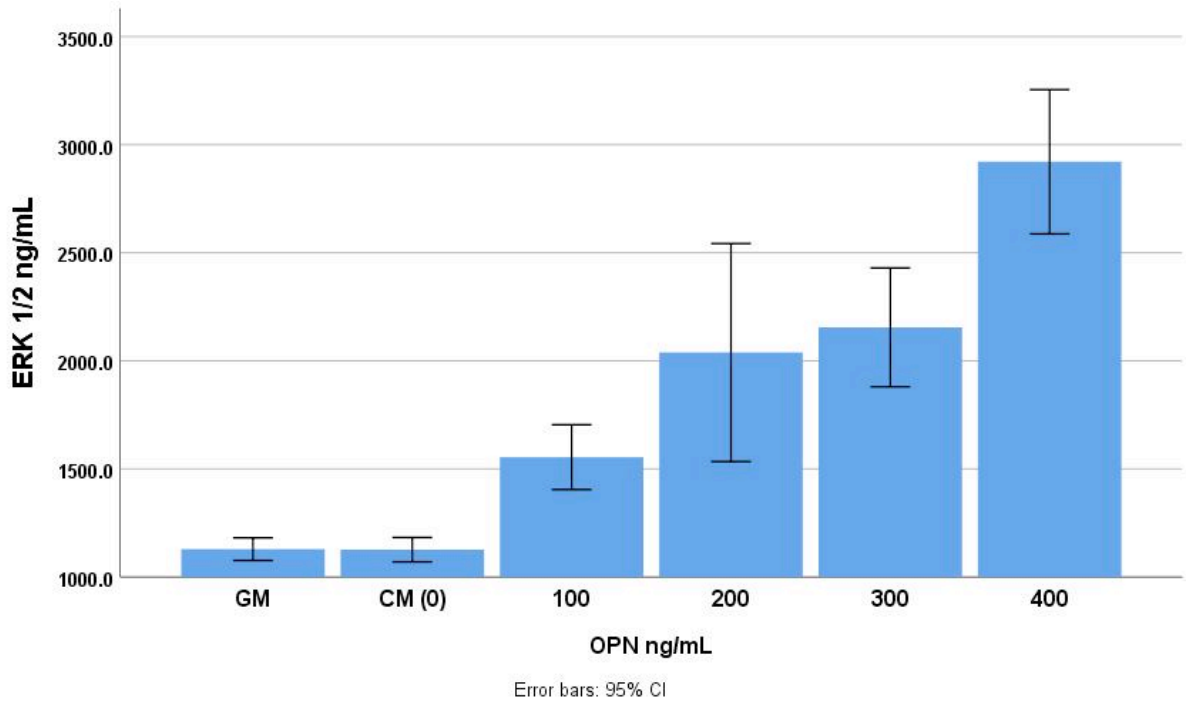
p<0.001 i ile l kıyaslandığında

p<0.05 k ile l kıyaslandığında

Tablodan görüleceği üzere kontrol medyumunu (FBS içeren) ve OPN içermeyen (FBS içermeyen) ikinci kontrol medyumunu ile 200, 300 ve 400 ng/mL OPN eklenen kuyucuklardan elde edilen medyumlardaki PI3K ve ERK1/2 moleküllerinin ortalama değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu, OPN içeren gruplarda PI3K sinyal molekülünde önemli ölçüde artış olduğu saptanmıştır. Yine, 100 ng/mL OPN içeren kuyucuk ile 200, 300 ve 400 ng/mL OPN içeren kuyucukdaki sinyal molekül düzeyleri karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu, dozun artmasına bağlı olarak PI3K molekülünün miktarının arttığı görülmektedir. Bu molekülün artış düzeyi ile MTT yani OPN'nin hücrelerin proliferasyonuna olan etkisi ile sonuçlarımız tutarlılık göstermiş ve birbirini destekler niteliktedir.



Grafik 3. ISH hücresi ortam medyumlarında PI3K düzeylerinin grafiksel gösterilişi



Grafik 4. ISH hücresi ortam medyumlarında ERK1/2 düzeylerinin grafiksel gösterilişi

Tablo IV. HUVEC ortam medyumunda sinyal moleküllerinin değerlendirilmesi

OPN Dozu (ng/mL)	PI3K (ng/mL) Mean ± SD	ERK1/2 (ng/mL) Mean ± SD
HUVEC (GM)	9.87 ± 0.58 ^a	912.8 ± 110.9 ^g
0	10.02 ± 1.15 ^b	910.4 ± 203.41 ^h
100	11.97 ± 2,85 ^c	2092.7 ± 647.25 ⁱ
200	20.25 ± 3.58 ^d	2830.4 ± 499.11 ^j
300	28.94 ± 4.18 ^e	2840.11 ± 497.77 ^k
400	32.75 ± 3.46 ^f	4038.22 ± 904.81 ^l

Her bir sütun bir sinyal molekülünü temsil etmekte olup kendi içerisinde yukarıdan aşağıya doğru OPN dozları arasındaki artışa bağlı olarak değerlendirilmiştir.

Her bir satır farklı bir OPN dozunu ifade etmektedir.

p<0.001 a ile d,e ve f kıyaslandığında

p<0.001 b ile d,e ve f kıyaslandığında

p<0.001 c ile d,e ve f kıyaslandığında

p<0.01 d ile e ile kıyaslandığında

p<0.001 d ile f kıyaslandığında

p<0.01 g ile ı kıyaslandığında

p<0.001 g ile j,k ve l kıyaslandığında

p<0.01 h ile ı kıyaslandığında

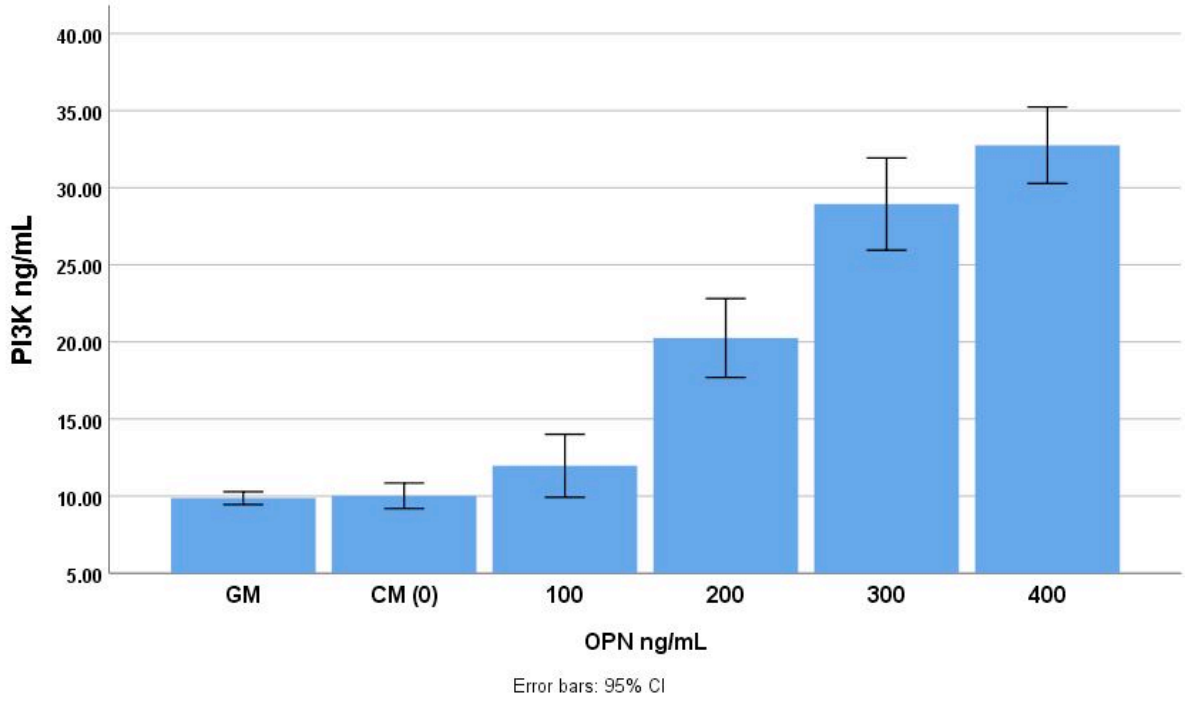
p<0.001 h ile j, k ve l kıyaslandığında

p<0.01 ı ile l kıyaslandığında

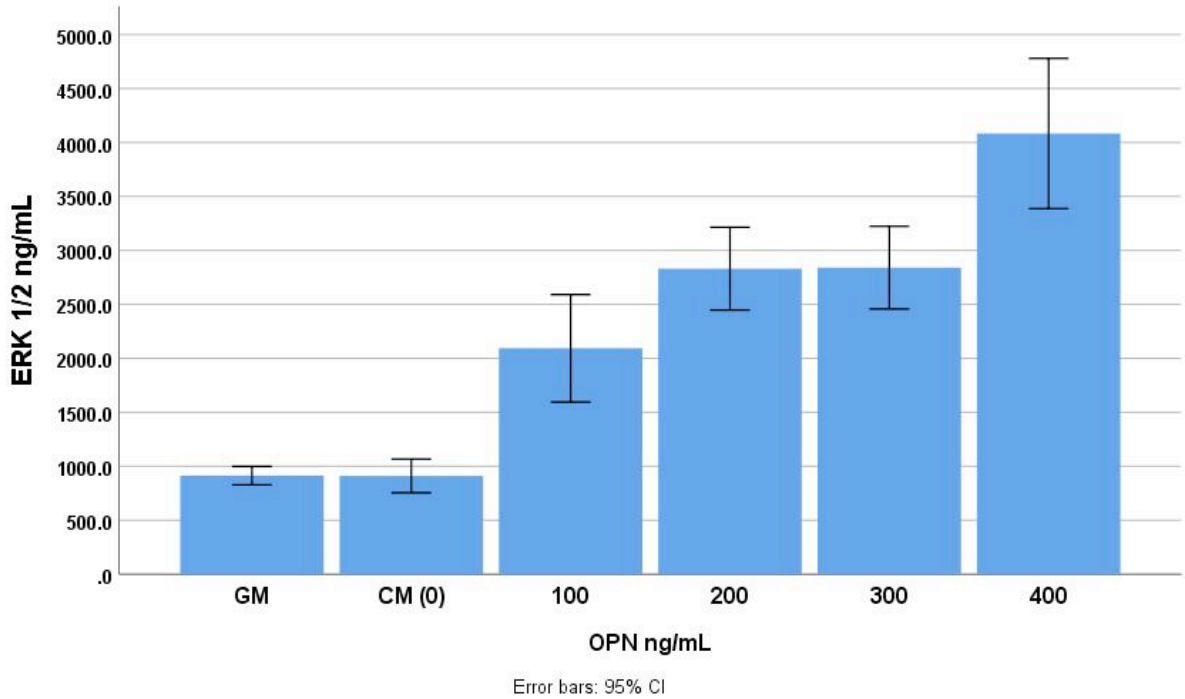
p<0.05 j ile l kıyaslandığında

p<0.05 k ile j kıyaslandığında

Tablodan görüleceği üzere kontrol medyumunu (FBS içeren) ve ikinci kontrol grubu FBS içermeyen ve OPN eklenmemiş kuyucuklarda elde edilen PI3K ve ERK1/2 düzeyleri ile 200, 300 ve 400 ng/mL OPN eklenen kuyucuklardan elde edilen medyumlardaki PI3K molekülünün ortalama değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. PI3K molekülündeki artışın doza bağımlı olduğu görülmektedir.



Grafik 5. HUVEC ortam medyumlarında PI3K düzeylerinin grafiksel gösterilişi



Grafik 6. HUVEC ortam medyumlarında ERK1/2 düzeylerinin grafiksel gösterilişi

5. TARTIŞMA

Endometrium kanseri kadınlarda en sık görülen jinekolojik kanserdir. Sağkalım genellikle hastalığın evresi ve histolojisi ile belirlenir, evre I ve II'deki hastaların çoğu olumlu bir prognoza sahiptir. Metastatik hastalığı olmayan hastalarda 5 yıllık genel sağkalım %74 ile %91 arasında değişmektedir(Braun ve ark., 2016). Endometrial kanserlerin yayılımı, kanser hücreleri arasında anjiyogenezin stimüle edilmesi yoluyla olmaktadır. OPN'nin çok farklı yönlerden, endometrial kanserler de dahil çeşitli kanser türlerinin ilerlemesinde çok fonksiyonlu bir faktör olduğu bilinmektedir. OPN'nin tümörün ilerlemesini anjiyogenezi regüle etmek yoluyla tetiklediği son yıllarda gittikçe artan çalışmalarla kanıtlanmıştır(Wai ve Kuo 2004; Du ve ark., 2009; Cho ve ark., 2009; Ramachandran ve ark., 2013; Yang ve ark., 2015). Bir sitokin ve ekstrasellüler matriks proteini olan OPN çeşitli integrin yapılarına ve CD44 molekülleri endotel hücrelerinde migrasyonu indüklemekte ve VEGF yoluyla indüklenen endotel hücre migrasyonunun regülasyonunu arttırmaktadır. Endotel hücrelerinde VEGF ile indüklenen proteinler olan doku faktörü (TF, tissue factor), OPN ve $\alpha_v\beta_3$ integrinler önemli moleküller olup, *in vivo* olarak VEGF yoluyla anjiyogenezi stimüle etmektedirler (Du ve ark.,2009; Kang et al. 2014; Kerenidi et al. 2016).

Yapılan çalışmalarda OPN'nin *in vivo* anjiyogenezi arttırmak yoluyla tümör büyümesinde önemli bir rolü olduğunu vurgulanmaktadır. Böylece, OPN'nin ekspresyonunda ya da sinyal yolağındaki herhangi bir anormalliğin endometrial kanserlerin gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynayacağı rapor edilmiştir (Hahne ve ark., 2013; Li ve ark., 2015).

Du ve ark., (2009) çalışmalarında endometrial kanser hücrelerinden izole ettikleri, tümör ile ilgili HEEC hücrelerini (tumor-associated HECCs, **H**uman **E**ndometrial **E**pithelial **C**ells)ve Ishikawa (ISK) hücrelerinde OPN genini inhibe etmek yoluyla, endometrial kanser ile ilişkili anjiyogenezin gelişiminde OPN'nin rolünü araştırmışlar. HEEC ve ISH hücrelerinde RNA'ları kullanarak OPN üreten genler ile girişimde bulunması ile bu genleri susturmuşlar ve *in vitro* olarak OPN-geni susturulmuş olan HEEC hücrelerinde anjiyogenezi araştırmışlar. Çalışmalarında, OPN üretiminin HEEC ve ISH hücrelerinde baskılanması sonucunda hücrelerde migrasyonun, invazyonun ve *in vitro* tüp oluşumunun azaldığını görmüşlerdir. HEEC hücrelerinden salgılanan OPN'nin hücre yüzeylerinde bulunan $\alpha_v\beta_3$

integrinlere bağlanarak anjiyogenezi tetiklemekten sorumlu olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, OPN geninin susturulduğu hücrelerde proliferasyonun inhibe olmadığını göstermişlerdir. Yine, OPN'nin *in vivo* olarak tümörün büyümesine etkisini araştırmışlar ve bunun için ISH hücreleri ve siOPN- ISH hücreleri (OPN geni susturulmuş) subkutan olarak nude farelere enjekte edilmiştir. *In vitro* olarak hücrelerin büyümesinde herhangi önemli bir değişiklik görülmemesine rağmen, siOPN-ISH hücrelerinin verildiği farelerde tümörlerin ISH hücrelerinin verildiği farelere göre çok daha yavaş büyüdüğü gözlemlenmiştir (Du ve ark., 2009). Bizim verilerimiz ile karşılaştırıldığında, Du ve ark.'nın verilerinin teyit edildiği görülmektedir. Çalışmamızda, OPN genini baskılamadan, hücrelere rekombinant insan OPN molekülünün eklenmesi sonucunda HUVEC hücrelerinde anjiyogenezin oluştuğu, hem ISH hem de HUVEC hücrelerinde migrasyonun arttığı saptanmıştır. Bununla birlikte, Du ve ark., çalışmalarında OPN ekspresyonunun inhibe olmasına rağmen HEEC ve ISH hücrelerinde proliferasyonun inhibe olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, OPN'nin artan konsantrasyonları ile birlikte hem ISH hem de HUVEC hücrelerinde proliferasyonlarında önemli oranda bir artış kaydedilmiştir. Bilindiği gibi, anjiyogenez, yani tümörlerin metastaz oluşturması için gerekli olan yeni kan damarları oluşumu kompleks bir süreç olup, hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve tüpe benzer yapıların oluşması gibi evrelerden oluşmakta olup, kemoterapötik bir ilaç bu basamaklardan herhangi birine veya bir kaçına etki edebilmektedir. Bu nedenle, OPN geninin inhibisyonunun da proliferasyon basamağında etkili olmadığını saptandığını düşünmekteyiz.

Cho ve ark., (2009) endometrial kanserli olgularda OPN molekülünün bir biobelirleyici olup olamayacağı ve prognozdaki rolünü araştırmışlar. Bunun için histolojik olarak endometrial kanser tanısı konmuş 56 olguda serum OPN düzeylerini ELISA yöntemi ile saptamış ve bu değerleri 154 sağlıklı kontrolden elde edilen düzeyler ile karşılaştırmışlar. Sağlıklı kontrollerde OPN düzeylerini ortalama 103.5 ng/mL, pre-operatif endometrial kanser hastalarında ise 236.9 ng/mL olarak saptamışlar. Ayrıca, OPN düzeylerini bir tümör belirleyici olan CA125 düzeyleri ile ilişkisini araştırmışlar. Plazma OPN düzeylerinin tümörün evresi, derecesi, myometrial infiltrasyon, sitolojisi ve histolojik tipi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, plazma CA125 düzeylerinin endometrial kanserli hastaların kliniği ve histopatolojisi ile ilişkili herhangi bir korelasyon saptamadıklarını rapor etmişlerdir(Cho ve ark., 2009)

OPN molekülü bir ekstrasellüler matriks proteini olup, non-kollajen yapıda, siyalik asitten zengin kalıntılar içeren, glikozillenmiş fosfoprotein yapısındadır. OPN tip I kollajen,

fibronektin ve osteokalsine bağlanmaktadır. Yüksek düzeyde metastatik dönüşüme uğramış hücrelerin tümör oluşturma kapasitesi olmayan hücreler ile kıyaslandığında daha fazla OPN salgıladıkları gösterilmiştir. OPN, çeşitli hücrelerde reseptörü olan $\alpha_v\beta_3$ integrin molekülü yoluyla hücrelerde adhezyona, hücre migrasyonuna, ECM invazyonuna ve hücre proliferasyonuna neden olmaktadır.(Kang ve ark., 2014;Li ve ark., 2015).

EMT embriyonik gelişimde sırasında yer alan kompleks bir süreç olup, 1980'lerin başında embriyogenezdeki önemine dikkat çekilmiştir. EMT tümör hücrelerinin migrasyonu, invazyonu ve kanser hücrelerinin metastatik potansiyel kazanmasında önemli bir role sahiptir. Bu proses sırasında, epitelyal hücreler karakteristik özelliklerini kaybederler ve hücre-hücre adhezyonununun zayıflaması, hücrelerde motilite ve yayılım artması, apoptoza direnç gelişmesi ve hücre morfolojinin değişmesi gibi mezenkimal özellikleri kazanırlar. EMT, metastaz gelişimi ve tümörün invazyonu için lokomotif olarak tanımlanmakta olup, hücrelerin buldukları yerden çıkması ve kan dolaşımına doğru göç etmesi ve lenfatik damarlar yoluyla farklı organlara yayılımına izin verir. Böylece, EMT'nin tümör hücrelerine daha fazla invazyon özelliğini kazandırdığı söylenebilir(Wang ve ark., 2016; Sun, Qin, ve Zhong 2016).

Fedarko ve ark., (2001) çalışmalarında meme, akciğer, kolon ve prostat kanserli olgularda serumda OPN düzeylerini saptamışlardır. OPN düzeylerinin en çok meme kanserli olgularda arttığını bunu akciğer ve prostat kanserli olgular izlediği, kolon kanserli olgularda ise kontrol grubu ile kıyaslandığında da önemli ölçüde bir farklılık görmediklerini rapor etmişlerdir (Fedarko ve ark., 2001).

Li ve ark., (2015) çalışmalarında endometrial adenokarsinom hücre hattı olan HEC-1A hücrelerinde OPN'nin hücrelerde invazyon, migrasyon ve epitelyal-mezenkimal dönüşüme etkilerini ve sinyal yollarındaki molekülleri araştırmışlar. HEC-1A hücrelerini insan rekombinant OPN'nin farklı konsantrasyonları ile (0, 100, 200, 300 ve 400 ng/mL) ile 1-4 gün arasında enkübe etmişler. Hücrelerde ilk önce proliferasyonu saptamışlar ve en yüksek proliferasyon düzeyini oluşturan OPN konsantrasyonunu 300 ng/mL olarak saptamışlar. 400 ng/mL OPN ile muamelede de hücrelerin proliferasyona uğradıklarını ve 200 ng/mL OPN ile kıyaslandığında daha yüksek bir değere rastlandığını görmekte birlikte 300 ng/mL düzeyinde hücrelerin değerlerinin pik yaptıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, Matrigel ve insert kullanarak yaptıkları invazyon deneyinde HEC-1A hücrelerinin 24 saat sonunda göç ettiklerini, yine pipet ucu ile kuyucukdaki hücreleri bölüp migrasyonunu izledikleri deneyde de HEC-1A hücrelerinin OPN düzeylerinin artmasıyla birlikte migrasyonun ve göç eden hücre sayısının

arttığını göstermişlerdir. OPN'nin EMT ile ilgili molekül olan Akt sinyal yolu ile eksprese edilen MMP-2 sekresyonunu HEC-1A hücrelerinde arttırdığını rapor etmişlerdir.

Carvalho ve ark., (2018) çalışmalarında insan kemik iliği mezenkimal kök hücreler üzerine farklı konsantrasyonlarda (0,0.01,0.05, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1 µg/mL) osteokalsin (OC) ve OPN uygulamışlar. OPN'nin doza bağlı olarak hücrelerde proliferasyonu arttırdığını göstermişler. OC eklenmesinin hücrelerde herhangi bir proliferasyona neden olmadığını bildirmişler. Yine, OPN ve OC'nin HUVEC hücrelerinde anjiyogenik potansiyelini araştırmışlar ve 0.5 µg/mL OPN konsantrasyonundan sonra tüp yapıların da önemli ölçüde sayısal bir artış olduğunu bildirmişlerdir. OC ile muamelede ise HUVEC hücrelerinde tüp yapılarının değişmediğini göstermişlerdir. HUVEC hücrelerini 72 saat 1 µg/mL OPN ile muamele edip, bu hücreleri Matrigel üzerine ekmişler ve tüp yapılarının ve dallanmanın yine aynı şekilde arttığını saptamışlardır (Carvalho ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda da, OPN'nin en yüksek dozunda 16-18 saat arasında HUVEC hücrelerinin oluşturduğu tüp yapılarının sayısının ve dallanma noktalarında önemli derecede artış olduğu resimlerle gösterilmiştir.

Çalışmamızda insan rekombinant OPN'nin ISH ve HUVEC hücrelerinde migrasyon, invazyon ve proliferasyonu teşvik ettiği ve hücrelerde CD44 ve $\alpha_v\beta_3$ reseptörleri yoluyla PI3K/Akt ve ERK1/2 sinyal yolağını aktive ettiği, hücrelerin ortam medyumlarında OPN'nin artan dozları ile birlikte PI3K ve ERK1/2 moleküllerinin konsantrasyonlarının artışı bu yolağın aktive olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.

OPN'nin hücrelerde proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve *in vitro* tüpe benzer yapıların oluşumunu stimüle etmesi bu molekülün tümörlerde prognostik belirleyici olarak kullanılabilmesi ve tedavide metastaz oluşumunun kontrolünde önemli bir molekül olabileceğini düşündürmektedir.

6. ÖNERİLER

Bu çalışma sadece *in vitro* koşullarda ve hücre hatlarına osteopontinin (OPN) farklı dozlarını uygulamak suretiyle yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, daha önce yapılan buna benzer iki çalışmayı destekler niteliktedir. Önerilerimiz aşağıdaki gibidir;

1. ISH hücreleri ile nude farelerde (timusu olmayan immun sistemi baskılanmış fareler) tümör oluşturup, OPN inhibitörleri kullanılarak tümörün oluşum süreci ve inhibisyonu gösterilebilir. Tümör oluşturulduğu anda OPN verilerek, tümör oluşumunun hızı, büyüklüğü ve metastaz oluşumu izlenebilir.
2. Klinikte geniş bir hasta potansiyelinde endometrium kanserli olgularda evrelerine göre kanda OPN düzeyleri pre-op ve post-op olmak üzere uzun bir dönem izlenebilir.

ÖZET

Endometrial kanserler kadınlar arasında en sık görülen kanser türleri arasında 4. sırada yer almaktadır. Bu kanser türü için spesifik bir tümör belirleyici ya da prognozu takip etmekte kullanılabilecek bir molekül yoktur. Çalışmalarla saptandığı üzere osteopontin (OPN) molekülü, epitel tümörlerden salgılanmakta ve fazla salgılandığında ise hücreler arası bağlantının kopmasına, hücrelerin migrasyonuna ve invazyonuna yol açmakta ve böylece hücreler mezenkimal bir yapı kazanmaktadırlar. Bunun sonucunda epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT) başlamakta ve hücrelerin malignitesi artarak, metastaz oluşturma potansiyeli kazanmaktadırlar. Çalışmamızda insan endometrial adenokarsinom hücreleri olan Ishikawa (ISH) hücreleri kullanılmıştır. Bununla birlikte insan umbilikal kord ven endotel hücresi olan HUVEC hücreleri de EMT'nin benign hücrelerde oluşturabileceği etkilerin araştırılması ve bu etkilerin kanser hücrelerinde oluşan etkiler ile birlikte değerlendirilmesi için çalışmamıza daha sonra eklenmiştir. OPN'nin ISH hücrelerindeki epitelyal-mezenkimal dönüşüme etkisini araştıran sınırlı sayıda araştırma bulunmakta olup anjiyogenez oluşumunun basamaklarını olan hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve *in vitro* tüpe benzer yapıların oluşturması ile ilişkili olarak tüm çalışmaların bir arada değerlendirildiği ve OPN molekülünün reseptörlerine bağlanıp en önemli iki sinyal yolak molekülü olan PI3K ve ERK1/2'nin moleküler düzeyde ISH ve HUVEC hücreleri ortam medyumlarında saptandığı özgün bir çalışmadır. Çalışmada elde edilen veriler değerlendirildiğinde, EMT'de en önemli ve OPN'nin hücrelerde stimüle ettiği bir basamak olan proliferasyonun OPN'nin düzeylerinin artmasıyla birlikte lineer bir şekilde her iki hücre tipinde de artış gösterdiği saptanmıştır. OPN molekülü iki farklı sinyal yolak ile hücrelerde EMT oluşumunu stimüle etmekte olup, bu yollarda farklı moleküller yer almaktadır. Birincisi $\alpha_v\beta_3$ reseptörünün aracılık ettiği sinyal yolak olup, ERK1/2 molekülünün eksprese edildiği ve hücrelerde motiliteyi, migrasyonu, invazyonu arttırdığı sinyal yolaktır. İkincisi ise, CD44 reseptörünün aracılık ettiği PI3K molekülünün eksprese edildiği hücrelerde proliferasyon ve anjiyogenezin stimüle edildiği yolaktır. Çalışmamızda, bu iki yollarda yer alan moleküller olan PI3K ve ERK1/2 molekülleri, OPN ile muamele edilen ve edilmeyen ISH ve HUVEC hücrelerinin ortam medyumlarında saptanmış olup, OPN konsantrasyonlarının artmasıyla bu moleküllerin düzeylerinde artış saptanmıştır. Bu moleküllerin tetiklediği hücresel değişiklikler olan migrasyon ve anjiyogenez (*invitro* tüp oluşumu) değerlendirildiğinde ISH ve HUVEC hücrelerinde OPN'nin bu

hücrelerde çalıştığımız en yüksek konsantrasyon olan 400 ng/mL dozunda mezenkimal dönüşümü tetiklediği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Osteopontin, Ishikawa hücre hattı, HUVEC, PI3K, ERK1/2, endometrial kanser



ABSTRACT

Endometrial cancers rank 4th among the most common types of cancer among women. There is no specific tumor marker or molecule that can be used to estimate the prognosis of this type of cancer. As determined in several studies, the osteopontin (OPN) molecule is secreted from epithelial tumors and, when over-secreted, leads to disconnection of cells, migration and invasion of cells, thereby gaining a mesenchymal structure. As a result, epithelial-mesenchymal transformation (EMT) begins and the malignancy of the cells increases, gaining the potential to form metastases. In our study, Ishikawa (ISH) cells, human endometrial adenocarcinoma cells, were used. However, also the HUVEC (human umbilical cord ven endothelial cells) cells were added in our study to investigate the effects of EMT that may have in benign cells and to evaluate these effects together with the effects that occur in cancer cells. There are a limited number of studies investigating the effect of OPN on epithelial-mesenchymal transformation on ISH cells. In our study we evaluated together in connection with the proliferation, migration, invasion of the steps of angiogenesis formation and the formation of *in vitro* tube-like structures. Also, two most important signal molecules PI3K and ERK1 / 2, which expressed in OPN signal pathway are detected in conditioned medium incubated different OPN concentrations with ISH and HUVEC cells as an original study. The data obtained in the study were evaluated, it was found that proliferation, which is the most important step in EMT and a stimulation of OPN in cells, increased linearly in both cell types as the levels of OPN increased. The OPN molecule stimulates EMT formation in cells with two different signal pathways, and these pathways contain different molecules. The first signal pathway mediated by the $\alpha_v\beta_3$ receptor, and the signal pathway in which the ERK 1/2 molecule is expressed and increases motility, migration and invasion in cells. In the second pathway proliferation and angiogenesis stimulated by PI3K molecule is mediated by the CD44 receptor. Also, we detected PI3K and ERK1/2 molecules were detected in conditioned medium after treated with and without OPN and an increased levels were found linearly OPN concentrations. When migration and angiogenesis (*in vitro* tube formation), which are the cellular changes triggered by these molecules, is evaluated, OPN in ISH and HUVEC cells is thought to trigger the mesenchymal transformation at the highest concentration of 400 ng / mL in these cells.

Key Words: Osteopontin, Ishikawa cell lines, HUVEC, PI3K, ERK1/2, endometrial cancer

KAYNAKLAR

Arnautova I, George J, Kleinman HK, Benton G. The Endothelial Cell Tube Formation Assay on Basement Membrane Turns 20: State of the Science and the Art. *Angiogenesis* 2009; 12(3): 267–74.

Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubal L Akhtar N. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. *Clinical Chemistry* 2003; 49(1): 32–40.

Braun MM, Overbeek-Wager EA, Grumbo RJ. Diagnosis and Management of Endometrial Cancer. *Cancer, American Family Physician* 2016;93:468-474.

Carvalho MS, Cabral JMS, Silva CL, Vashishth D. Synergistic Effect of Extracellularly Supplemented Osteopontin and Osteocalcin on Stem Cell Proliferation, Osteogenic Differentiation, and Angiogenic Properties. *Journal of Cellular Biochemistry* 2019; 120(4): 6555–6569.

Cho HB, Kang ES, Kim YT, Kim JH. Diagnostic and Prognostic Impact of Osteopontin Expression in Endometrial Cancer. *Cancer Investigation* 2009; 27(3): 313–323.

Demirel PB. Epithelial-Mesenchymal Transition in Normal Development and Carcinogenesis. *Maltepe Medical Journal* 2013; 5 (3): 41–44.

Du X, Jiang T, Sheng X, Gao R, Li Q. Inhibition of Osteopontin Suppresses in vitro and in vivo Angiogenesis in Endometrial Cancer. *Gynecologic Oncology* 2009;115(3): 371–376.

Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, LaFlamme S, Burbelo PD, Goldstein AL,

Kleinman HK. Matrigel Induces Thymosin Beta 4 Gene in Differentiating Endothelial Cells.” *Journal of cell science* 1995; 108; Pt 1: 3685–3694.

Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. Decorin Suppresses Tumor Cell-Mediated Angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21(31): 4765–4777.

HahneJC, Meyer SR, Kranke P, Dietl J, Guckenberger M, Polat B, Hönig A. 2013. Studies on the Role of Osteopontin-1 in Endometrial Cancer Cell Lines. *Strahlentherapie und Onkologie* 2013; 189(12): 1040–1048.

Bradley JR. TNF-Mediated Inflammatory Disease. *Journal of pathology* 2008; 220(2): 114–25.

Kang YJ, Forbes K, Carver J, Aplin JD. The Role of the Osteopontin – Integrin $\alpha v \beta 3$ Interaction at Implantation : Functional Analysis Using Three Different in Vitro Models. *Human Reproduction* 2014; 29(4): 739–749.

Kerenidi T, Kazakou AP, Lada M, Tsilioni I, Daniil Z, Gourgouljanis KI. Clinical Significance of Circulating Osteopontin Levels in Patients With Lung Cancer and Correlation With VEGF and MMP-9. *Cancer Investigation* 2016; 34(8): 385–92.

LiY, Xie Y, Cui D, Ma Y, Sui L, Zhu C, Kong H, Kong Y. Osteopontin Promotes Invasion, Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Endometrial Carcinoma Cell HEC-1A through AKT and ERK1/2 Signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2015; 37(4): 1503–12.

Yohannes M, Yohannes T. 2009. How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? *Cell Cycle* 2009; 8(8): 1168–1175.

Amir M, Somi, MH, Darabi M, Jabbarpour-Bonyadi M. Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 in Cancer Therapy: A Focus on Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Biology Reports* 2016; 43(2): 107–16.

Ramachandran S, Kwon KY, Shin SJ, Kwon SH, Dha SD, Lee HG, Hong YB, Bae I, Lee GH, Cho CH. Regulatory Role of Osteopontin in Malignant Transformation of Endometrial Cancer. *Molecular Biology Reports* 2013; 40(5): 3623–3629.

Mazen S, Weintraub NL. Osteopontin: A Bona Fide Mediator of Abdominal Aortic Aneurysm? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; 27(3): 439–41.

Sun T, Qin Y, Zhong W. Epithelial-Mesenchymal Transition and Its Regulation in Tumor Metastasis. *Tumor Metastasis*. 2016; Chapter 10: 217-239.

Wai PY, Kuo PC. The Role of Osteopontin in Tumor Metastasis. *Journal of Surgical Research* 2004; 121(2): 228–41.

Wang J, Wei Q, Wang X, Tang S, Liu H, Zhang F et al. Transition to Resistance: An Unexpected Role of the EMT in Cancer Chemoresistance. *Genes and Diseases* 2016; 3(1): 3–6.

Yang M, Jiang C, Chen H, Nian Y, Bai Z, Ha C. The Involvement of Osteopontin and Matrix Metalloproteinase- 9 in the Migration of Endometrial Epithelial Cells in Patients with Endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2015; 13(1): 1–13.

Zhao H, Chern Q, Alam A, Cui J, Suen KC, Soo AP, Eguchi S, Gu J, Ma D. The Role of Osteopontin in the Progression of Solid Organ Tumour. *Cell Death and Disease* 2018; 9: 356