

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARIN TÜKÜRÜK  
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN EKSOZOM VE  
BAKTERİLERİN, SAĞLIKLI KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Meriç BİLGİÇ KÜÇÜKGÜVEN**

**Kök Hücre Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2022**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARIN TÜKÜRÜK  
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN EKSOZOM VE  
BAKTERİLERİN, SAĞLIKLI KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Meriç BİLGİÇ KÜÇÜKGÜVEN**

**Kök Hücre Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTIK**

**İKİNCİ DANIŞMAN  
Doç. Dr. Didem KART**

**ANKARA  
2022**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARIN TÜKÜRÜK  
ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN EKSOZOM VE BAKTERİLERİN,  
SAĞLIKLI KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Öğrenci: Meriç BİLGİÇ KÜÇÜKGÜVEN**

**Danışman: Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK**

**İkinci Danışman: Doç. Dr. Didem KART**

Bu tez çalışması 20.01.2022 tarihinde jürimiz tarafından “Kök Hücre Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

<b>Jüri Başkanı:</b>	<i>Prof. Dr. Ayşen Özcan</i> (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
<b>Tez Danışmanı:</b>	<i>Doç. Dr. Betül Çelebi Saltık</i> (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
<b>Üye:</b>	<i>Doç. Dr. Özer Aylin Gürpınar</i> (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
<b>Üye:</b>	<i>Doç. Dr. Hande Canpınar</i> (Hacettepe Üniversitesi)	(imza)
<b>Üye:</b>	<i>Doç. Dr. Müjde Yüce Eryılmaz</i> (Ankara Üniversitesi)	(imza)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

25.01.2022

*Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN*  
**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezimin aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>

x Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

25/01/2022

Meriç Bilgiç Küçükgüven

-----  
 “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Betül Çelebi Saltık danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

**Meriç BİLGİÇ KÜÇÜKGÜVEN**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin tecrübeleri ile bana her türlü desteği sağlayan ve yol gösteren, çalışma prensibi, disiplini ile hayranı olduğum ve örnek aldığım çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Betül ÇELEBİ SALTİK'a saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans tez çalışmam boyunca, değerli tecrübelerinden ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı imkanlarından faydalanmamı sağlayan sevgili yardımcı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Didem KART'a saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca derslerini zevk alarak ve büyük bir heves ile dinlediğim Kök Hücre Anabilim Dalı'nın çok saygıdeğer hocalarına saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Kök Hücre programında yüksek lisans eğitimi almam konusunda bana hoşgörü ile sonsuz destek veren ve motivasyon sağlayan, her zaman bilimsel ve akademik vizyonun ileri noktaya taşınması gerektiğine inanan Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nın çok değerli hocaları Sayın Prof. Dr. Osman Taha KÖSEOĞLU, Sayın Prof. Dr. Nuray ER ve Sayın Doç. Dr. Mustafa Yiğit SAYSEL'e saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca desteğini, inancını ve sabrını benden esirgemeyen sevgili aileme en içten sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışması kapsamında verdikleri maddi destekten dolayı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: TYL-2020-18963) teşekkür ederiz.

**Meriç BİLGİÇ KÜÇÜKGÜVEN**

## ÖZET

**Bilgiç Küçüküven M. Baş Boyun Kanseri Hastalarının Tükürük Örneklerinden İzole Edilen Eksozom ve Bakterilerin, Sağlıklı Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022.** Baş ve boyun kanserlerinin gelişiminde tümör mikroçevresinde yer alan, hücreler arası ve çevre sağlıklı dokular ile etkileşimden sorumlu olan komponentler son yıllarda dikkat çeken bir konu haline gelmiştir. Bu tez çalışmasının amacı, skuamoz hücreli baş ve boyun kanserlerinde tükürükten izole edilen eksozomların ve spesifik bakteri türünün (*Streptococcus (S.) mitis*) kanserleşmedeki etkisinin, sağlıklı kemik iliği mezenkimal kök hücreler (MKH) üzerinden değerlendirilmesidir. Bu tez çalışması kapsamında baş ve boyun kanseri hastalarının tükürük örneklerinden eksozom izolasyonu yapılarak, akım sitometri, ELISA ve geçirimli elektron mikroskopu ile karakterizasyon yapıldı. Aynı zamanda bu klinik örneklerden *S. mitis* izolasyonu da yapılarak, polimeraz zincir reaksiyonu, optokin duyarlılık testi ve katalaz testi karakterizasyon analizleri gerçekleştirildi. Sağlıklı kemik iliği mezenkimal kök hücreler ile ko-kültür çalışmaları yapılarak mezenkimal-epitelyal geçiş ile ilişkilendirilen sitokin/kemokin/büyüme faktörlerinin ekspresyonları sitokin array ile, CD44 ve integrin alfa 6 ekspresyonları akım sitometri ile, vimentin ekspresyonları ise immünfloresan inceleme ile değerlendirildi. Elde edilen veriler sonucunda; vimentin, integrin alfa 6 ve CD44 ekspresyonlarının tüm gruplarda görüldüğü ancak *S. mitis* / MKH ko-kültür grubunda diğer gruplara göre farklılık gösterdiği saptandı. Ko-kültür ortamlarındaki sitokin/kemokin/büyüme faktörleri değerlendirildiğinde bakteriyel floranın eksozomlara eklenmesinin mezenkimal-epitelyal geçişi desteklediği görüldü. Bu tez çalışması, hedeflenen amaç doğrultusunda baş ve boyun kanserli hastalardan izole edilen eksozom ve bakterilerin, ko-kültür çalışmalarıyla mezenkimal-epitelyal geçişte etkilerini değerlendiren ve klinik uygulamalar açısından önemini ortaya koyan ilk çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** eksozom, mezenkimal-epitelyal geçiş, oral flora, skuamoz hücreli baş ve boyun kanseri, *Streptococcus mitis*, tükürük.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde verdikleri maddi destekten ötürü Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: TYL-2020-18963) teşekkür ederiz.

## ABSTRACT

**Bilgic Kucukguven M. Evaluation of the Effects of Exosomes and Bacteria Isolated from Saliva Samples of Patients with Head Neck Cancer on Healthy Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Stem Cell Master Thesis, Ankara, 2022.** Recently, in the development of head and neck cancers, the components, which are responsible for the interaction between cells and surrounding healthy tissues, in the tumor microenvironment have become a burgeoning area. The aim of this thesis is to evaluate the effect of salivary exosomes and specific bacterial species (*Streptococcus (S.) mitis*) isolated from saliva on development of head and neck squamous cell carcinoma. Within the scope of this thesis, isolation of exosomes from saliva samples of head and neck cancer patients/healthy donor was performed and exosomes were characterized by flow cytometry, ELISA and transmission electron microscopy. At the same time, *S. mitis* was isolated from these clinical samples and characterization analyzes were performed with polymerase chain reaction, optochin-sensitive test and catalase test. By co-culture studies with healthy bone marrow mesenchymal stem cells, cytokine/chemokine/growth factors expressions associated with mesenchymal-epithelial transition were evaluated by cytokine array, CD44 and integrin alpha 6 expressions were evaluated by flow cytometry, and vimentin expressions were evaluated by immunofluorescence analysis. As a result of the data obtained; it was determined that vimentin, integrin alpha 6 and CD44 were expressed in all groups but differed in the *S. mitis* / MSC co-culture group compared to other groups. When the expressions of cytokine/chemokine/growth factors in co-culture media were evaluated, it was seen that the addition of bacterial flora to exosomes supported the mesenchymal-epithelial transition. This thesis is the first study that evaluates the effects of salivary exosomes and bacteria isolated from the patients with head and neck cancer on the mesenchymal-epithelial transition with co-culture studies and reveals these bio-markers for clinical applications.

**Keywords:** head and neck squamous cell carcinoma, mesenchymal-epithelial transition, oral flora, saliva, *Streptococcus mitis*.

We thank Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TYL-2020-18963) for their financial support in the realization of this thesis.

## İÇİNDEKİLER

<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>iii</b>
<b>YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI</b>	<b>iv</b>
<b>ETİK BEYAN</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vi</b>
<b>ÖZET</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>ix</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>xiii</b>
<b>TABLolar</b>	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
2.1. Baş ve Boyun Kanserlerine Genel Bakış	5
2.2. Likit Biyopsi ve Baş-Boyun Kanserleri	6
2.3. Eksozomlar	7
2.4. Kök Hücreler ve Eksozomları	13
2.5. Epitelyal-Mezenkimal ve Mezenkimal-Epitelyal Geçiş Fenomeni	18
2.6. Oral Mikrobiyotanın Kanser Gelişimindeki Rolü	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>24</b>
3.1. Tükürük Örneklerinin Toplanması	24
3.2. Tükürük Örneklerinden Eksozomların İzolasyonu	24
3.3. Eksozomların Karakterizasyonu	25
3.3.1. Eksozomların Morfoloji ve Büyüklük Tayini	26
3.4. Tükürük Örneklerinden Bakterilerin İzolasyonu	27
3.4.1. <i>Streptococcus mitis</i> Bakterilerinden DNA İzolasyonu ve PZR Reaksiyonu	27
3.4.2. Optokin (etilhidrokuprein hidrolorür) Duyarlılık Testi	29
3.4.3. Katalaz Testi	29
3.5. Sağlıklı İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	29
3.5.1. Ko-kültür Çalışmaları için Örnek Hazırlığı	30
3.6. Ko-kültür Sonrasında Hücre Karakteristiğindeki Değişkenlikler	31
3.6.1. Akım Sitometri Analizi	31
3.6.2. İmmünfloresan Boyama	32
3.6.3. Sitokin Array	32

3.7. Verilerin Analizi	33
<b>4. BULGULAR</b>	<b>34</b>
4.1. Eksozom Eldesi ve Karakterizasyonu	34
4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	35
4.3. Bakteri İzolasyonu	36
4.4. Ko-kültür Çalışmaları	38
4.4.1. Akım Sitometri	39
4.4.2. İmmünfloresan Boyama	40
4.4.3. Sitokin Array	42
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>46</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>51</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>53</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>67</b>
EK-1: Tez Çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni	67
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	68
EK-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	69
EK-4: Dijital Makbuz	70
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>71</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ALDH</b>	Aldehit dehidrogenaz
<b>ALIX</b>	Apoptosis linked gene 2-interacting protein
<b>BDNF</b>	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
<b>BLC</b>	B lenfosit kemoatraktan
<b>BMP</b>	Kemik morfogenetik protein
<b>CDKN2A</b>	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
<b>Ck beta 8-1</b>	Kemokin (C-C motif) ligand 23
<b>DH</b>	Dendritik hücre
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>EV</b>	Ekstrasellüler vezikül
<b>ENA-78</b>	Epitelyal nötrofil aktive edici peptit
<b>FBS</b>	Sığır serum albümin
<b>FGF</b>	Fibroblast büyüme faktörü
<b>FLT-3 Ligand</b>	FMS-benzeri tirozin kinaz 3 Ligand
<b>G-CSF</b>	Granülosit koloni stimüle edici faktör
<b>GM-CSF</b>	Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör
<b>GRO</b>	Büyüme kontrollü protein
<b>HPV</b>	<i>Human papillomavirus</i>
<b>I-309</b>	İnflamatuvar sitokin 309
<b>IFN-gamma</b>	Interferon gamma
<b>IGFBP</b>	İnsulin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>IP-10</b>	İnterferon gamma uyarılmış protein 10
<b>iPSC</b>	Uyarılmış pluripotent kök hücre
<b>LIF</b>	Lökemi inhibitör faktör
<b>LIGHT</b>	Tümör nekroz faktör süperaille üyesi 14
<b>MCP</b>	Monosit kemotaktik protein
<b>M-CSF</b>	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
<b>MDC</b>	Makrofaj kaynaklı kemokin
<b>MDSC</b>	Myeloid kaynaklı süpresör hücre
<b>MIF</b>	Makrofaj migrasyonu inhibe edici faktör

<b>MIG</b>	İnterferon-gamma ile uyarılmış monokin
<b>MIP-1 beta</b>	Makrofaj inflamatuvar protein
<b>MKH</b>	Mezenkimal kök hücre
<b>MMP</b>	Matriks metalloproteinaz enzimi
<b>NAP-2</b>	Kemokin (C-X-C motif) ligand 7
<b>NK hücreler</b>	Doğal öldürücü hücreler
<b>NT-4</b>	Nörotrofin 4
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>PARC</b>	Pulmoner ve aktivasyonla düzenlenen kemokin
<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu salin
<b>PDGF-BB</b>	Platelet-kaynaklı büyüme faktörü BB
<b>PD-L1</b>	Programlı ölüm ligandı 1
<b>PLGF</b>	Plasental büyüme faktörü
<b>RANTES</b>	Kemokin (C-C motif) ligand 5
<b>SCF</b>	Kök hücre faktörü
<b>SDF-1</b>	Stromal hücre kaynaklı faktör 1
<b>TAG101</b>	Tumor susceptibility gene 101 protein
<b>TARC</b>	Timus ve aktive edici regüle kemokin
<b>TEM</b>	Geçirimli elektron mikroskop
<b>TGF beta 1</b>	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
<b>TIMP</b>	Doku inhibitörü metalloproteaz
<b>TNF</b>	Tümör nekroz faktörü
<b>TP53</b>	Tümör protein 53
<b>TPO</b>	Tiroid peroksidaz
<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
<b>OSM</b>	Onkostatın M
<b>VCAM</b>	Vasküler hücre adezyon molekülü
<b>VEGF-A</b>	Vasküler endotelial büyüme faktörü A
<b>VEGFR</b>	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü
<b>vWF</b>	von-Willebrand Faktör

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1.1. Eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu.	3
1.2. <i>Streptococcus mitis</i> izolasyonu ve karakterizasyonu.	3
1.3. Sağlıklı kemik iliği MKH'ler ile klinik örneklerden izole edilen eksozom ve bakterilerin <i>in vitro</i> şartlarda yapılan ko-kültür çalışmaları.	4
2.1. Kök hücrelerden salgılanan eksozomların şematik görüntüsü.	8
2.2. Kanser kök hücrelerinin özellikleri.	15
2.3. Baş ve boyun kanseri hücrelerinden salgılanan eksozomların tümör mikro-çevresindeki fonksiyonlarının şematik görüntüsü.	17
2.4. Kanser patogeneğinde oral bakterilerin etkileri.	23
3.1. “Human Cytokine Antibody Array C5” kitinde yer alan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin şematize hali.	33
4.1. Klinik tükürük örneklerinden izole edilen eksozomların TEM görüntüleri.	34
4.2. İzole edilen eksozom örneklerinin CD63 pozitifliklerini gösteren akım sitometri sonuçları.	35
4.3. MKH'lerin beşinci günde ışık mikroskopu altında görüntüleri. Ölçek: 500 µm.	35
4.4. Pasaj 2'de yer alan MKH'lerin akım sitometri analizi sonrası belirteç tayini.	36
4.5. <i>S. mitis</i> için konvansiyonel PZR ile doğrulama görüntülemesi.	36
4.6. Hemoliz yönünden incelenen <i>S.mitis</i> 'in (hasta örneği) makroskobik koloni görüntüsü.	37
4.7. Optokine dirençli <i>S. mitis</i> (hasta örneği) kolonileri.	37
4.8. Katalaz testi sonuçları. A) <i>S. mitis</i> (hasta örneği) için katalaz testi negatif gözlenirken B) <i>S. aureus</i> kontrol grubunda pozitif reaksiyon (kabarcık oluşumu) gözlendi.	38
4.9. Ko-kültürdeki hücrelerin canlılık tayini.	39
4.10. İmmünfloresan boyama ile vimentin ekspresyonu görüntülemesi. Ölçek çubuğu= 100 µm.	41
6.1. Epitelyal-mezenkimal geçiş ve mezenkimal-epitelyal geçiş ile ilişkili belirteçler.	52

**TABLULAR**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Tükürükten elde edilen ekstrasellüler veziküllerin hastalık türlerine göre sahip oldukları biyobelirteçler.	10
<b>2.2.</b> Eksozom izolasyon yöntemleri.	12
<b>2.3.</b> Baş boyun bölgesi spesifik kanser türleri için biyobelirteç olarak oral bakteri türleri.	21
<b>4.1.</b> CD44 ve integrin alfa 6 ekspresyonu için akım sitometri analizi verileri (n=3, ortalama $\pm$ standart sapma).	39
<b>4.2.</b> Çalışma gruplarına ait kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri değerlerinin sadece MKH içeren gruba göre normalize edilerek elde edilen verilerin n=2, ortalama $\pm$ standart sapma değerleri.	43

## 1. GİRİŞ

Baş ve boyun bölgesinde görülen skuamoz hücreli kanserlerin görülme insidansında son yıllarda, özellikle genç yaş hasta gruplarında artış izlenmektedir. Sigara, alkol kullanımı gibi bilinen predispozan etmenlerin yanı sıra *human papillomavirus* (HPV) gibi viral ya da bakteriyel etkenlerin de oral kanserlerin gelişiminde önemli bir yere sahip olduğu ortaya çıkmaya başlamıştır (1). Baş boyun bölgesi kanserlerinde sağ-kalım oranları oldukça düşük olmakla birlikte, tanı ve tedavide spesifik yöntemler hala bulunamamıştır (2). Bu noktada karakterizasyon çalışmalarının yapılması ve hastaya spesifik tedavilerin önünün açılması konuları güncel hale gelmiştir. Bu kapsamda likit biyopsi prosedürü, minimal invaziv bir yöntem olması ve örneklerin kolayca elde edilebilirliği ile moleküler karakterizasyonda, erken tanıda, rekürrens değerlendirilmesinde son yıllarda literatürde odak noktası haline gelmiştir (3). Tükürük, kan, idrar gibi vücut sıvıları likit biyopsi alımı için birer adaydır.

Literatür bilgilerine göre kansere özgü dolaşan biyo-belirteçlerin ekstrasellüler veziküller (EV) içerisinde yer aldığı bilinmektedir (3, 4). Eksozomlar, yaklaşık 30-100 nm çaplarında olan EV tiplerinden biridir. Eksozomlar miRNA, mRNA, DNA, proteinler gibi pek çok molekül içermektedir ve böylece köken aldığı dokunun belirlenmesine olanak sağlarlar (5). Hücre içi iletişimde ve moleküler sinyallerde önemli rollere sahiptirler. Ayrıca bu nano-veziküllerin tümör progresyonunda/invazyonunda pek çok rolü olduğu literatürde gösterilmiştir (6). Eksozom karakterizasyonu yapılarak, içerisinde bulunan tümöre ait belirteçlerin saptanması ile erken tanıya, tedavilerin etkinliğinin değerlendirilmesine ve kanserleşmenin moleküler seviyede incelenmesine olanak vermektedir. Böylece baş boyun kanserlerine özgü belirteçler saptanabilir.

Baş boyun kanserleri epitel hücrelerinden ve mukozadan köken alan, oral kavitede ve farengial alanda lokalize olan patolojilerdir. Literatürde karsinomların her zaman epitel hücrelerinden değil, kemik iliğinden kaynaklanan mezenkimal kök hücrelerden (MKH) de gelişebildiğini gösteren hipotezler mevcuttur (7). Her iki alan da, sürekli olarak çevresel faktörlere maruz kalır. Bu maruziyet de oral mikrobiyotada değişikliklere sebep olabilir (8). Yapılan kohort çalışmalarda, spesifik bakteri

florasının varlığının baş boyun kanser gelişimi riskini arttırdığı belirtilmiştir (9, 10). Kanser hastası olmayan hastalar ile oral skuamoz hücreli kansere sahip hastalar 40 farklı oral bakteri türü açısından değerlendirilmiş ve *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* ve *Streptococcus mitis* türleri kanserli hastaların tükürük örneklerinde yüksek miktarda bulunmuştur. Bu üç bakteri türünün kanser durumlarında tanısal belirteç olarak kullanılması önerilmiştir (11). Yapılan bir başka çalışmada baş boyun kanserli hastalarda servikal lenf nodlarından en fazla izole edilen bakteri türlerinin oral streptokoklar olduğu saptanmıştır (12).

Bu yüksek lisans tezi kapsamında, baş / boyun kanserli hastalardan ve baş / boyun kanseri tanısı olmayan bireylerden elde edilen tükürük örneklerinden izole edilen eksozomlar ile *S. mitis* bakteri türünün, sağlıklı kemik iliği MKH'ler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hipotezler kurulmuş ve test edilmiştir.

**Hipotez 1.** Baş ve boyun kanserli hastaların tükürük örneklerinden izole edilen eksozomlar kansere spesifik belirteçlere sahip olup, bu eksozomlar sağlıklı kemik iliği MKH'ler üzerinde kanserleşmeyi uyarabilir.

#### **Hedefler**

- Baş boyun kanserli ve baş boyun kanseri olmayan hasta gruplarından tükürük örneklerinin toplanması,
- Tükürük örneklerinden eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu,
- Eksozomların sağlıklı kemik iliği MKH'ler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi.

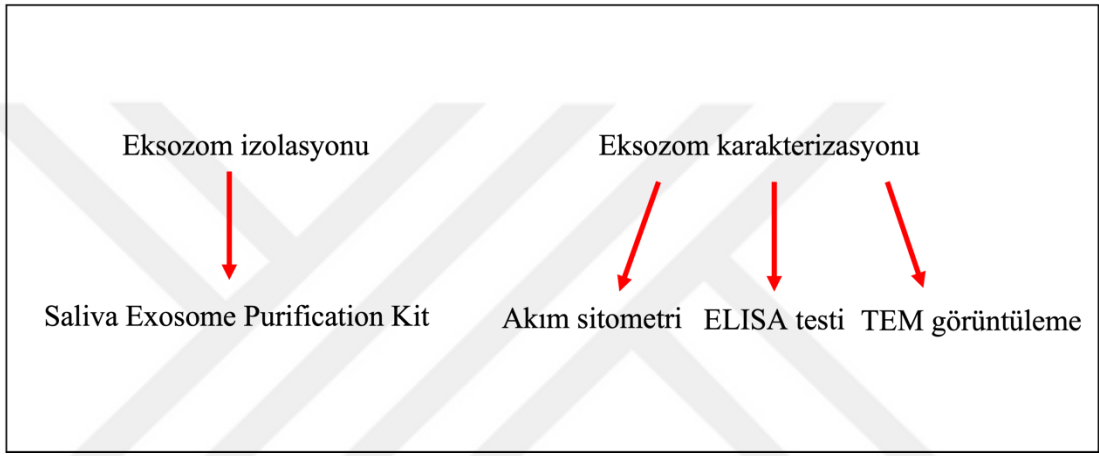
**Hipotez 2.** Baş ve boyun kanserli hastaların tükürük örneklerinden izole edilen *Streptococcus mitis* bakteri türü, sağlıklı kemik iliği MKH'lerin kanserleşmesini uyarabilir.

#### **Hedefler**

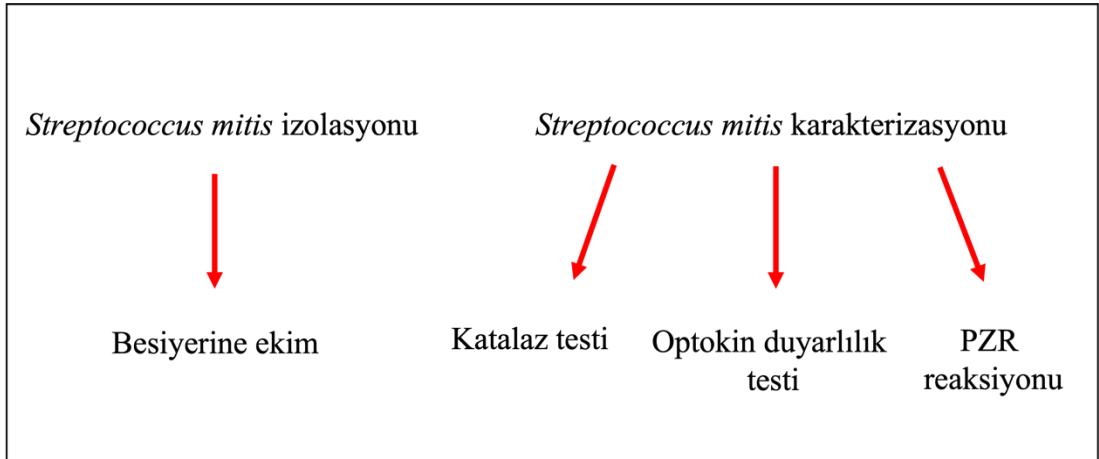
- Tükürük örneklerinden *Streptococcus mitis* izolasyonu ve karakterizasyonu,
- Ko-kültür çalışmaları ile *Streptococcus mitis*'in sağlıklı kemik iliği MKH'ler üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ve ilaveten klinik örneklerden izole edilen *Streptococcus mitis* ve eksozomların sağlıklı

kemik iliği MKH hatları üzerine kombine olarak uygulanarak etkilerinin değerlendirilmesi.

Belirtilen hipotezlerin test edilmesi amacıyla, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı (GO 20/595) ile baş ve boyun kanserli ve baş ve boyun kanser tanısı olmayan bireylerden elde edilen tükürük örnekleri, Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda toplanmıştır (n=6). Hipotezlerin test edilmesi amacıyla yapılan çalışmalar aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 1.1-1.3).



**Şekil 1.1.** Eksozomların izolasyonu ve karakterizasyonu.



**Şekil 1.2.** Streptococcus mitis izolasyonu ve karakterizasyonu.

Ko-Kültür çalışmaları	
1. Mezenkimal kök hücreler	} Akım sitometri İmmünfloresan boyama Sitokin array
2. Mezenkimal kök hücreler + S. mitis	
3. Mezenkimal kök hücreler + Sağlıklı grup eksozomları	
4. Mezenkimal kök hücreler + S. mitis + Sağlıklı grup eksozomları	
5. Mezenkimal kök hücreler + Hasta grubu eksozomları	
6. Mezenkimal kök hücreler + S. mitis + Hasta grubu eksozomları	

**Şekil 1.3.** Sağlıklı kemik iliği MKH'ler ile klinik örneklerden izole edilen eksozom ve bakterilerin *in vitro* şartlarda yapılan ko-kültür çalışmaları.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Baş ve Boyun Kanserlerine Genel Bakış

Baş ve boyun bölgesi kanserleri dünya genelinde altıncı en sık görülen kanser tipidir ve tüm oral kanserlerin %90'ını oluşturmaktadır (13). Her yıl tüm dünyada 830.000'den fazla kişiye baş ve boyun kanseri tanısı konmakta ve bunlardan 430.000'den fazlası bu kanser nedeni ile ölmektedir (14). Baş ve boyun kanserlerinin en sık görülen histolojik tipi skuamoz hücreli kanserdir. Oral kavite dışında orofarinks, hipofarinks, larinks ana tutulum alanlarıdır. Son yıllarda özellikle genç yaş gruplarında baş ve boyun bölgesi skuamoz hücreli karsinomların insidansında artış görülmektedir. Sigara, alkol kullanımı, tütün çiğneme gibi alışkanlıkların yanı sıra *human papillomavirus* (HPV) gibi viral faktörler de bu artışta en önemli predispozan etkenlerdir (14-16). Bu etkenler dışında diyet, genetik alt yapı, toksik maddelere maruziyet ve çevresel faktörler de etiyolojik sebepler arasındadır. Artan yaş ile kadınlara oranla erkeklerde daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (17). Erkek bireylerin daha fazla tütün, yabancı madde kullanması bu durum için açıklayıcı olabilir. Ayrıca düşük sosyo-ekonomik seviye ile baş boyun kanserlerinin görülme insidansı arasında bir korelasyon tespit edilmiştir (18). Sonuç olarak epidemiyolojik faktörler, bireyin HPV pozitifliği/negatifliği, tümörün anatomik lokasyonu, kanser evresi gibi tüm bu durumlar hastalığın prognozunda oldukça önemli olmakla birlikte, tedavi protokolünün kararında da belirleyici etmenlerdir.

Detaylı medikal hikaye ve fiziksel muayene sonrasında mutlaka radyolojik metotlara başvurulur. Başlangıç için ince iğne aspirasyon biyopsileri de yüksek duyarlılık ile çalışan uygun tanısal metotlardır. Ekstrakapsüler metastazları önlemek için serkival lenf nodu diseksiyonları ve ileri cerrahiler oral kavitede görülen skuamoz hücreli kanserlerde kabul görmüş yaklaşımlardır (19, 20). Erken evrelerde tanı konulduğunda ise azalmış morbidite ile sonuçlanan minimal invaziv cerrahiler tercih edilir. Ancak gelişmiş cerrahi ve terapötik tedavilere rağmen literatürde, baş ve boyun bölgesi skuamoz hücreli karsinomlu hastaların 5 yıllık sağ kalım oranları yaklaşık %50 olarak belirtilmiştir (2). Konvansiyonel yaklaşımlardan olan radyoterapi gibi protokollerde uzun dönem yan etkiler ve toksisite en önemli dezavantajlardır. Teknolojide gerçekleşen ilerlemeler sayesinde, bu dezavantajların önlenmesi olası

hale gelmeye başlamıştır (14). Hedefe yönelik tedaviler bu kapsamda en fazla umut vaad eden yaklaşımlardır. Bu yaklaşımlarda hücre reseptörleri oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Literatürde, baş boyun bölgesi skuamoz hücreli kanserli hastalarda yüksek seviyelerde Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ekspresyonu olduğu gösterilmiştir ve bu artış düşük sağkalım oranları ile ilişkili bulunmuştur (21).

Tedavide spesifik terapiler olmamakla birlikte, bu kansere özgü belirteçlerin varlığı da netleştirilmemiştir. 2015 yılında yayınlanan “The Cancer Genome Atlas Network” kaynağında baş ve boyun bölgesi skuamoz hücreli karsinomları için genomik değişimler belirtilmiştir (22). Böylece patolojinin moleküler tabanı daha net anlaşılmasına başlanmış ve tanı ve tedavide özgün stratejilerin geliştirilmesini hızlandırmıştır. HPV- baş boyun kanserli hastalarda siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (*CDKN2A*) ve tümör protein 53 (*TP53*)’te fonksiyonel mutasyonlar yüksek oranda görülürken, HPV+ baş ve boyun kanserli hastalarda *E2F1*, *PIK3CA* ve *TRAF3* genlerinde delesyonlar ve nokta mutasyonlarının olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak skuamoz hücreli baş ve boyun kanserlerinde, fosfotidilinozitol 3-kinaz yolağı ve siklin bağımlı kinazların anahtar hedefler olarak düşünülmesi umut vaad edicidir (22-24). Son on yılda geliştirilen, immün sistemin tanınmasına dayanan immüno-terapi yaklaşımları da baş ve boyun kanserlerinde önemli bir adım olarak görülmektedir. Programlı ölüm ligandı 1 (PD-L1) baş boyun kanserli hastalarda %50-60 oranlarında eksprese olur ve tümöral immün kaçış sisteminde önemli bir rol oynar. Kanser hücrelerinden eksprese edilen PD-L1 ile kötü prognoz arasında ilişki rapor edilmiştir (25, 26). 2016 yılında ilk kez baş ve boyun kanserli hastalara tedavi amacı ile anti-PD-1 ajanı verilmiştir. Bu tedavilerden beklenen sonuçlar konvansiyonel, sitotoksik kemo-radyo terapilerin yan etkilerini ve radikal cerrahilerin yarattığı düşük hayat kalitesi ile sonuçlanan durumları minimum seviyeye indirmektir (27).

## 2.2. Likit Biyopsi ve Baş-Boyun Kanseri

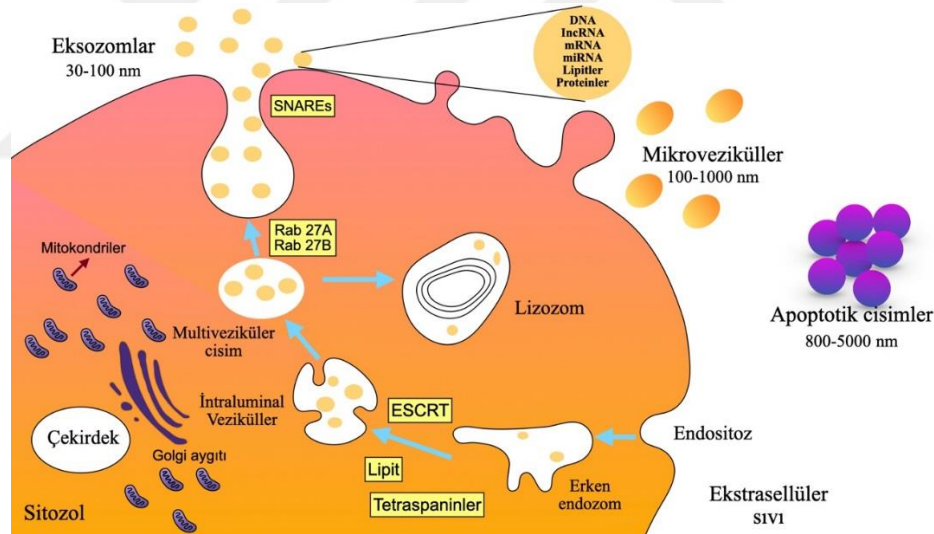
Hücresel belirteçlerin yanında, hücrelerden salgılanan potansiyel biyo-belirteçlerin tayini de kanser tanısında büyük önem taşımaktadır. Kanserleşmenin olduğu bölgedeki hücrelerin, hücre-hücre ve çevre stromal hücreler ile ilişkisi kanser gelişiminde önemli bir rol oynamakla birlikte metastaz gelişiminde de anahtar rol oynamaktadır. Bu hücresel bağlantıların altında yatan moleküler mekanizmayı

anlamak ve terapötik tedaviler için olası belirteçleri saptamak tümör gelişiminin önlenmesinde oldukça önemlidir (28). Tam bu noktada, baş ve boyun kanserli hasta gruplarında likit biyopsi alımı, moleküler karakterizasyon ve kanser tespiti amacı ile son yıllarda sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Likit biyopsi, minimal invaziv bir yöntem olması nedeni ile doku biyopsisine alternatif olarak görülmektedir. Erken tanıya olanak sağlaması, rekürrens kontrolünde, hasta takibinde, prognozda, tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesinde, büyük cerrahiler sonrası tümör varlığının belirlenmesinde indikatör olarak kullanılabilmesi likit biyopsinin en büyük avantajlarından (29). Kan, tükürük ve idrar örnekleri likit biyopsi için kullanılan kaynaklardır. Oral ve baş-boyun kanserleri biyo-belirteçlerini tükürük örneklerinden incelenmesinin kan örneklerine kıyasla daha hassas olduğu literatürde belirtilmiştir ve bu duruma en önemli sebep olarak tümör - tükürük yakın komşuluğu gösterilmiştir (1, 29). Dolaşan tümör hücreleri, dolaşan hücresiz tümör DNA'ları ve RNA'lar, dolaşan proteinler ve tümöral ekstrasellüler veziküller tükürük gibi pek çok vücut sıvısında tespit edilebilirler. Özellikle erken dönem kanser tanısında ve meme, oral bölge, gastrik sistem, akciğer ve pankreas gibi birçok kanser türünün takibinde tükürük kompozisyonunda yer alan moleküler belirteçlerin likit biyopsi ile kullanılabilmesi oldukça umut vaad edicidir (30, 31). Çok sayıda transkriptomik, proteomik ve mikrobiyolojik belirteçlerin varlığı tükürük içerisinde gösterilmiştir (32). Likit biyopsi yaklaşımı ile tükürük örneklerinin alınması oldukça hızlı, güvenli, kanama riski taşımayan, minimal invaziv ve maddi yük getirisi olmayan tanısal bir yöntemdir. Bu nedenle tükürük örneklerinden moleküler biyo-belirteçlerin analizi günümüzde oldukça ilgi çeken bir konu haline gelmiştir. Özellikle baş ve boyun kanserlerinde, erken tanıda, prognoz takibinde, tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde ve rekürrens takibinde tükürükten izole edilen biyo-belirteçlerin önemi oldukça fazladır (33, 34).

### **2.3. Eksozomlar**

Güncel literatür bilgilerine göre kansere özgü dolaşan biyo-belirteçlerin EV'ler içerisinde yer aldığı bilinmektedir (3). EV'ler, organizmanın neredeyse tüm hücre tiplerinden salgılanır ve birçok vücut sıvısından izole edilirler (35). EV'ler morfolojilerine ve hücresel orijinlerine göre üç alt gruba ayrılmaktadır: eksozomlar,

mikro-veziküller, apoptotik cisimler. Eksozomlar, yaklaşık 30-100 nm çaplarında, endozomal yoldan köken alan ve ekzositoz ile ekstrasellüler alana salgılanan yapılardır (36, 37) (Şekil 2.1). Eksozomlar miRNA, mRNA, DNA, proteinler gibi pek çok molekül içermektedir ve böylece köken aldığı dokunun belirlenmesine olanak sağlarlar (6). Endozomal kökenlerine bağlı olarak her eksozom: membran transport ve füzyon proteinleri (Rab GTPas, Anneksin, flotillin, Endozomal sıralı kompleksi (ESCRT) 0, I, II ve III), ısı şok proteinleri (Hsc70, Hsp90), tetraspaninler (CD9, CD63, CD81, CD82), Apoptoz bağlantılı gen 2-etkileşimli protein (ALIX), tümör duyarlılık geni 101 protein (TAG101), fosfolipazlar ve lipit ilişkili proteinler barındırmaktadır (38). Bu belirtilen proteinler dışında hücrelerarası iletişimde yer alan, eksozomlar ile ilişkili 4400'den fazla protein de tanımlanmıştır (39). Bahsedilen proteinlere ilaveten eksozomlar dayanıklılıktan sorumlu olan fosfolipit çift katman ile çevrilidir. Bunların dışında metabolik enzimler, büyüme faktörleri, sitokinler, nükleik asitler de eksozomların yapısında bulunmaktadır (40).



**Şekil 2.1.** Kök hücrelerden salgılanan eksozomların şematik görüntüsü. Eksozomlar endozomal yoldan köken alarak içeriye doğru tomurcuklanıp, sırası ile erken endozom, intraluminal vezikül ve multiveziküler cisim olarak adlandırılır. İntraluminal vezikül oluşumunda lipitler, tetraspaninler gibi birçok molekül rol alır. Multiveziküler cisimler lizozomlar ya da plazma membranı ile füzyon yapabilir. Çok sayıda Rab proteini, multiveziküler cisimin plazma membranına taşınmasında ve eksozom olarak salınmasında aktif rol oynar. Ayrıca SNARE proteini de multiveziküler cisimin plazma membranı ile füzyonunda görev alır. Bir diğer tür olan mikroveziküller ise doğrudan plazma membranından tomurcuklanarak sekrete edilirler. Apoptotik cisimler de programlı hücre ölümü sürecinde hücreden salgılanan üçüncü ekstrasellüler vezikül tipidir (41).

Eksozomlar, taşıdıkları kargoları hedef hücelere plazma membranından füzyon yolu ile aktarabilirler ya da alıcı hücelere fagositoz veya endositoz yolu ile eksozomları hücre içine alabilir ya da reseptör-ligand etkileşimi ile hedef hücre reseptörüne bağlantı sağlayabilirler. Tüm bu üç farklı yol, hedef hücrede fonksiyonel değişikliklere sebep olur (42-44). Sitoplazmik membranı ve kan-beyin bariyerini geçebilmeleri taşıyıcı spesifik tedaviler açısından en kritik özelliklerindedir (45). Hücre içi iletişimde ve moleküler sinyallerde önemli rollere sahip olan eksozomların, ayrıca tümör progresyonunda ve invazyonunda pek çok rolü olduğu literatürde gösterilmiştir (6). Fizyolojik ve patolojik durumlarda hemen hemen tüm vücut sıvılarında eksozomların miktarında artış görülmektedir ve tam da bu nedenle tanı, prognozda ve hedefe yönelik tedavilerde önemli biyo-belirteçler olarak hizmet ederler. Hücreler arası iletişimde kritik rol oynamaları nedeni ile ayrıca eksozomlar, kanser hücrelerinin birbirleriyle ve nişleri ile etkileşimlerinde önemli bir noktada yer almaktadırlar. Yani kanser gelişiminde, yayılımında, tümöral niş oluşumunda, anjiogenezisde ve kanser hücrelerinin proliferasyonunda eksozomlar da rol alırlar (46). Eksozomlar ekstrasellüler alana salındıkları zaman, otokrin, parakrin ve endokrin etkiler görülebilmektedir. Hedef hücrelerine ulaşmalarında birçok farklı biyolojik sinyal yolları devreye girmektedir.

Tükürükten eksozomların eldesi de ilk kez Ogawa ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (47). Daha sonraki çalışmalarda tükürükten elde edilen eksozomların pek çok kanserde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir ve kanser tiplerine özgü eksozomlar/belirteçleri rapor edilmiştir (Tablo2.1). Bu kanserlerden biri de oral skuamöz hücreli kanserlerdir.

**Tablo 2.1.** Tükürükten elde edilen ekstrasellüler veziküllerin hastalık türlerine göre sahip oldukları biyobelirteçler.

Hastalık	EV biyobelirteçleri	Biyobelirteçin tipi	Referanslar
Beyin hasarı ve nörolojik bozukluklar	CDC2,CSNK1A,CTSD	mRNA	(48)
	$\alpha$ -sinüklein	protein	(49)
	CD63	protein	(50, 51)
Oral skuamoz hücreli karsinom	PPIA	protein	(52)
	miR-412-3p, miR-512-3p, miR-27a-3p, miR-494-3p, miR-302b-3p, miR-517b-3p	miRNA	(53)
	BPIFA1, CRNN, MUC5B, IQGAP	protein	(54)
Akciğer kanseri	Aneksin A1, A2, A3, A5, A6, A11, NPRL2, CEACAM1, MUC1, PROM1, HIST1H4A, TNFAIP3	protein	(55)
	miR-486-5p, miR-486-3p, miR-10b-5p, miR-122	miRNA	(56)
Baş ve boyun kanseri	Apbb1ip, Aspn, BCO31781, Daf2, Foxp1, Gng2, Incenp	mRNA	(57)
	miR-1246, miR-4644	miRNA	(58)

Eksozomların bazı vücut sıvılarından ve süpernatantlardan izolasyonunda ve çoğaltılmasında farklı protokoller tanımlanmıştır (59, 60) (Tablo 2.2). Vücut sıvılarından ya da hücre kültürü süpernatantlarından izolasyonda en çok 2000 g'de santrifüj yöntemi kullanılmaktadır. Böylece ölü hücreler elimine edilir. Daha sonrasında 10,000 g'de santrifüj yapılarak eksozomal olmayan veziküller ve hücresel debris uzaklaştırılır. Son olarak 200 nm boyutlarında bir filtreden geçirilerek büyük partiküller elenir ve eksozom içeren süpernatant elde edilir. Bu basamaktan sonra eksozomal yüzey belirteçlerine karşı antikorların kullanıldığı immüno-afinite ayırıştırma yöntemi, 100,000 g'de ultrasantrifüj yöntemi, boyut ayırma kromatografisi, izopiknik santrifüj ve polimer tabanlı presipitatların ultrafiltrasyonu gibi iyi bilinen yöntemler ile ayırıştırma süreci başlatılır (61). Ultrasantrifüj yöntemi en sık kullanılan yöntemlerdendir ve geniş hacimli örneklerde, düşük maliyet ile çalışmaya olanak sağlar. Yoğunluk gradyan santrifüj yönteminde veziküller dolaşım yoğunluklarına göre iyodiksanol ya da sükröz gibi gradyan medyumlar kullanılarak ayırıştırılır. Bu metot eksozom izolasyonunda altın standart olarak düşünülür ve ultrasantrifüj tekniği

ile kombine kullanıldığı zaman özellikle proteomik analizler için yüksek kalitede eksozom izolasyonu yapılabildiği gösterilmiştir (62). Boyut kromatografisi yönteminde minimal protein kontaminasyonu ile yüksek saflıkta sonuç alınır. Ancak yetersiz örnek miktarları eldesi bu yöntemin en önemli dezavantajlarından (63). Eksozom izolasyonunda en basit metot polimer tabanlı presipitasyon yöntemidir. Eksozomlar polietilen glikol gibi polimerler ile inkübe edildikten sonra, düşük hızda santrifüj edilirler. Bu yöntem ile yeterli oranda izolasyon sağlanabilir, ancak eksozomal olmayan partiküller ile kontaminasyon riski mevcuttur (59). Eksozom izolasyonunda en spesifik yöntem immüno-afinite ayrıştırma yöntemidir. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* - ELISA plakaları, immün boncuklar, mikro-fluidik aygıtlar bu kapsamda kullanılabilir (62). Bu yöntemlerin yanında ticari kitler kullanılarak, çeşitli izolasyon tekniklerinin birleştirilmiş olduğu yöntemler de bulunmaktadır (64-67).

**Tablo 2.2.** Eksozom izolasyon yöntemleri.

<b>İzolasyon yöntemleri</b>	<b>Teknik</b>	<b>Avantajlar</b>	<b>Limitasyonlar</b>
Ultrasantrifüj	Eksozom peleti elde etmek için 190-120 dk boyunca 100.000 g üzerinde santrifüj yapılır. Partiküller boyut, şekil ve yoğunluklarına göre ayrıştırılır.	Düşük maliyet. Büyük hacimler için uygun. İlave kimyasal gerektirmez.	Uzun süre gerektirir. Yoğun emek gerektirir. Düşük miktarlar elde edilir. Kontaminasyon riski.
İzopiknik santrifüj	Spesifik gradyen medyum içerisinde 100.000 g üzerinde santrifüj yapılır. Spesifik medyum içerisinde partiküller boyut, şekil ve yoğunluklarına göre ayrıştırılır.	Benzer yoğunluktaki diğer partiküllerden eksozomları ayırtmada oldukça etkili. Yüksek saflık.	Uzun süre gerektirir. Yoğun emek gerektirir. Düşük miktarlar elde edilir. Medyum ayrıştırılırken kontaminasyon riski mevcuttur.
Polimer tabanlı presipitasyon	Örnekler polimerler ile inkübe edilir. Düşük hızda santrifüj ile çöktürülür. Ticari olarak satılan kitler mevcuttur.	Daha az zahmetli. Kolay ekipman. Yüksek oranda eksozom izolasyonu. Geniş hacimler için ölçeklenebilir.	Kontaminasyon Üreticiye bağlı olarak izolasyon etkinliği değişebilir.
Ultrafiltrasyon	Örnekler filtreden geçirilir. Eksozomlar boyutlarına göre ayrıştırılır.	Ultrasantrifüj yöntemine göre daha kısa süre. İlave kimyasal gerektirmez. Spesifik ekipman gerektirmez.	Eksozomal membran ve biyolojik fonksiyonunda hasarlanma riski mevcuttur. Düşük saflık. Düşük izolasyon etkinliği.
Boyut kromatografisi	Örnekler poröz boncuklardan geçirilir. Küçük partiküller porlardan geçerken eksozomlar geçemez. Moleküller boyutlarına göre ayrıştırılır.	Yüksek saflık. İlave kimyasal gerektirmez. Eksozomların yapısı ve biyolojik aktivitesi bozulmaz.	Düşük miktarlar elde edilir. Çoğunlukla küçük hacimli örnekler için uygundur.
İmmüno-afinite yakalama	Eksozom spesifik antijenlere antikorların bağlanması ile reseptör-ligand etkileşimi olur.	Yüksek seçicilik ve saflık. Eksozom alt gruplarının izolasyonu bile mümkün.	Antikorlar ile kontaminasyon riski. Eksozomal fonksiyonlar kullanılan tamponlardan dolayı etkilenebilir. Yüksek maliyet. Örnekler antikor bağlanması öncesi hücresiz hale getirilmeli. Eksozoma spesifik belirteçler iyi bir şekilde karakterize edilmeli.

Literatürde eksozomların içeriklerine ve fiziksel özelliklerine göre birçok karakterizasyon yöntemi tanımlanmıştır. Eksozomlar konvansiyonel mikroskopik yaklaşımlar ile tespit edilemedikleri için, elektron mikroskop teknikleri kullanılmaktadır (68). Konvansiyonel görüntüleme yöntemleri ile karşılaştırıldıklarında elektron mikroskoplar teknik olarak daha zor yaklaşımlardır. Alternatif olarak partikül takip analizleri kullanılabilir ancak bu morfolojik analiz, izole edilen eksozomların fonksiyonları hakkında veri sağlayamaz (69). CD9, CD63, CD81, tetraspaninler, TSG101, gibi belirteçler eksozomların fonksiyonel belirteçleri olarak kabul edilir (70). Ancak literatürde fonksiyonel belirteçler açısından henüz ortak bir görüş sağlanamamıştır. Floresan boyalar ile işaretlenmiş eksozomlar akım sitometri gibi floresan incelemeye dayalı yöntemler ile de analiz edilebilir. ELISA veya AsetilCoA kolinesteraz kolorimetrik metotlar da total protein miktar tayinlerinde tercih edilebilir.

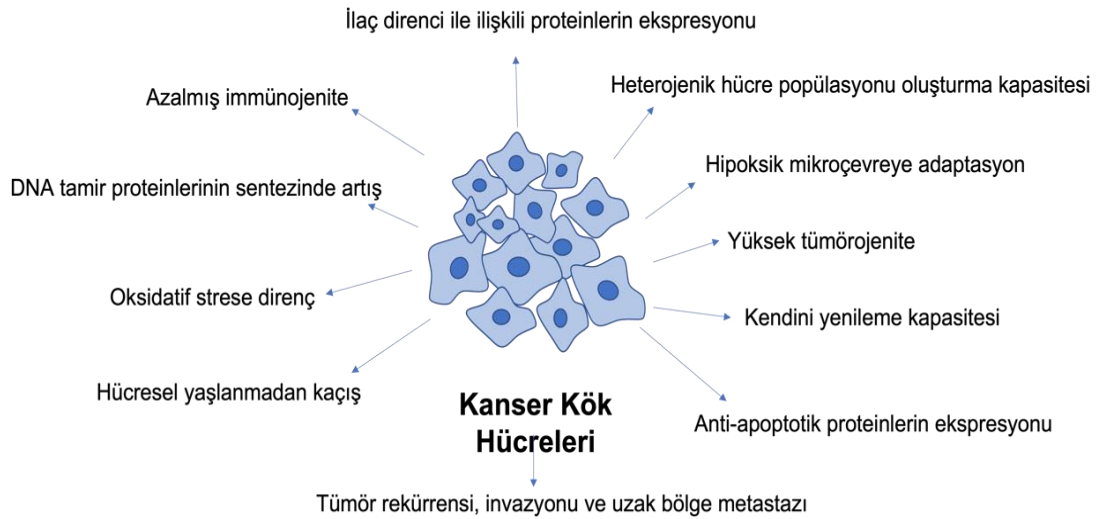
#### **2.4. Kök Hücreler ve Eksozomları**

Kök hücreler kendilerini yenileyebilme, başka hücre tiplerine farklılaşabilme, asimetric bölünme özelliklerine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Asimetric bölünme, farklılaşacak hücre ve kök hücre özelliğini koruyan iki hücre oluşumu ile sonuçlanır. Böylece kök hücre sayılarında artış veya tükenme meydana gelmeden, miktar korunur (71). Kök hücreler vücutta; embriyoda, fetal, erişkin hücrelerde ve kanser hücrelerinde bulunurlar. Farklılaşma kapasitelerine göre üç gruba ayrılırlar. Totipotent kök hücreler en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip ve tüm organizmayı oluşturan hücrelerdir. Zigot ve ekstraembriyonik dokular totipotent hücrelerden oluşmaktadır. Pluripotent kök hücreler, ekstra-embriyonik yapılar dışında tüm germ yapraklarını oluştururlar. Pluripotensi bir süreçtir ve başlangıçta bütünü ile pluripotent özellik gösteren hücreler içerisinde, embriyonik kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPKH), yer alırken daha sonra pluripotensinin azaldığı multi-, oligo- ve unipotent hücreler devreye girer. Multipotent kök hücreler ise kısıtlı farklılaşma özelliklerine sahiptir ve spesifik hücre hatlarına farklılaşırlar (72). Ayrıca kök hücreler kökenlerine göre de beş gruba ayrılırlar: embriyonik kök hücreler, erişkin kök hücreler (mezenkimal ve hematopoetik kök hücreler gibi), fetal kök hücreler, iPKH'ler ve kanser kök hücreleri (73).

Kanser gelişimi malign hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize bir durumdur. Literatürde, tümör içerisinde hücre çeşitliliği açıklayan iki farklı model sunulmuştur. Birinci model, stokastik model olarak da adlandırılır, birbirini izleyen mutasyonların birikmesi ile kanser gelişiminin başlamasını ve ilerlemesini tanımlar. Bu klonal gelişim modelinde tümöral dokuyu oluşturan her bir hücre benzer potansiyele sahiptir. İkinci model, kanser kök hücresi hipotezi, ise küçük bir grup kök hücre benzeri hücrelerin kanser gelişiminde rolü olduğunu ileri sürer. Böylece hiyerarşik bir şekilde yapılanmış olan tümör dokusu, kendilerini yenileme özelliği gösteren kanser kök hücreleri tarafından idame ettirilir. Bu kanser başlatıcı hücreler piramidin en alt basamağında bulunur ve tümör dokusu içerisinde yüksek proliferasyon özelliği gösteren hücrelerin oluşumundan sorumludurlar (74). Bu iki modelin birlikte yorumlanması kanser gelişimini anlamada yol gösterici olabilir. Ancak literatürde çok daha kompleks senaryolar da yer almaktadır. Farklılaşmış kanser hücreleri ya da erişkin kök hücreler gibi pek çok farklı hücrenin, kanser kök hücrelerinin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (75).

Kanser kök hücreleri, tümöral dokuya heterojenik özellik sağlayan kanser hücrelerinin küçük bir alt grubu olarak tanımlanmaktadır. Kısıtlı hücre sayısından güçlü tümör oluşturma potansiyeline sahiptirler, kendilerini yenileme kapasitesi gösterirler ve farklılaşma özelliğine sahiptirler. Sadece sağlıklı hücrelerde oluşan mutasyonlar sonucunda değil, aynı zamanda progenitör hücrelerden de köken alabilirler. Bu hücrelerin ileri genetik değişimlere maruz kaldıkları ve bu nedenle yeniden farklılaşarak kanser kök hücresi özellikleri gösterdikleri düşünülmektedir. Kanser kök hücreleri, hücrelerin fonksiyonel özelliklerini yansıtırken, kökenlerini göstermezler (76, 77). Normal kök hücrelerde olduğu gibi kanser kök hücrelerinin mikro-çevresinde de çeşitli hücresel kompozisyon barındıran, vasküler dokudan ve konnektif stromadan oluşan niş mevcuttur. Bu mikroçevre, kanser kök hücrelerini kendi kendini yenileyebilmeleri ve devamlılık sağlayabilmeleri açısından destekler. Bu mikroçevrenin hücresel kısmı, kanser kök hücrelerinin metastazına neden olan sinyal yollarını indükleyebilir ve programlı hücre ölümlerine engel olabilir. Niş içerisinde yer alan kanser kök hücreleri, tedavi direncinin oluşmasını, genotoksik etkilerin önlenmesini ve hatta kanser hücrelerinin fenotipini etkileyebilir. Sekrete olan moleküller de kanser kök hücrelerinin devamlılığında etkilidir (78, 79).

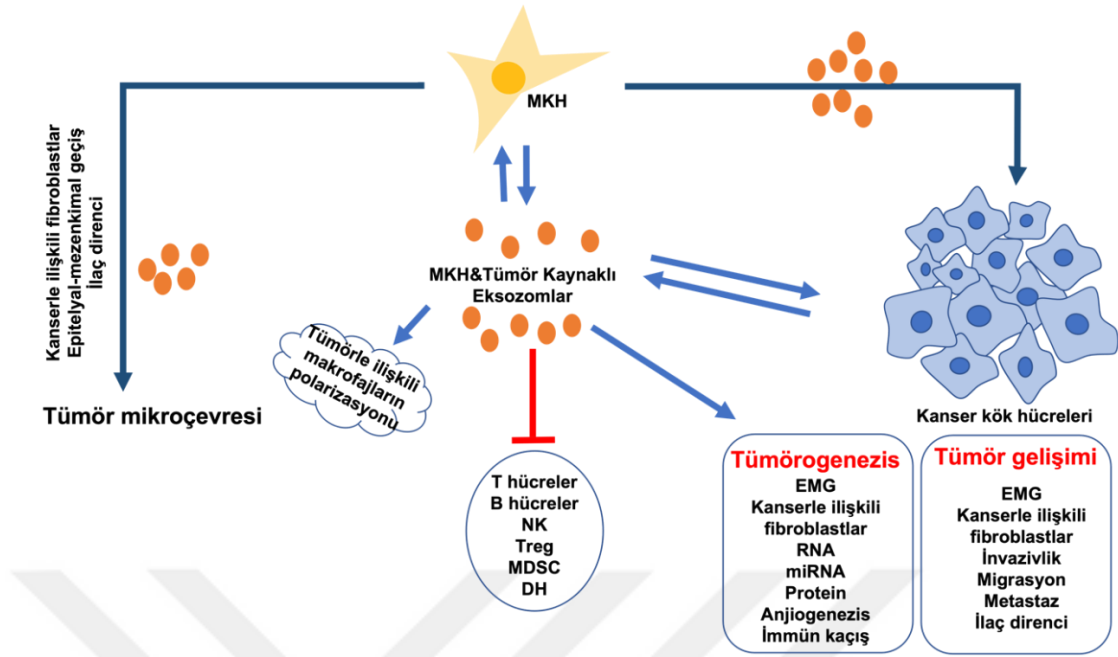
Baş ve boyun kanserleri heterojen hücrel popülasyondan oluşan solid tümörlerdir. Hücreler değiştirilmiş fenotipik özellikler gösterirler ve kemoterapi / radyoterapiye direnç gösterirler (80). Preklinik ve klinik çalışmalar, kanser kök hücrelerinin beslenme azlığı, hipoksi gibi değişen ortam şartlarına kolaylıkla uyum sağladıklarını göstermiştir. Altta yatan moleküler mekanizma tümüyle aydınlatılmış olmasa da, bu hücrelerin reaktif oksijen radikallerinden kurtulmak için ileri seviye mekanizma geliştirdikleri gösterilmiştir (81). DNA tamir mekanizmalarının ileri düzeyde geliştiği, hücrel olarak hayatta kalma seviyelerinin arttığı ve apoptotik yolların baskılandığı kanser kök hücreleri için belirtilen özelliklerdir (Şekil 2.2). Prince ve arkadaşları baş ve boyun kanserlerinde kanser kök hücrelerinin varlığını ilk kez tespit etmiştir (82). Literatürde baş ve boyun kanserlerinde yer alan kanser kök hücreleri için önemli belirteçler CD89, CD44, CD10, CD133, *aldehit dehidrogenaz* (ALDH) olarak tanımlanmıştır (83-87). Bu belirteçlerin bazılarının ekspresyon seviyelerinde artış ile tedaviye direnç arasında korelasyon bulunmuştur. Tüm bunların ışığında, spesifik belirteçlerin prognoz takibinde ya da tanıda biyolojik indikatörler olarak kullanılabilmesi kişiye özel tedavi modalitelerinin geliştirilmesinde çığır açıcı olabilir.



**Şekil 2.2.** Kanser kök hücrelerinin özellikleri (88).

Baş ve boyun skuamoz hücreli kanserlerinde, kanser kök hücreleri artmış ALDH seviyeleri ile tespit edilmektedir. ALDH sitozolik enzimler ailesindedir ve fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynar (89). Ayrıca Sox2, Oct4 ve Nanog köklülük transkripsiyon faktörleri de kanser kök hücreleri fenotipiyle uyumlu olarak saptanmıştır. Ancak yine de baş boyun kanserleri için kesin biyo-belirteçlerin saptanması zordur ve halen çalışılan bir araştırma konusudur (90, 91). CD44 baş boyun kanserlerinde bulunan kanser kök hücrelerinin kültüründe en sık tespit edilen belirteç olarak tayin edilmiştir. CD44'ün izoformu olan CD44v3'ün seviyesi baş boyun kanserlerinde kanserin evresi ile ilişkili bulunmuştur (92, 93).

Kanser kök hücrelerinden salgılanan eksozomlar tümör mikro-çevresini etkilemektedir. Bu eksozomlar diğer malign hücreler ile iletişim kapasitesine sahiptirler veya tümör gelişimini destekleyecek şekilde çevre sağlıklı dokuları modifiye edebilirler (94). Yani kanser kök hücrelerinden salgılanan eksozomlar kanser gelişimi sürecinde oldukça önemli rollere sahiptirler (Şekil 2.3). Uzak bölge metastazları için de uygun ortam hazırlarlar. Yine literatürde bu eksozomların, kemoterapi direncinde, tümör vaskülarizasyonunda, ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesinde ve epitelyal-mezenkimal geçişte önemli rol oynadığı gösterilmiştir (95). Ayrıca, eksozomlar fibroblastlar gibi niş yapısında bulunan hücreler ile kanser hücreleri arasında da iletişimde görev alır. Kanser hücrelerinden salgılanan eksozomlar ile taşınan onkojenik miRNA'ların, pre-metastatik niş oluşumunu desteklediği yapılan son çalışmalarda gösterilmiştir (96). Kanser kök hücrelerinden salınan eksozomlar, tümörle ilişkili baskılayıcı myleoid hücreleri ve makrofajları aktive ederek, doğal öldürücü hücreleri ise baskılayarak immün kaçışa katkıda bulunurlar (97). Ayrıca, bu salgılanan eksozomlar, PDL-1, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-  $\beta$ ), Fas ligand ve tümör nekroz faktörü ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) salgılayarak T hücreler üzerinde immünsüpresif etkiye sahiptir (98, 99).



**Şekil 2.3.** Baş ve boyun kanseri hücrelerinden salgılanan eksozomların tümör mikroçevresindeki fonksiyonlarının şematik görüntüsü. Eksozomlar T hücrelerin, B hücrelerin, NK hücrelerin fonksiyonlarını baskılayarak ve Treg'lerin, MDSC'lerin aktivitelerini ve DH'lerin farklılaşmasını inhibe ederek immün sistem hücrelerine müdahalede bulunurlar. Aynı zamanda tümörle ilişkili makrofajların polarizasyonunu etkilerler. Tümör kaynaklı eksozomlar tümör mikroçevresini, tümör oluşumunu ve gelişimini etkilerler. Kısaltmalar: DH: dendritik hücreler, NK: doğal öldürücü hücreler, Treg: düzenleyici T hücresi, MDS:C myeloid kaynaklı supresör hücre, MKH: mezenkimal kök hücreler.

MKH'ler kendilerini yenileme özelliklerine sahip, multipotent kapasitede stromal hücrelerdir. Güçlü immünsupresif ve rejeneratif etkilerinden dolayı sıklıkla hücresel terapilerde kullanılırlar (100). Bu terapötik etkilerini parakrin sekresyonla salgıladıkları sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri aracılığı ile gösterirler (101). Altta yatan mekanizmalar bütünüyle aydınlatılmamış olmakla birlikte, hücresel tedavilerde kullanımları halen araştırılan konulardan biridir. MKH'ler faydalı terapötik etkilerine rağmen, ektopik doku formasyonu oluşturmaları, alıcıda immün reaksiyonlara sebep olmaları, infüzyonel toksisite yapmaları ve tümör formasyonu oluşturabilme riskleri nedeni ile çok güvenli seçenekler değildir (102).

Literatürde solid ve hematolojik tümörlerin invazivliğinden sorumlu olarak MKH'ler gösterilmektedir (103). Baş ve boyun kanserlerinde, MKH'ler anjiogeneziste, immün cevabın kontrolünde, tümör ile ilişkili miyofibroblastların sekresyonunda rol oynarlar. Kan ya da lenfatik anjiyogenezisler ise kanser hücrelerinin

metastazında primer rol oynar (104). Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve interlökin (IL)-8 baş boyun kanserlerinde yüksek oranda eksprese edilen ve tümör agresifliğinden ve kötü prognoz ile ilişkilendirilen pro-anjiyojenik regülatörlerdir. MKH'ler ayrıca endotel hücreler/perisitler için prekürsör olarak davranarak da anjiyogenezisi uyarır (105, 106). VEGF ile birlikte MKH'ler gösterdikleri ekspresyon profilleri (vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM)-1, von-Willebrand Faktör (vWF), Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü (VEGFR)-1, VEGFR-2 ve E-kaderin ekspresyonu gibi) açısından endotel hücresi karakterine bürünürler. MKH'ler perisitler ile birlikte hipoksik tümör alanlarında yeni kan damarı formasyonunu indüklerler (107). Özellikle pre-kanseröz durumlar ve baş ve boyun bölgesi skuamöz hücreli karsinom nişi için önemli hücresel elemanlardır.

### **2.5. Epitelyal-Mezenkimal ve Mezenkimal-Epitelyal Geçiş Fenomeni**

Epitelyal-mezenkimal geçiş fenomeni, mobil olmayan epitel hücrelerinin fibroblast benzeri mezenkimal hücrelere polarize olmasını tanımlar (108). Mezenkimal-epitelyal geçiş ise bunun tersi yöndeki süreci tanımlar (109). Epitel hücrelerinin bu geçişleri geri dönüşümlü olabilir, parsiyel olarak olabilir ya da bütünüyle gerçekleşebilir. Epitelyal-mezenkimal geçişe uğrayan yeni hücreler yüksek derecede migrasyon, invazyon ve uzak bölgelerde kolonizasyon kapasitesine sahiptir. Aynı zamanda tümör mikroçevresinde Matriks Metalloproteinaz Enzimleri (MMPs)'nin ekspresyonlarında artışa neden olurlar (110). Ayrıca, epitelyal-mezenkimal ve mezenkimal-epitelyal geçiş embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmasını, uyarılmış pluripotensiyi ve kanser kök hücrelerinin davranışını kontrol eder (109). Epitelyal-mezenkimal geçiş gelişimin ayrılmaz bir parçası iken altta yatan süreçler yara iyileşmesi, fibrozis ve kanser gelişiminde tekrardan aktifleştirilir (111). Epitelyal-mezenkimal geçiş SNAIL, çinko parmak E-kutu bağlayıcı protein ve temel helix-loop-helix transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilir. Birçok onkojenik yolak, hipoksi durumu, viral enfeksiyonlar epitelyal-mezenkimal geçişte önemli rol oynar. Literatürde üç farklı tipte epitelyal-mezenkimal geçiş tanımlanmıştır (109). Tip I epitelyal-mezenkimal geçiş embriyogenezis ve organ gelişiminde görülürken, tip II epitelyal-mezenkimal geçiş doku rejenerasyonunda ve organ fibrozisinde rol oynar. Tip III epitelyal-mezenkimal geçiş ise kanser gelişimi ve

kanser kök hücreleri özellikleri ile ilişkilendirilir (112). Ayrıca mezenkimal-epitelyal geçiş de metastatik karsinomların gelişimine katkı sağlar (113). Fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), kemik morfogenetik protein (BMP) - 2, BMP - 7, Wnt ve Akt mezenkimal-epitelyal geçiş ile ilişkilendirilen faktörlerdir (114). Literatürde meme kanseri ve prostat kanseri vakalarında BMP - 7'nin metastatik potansiyel ile tersine yönde, E-kaderin ve vimentin ekspresyonu ile de pozitif yönde ilişkili olduğu saptanmış ve böylece mezenkimal-epitelyal geçiş ile ilişkisi öne sürülmüştür (115, 116). Deneysel bir hayvan çalışmasında, farklı fenotiplerdeki kanser hücrelerinin arteriyel sirkülasyona inoküle edilmesi ile seçici metastaz gelişimi gözlenmiştir ve böylece mezenkimal-epitelyal geçiş uyaranlarının metastaz formasyonundaki rolü gösterilmiştir (117). Oral skuamöz hücreli kanserde ve prostat kanserinde CD44 ve vimentin ekspresyonları artmaktadır ve bu durum patoloji varlığında CD44'ün endotel hücrelerinin yüzeyindeki vimentinin baş bölgesine tutunması ile uyumluluk gösterir (118). **Literatürde karsinomların her zaman epitel hücrelerinden değil, kemik iliğinden kaynaklanan MKH'lerden geliştiğini de gösteren hipotezler mevcuttur (7, 119, 120). Kemoterapi sonrasında kemik iliğinden kaynaklanan hücrelerden sarkom, epitelyal tümör ve nöral tümör gibi farklı tümör tiplerinin geliştiği gözlenmiştir (121). İnsan kemik iliği MKH'lerinin spontan olarak mezenkimal-epitelyal geçiş modeli literatürde tanımlanmıştır (122).**

Vimentin tip III ara filamandır ve hücresel yapının ve doku bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynar. Fibroblastlar, endotel hücreleri, lenfositler ve özelleşmiş beyin hücrelerinde vimentin görülür (123). Malign durumlarda vimentinin yüksek miktarlarda ekspresyonu tümörögenезis, epitelyal-mezenkimal geçiş ve metastaz ile ilişkilidir (124). Özelliklerinden dolayı vimentin, baş ve boyun kanserlerinde tümör büyümesinde, zayıf tümöral farklılaşmada ve lenf nodu metastazlarında biyo-belirteç olarak düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, baş ve boyun kanserlerinde vimentinin yüksek ekspresyon seviyeleri E-kaderin'in düşük ekspresyon seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (125, 126).

İntegrin alfa 6 kök hücrelerin kendilerini yenileme ve köklülük özelliklerinin kontrolünde önemli fonksiyonlara sahiptir (127). Ekspresyon seviyelerindeki artış proliferasyon, migrasyon ve klonojenite ile ilişkilendirilir. Yapılan bir çalışmada

integrin alfa 6'nın MKH progenitör potansiyeli tahmini için aday olabileceği söylenmiştir (128). MKH'lerin konfluense ulaşmaları durumunda integrin alfa 6 ekspresyon seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. Ayrıca integrin alfa 6 seviyelerinde düşüş veya inhibisyon olmasının, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin migrasyonunda bozukluğa sebep olduğu belirtilmiştir (128). İntegrin alfa 6 normalde embriyonik kök hücrelerde eksprese edilmekle birlikte, literatürde solid tümörlerde kanser kök hücrelerinin oluşumu ile de ilişkilendirilmiştir (129, 130). Meme kanseri, prostat kanseri ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde integrin alfa 6 kanser kök hücrelerinin kendilerini yenileme kapasitesini, radyasyon direncini ve hasta sağ kalım oranlarını etkiler (131-133). Ayrıca integrin alfa 6 ekspresyon seviyeleri ile baş ve boyun skuamoz hücreli karsinomlarda hasta sağ kalım oranları korele bulunmuştur (134).

Kanser kök hücrelerinin uyarılması ile ilişkilendirilen epitelyal-mezenkimal geçişte hücreler, MKH karakteri kazanarak CD44 ekspresyonu için pozitifleşirler (135). CD44 MKH yüzey belirteci olmakla birlikte kanser kök hücreleri için de önemli bir biyo-belirteçtir. CD44 negatif hücreler tümörojenik olarak kabul edilmez iken, CD44 pozitifliği kanser kök hücrelerinin tespitinde önemli bir belirteç olarak görülür. Bu görüş baş ve boyun kanserlerinde kanser kök hücrelerinin saptanmasında da geçerlidir (136). Literatürde, CD44+ / CD133+ kolon kanseri hücrelerin, CD44- / CD133- kolon kanser hücrelerine göre daha karsinojenik ve agresif olduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir (137). CD133 (prominin) 5-transmembran glikoproteinidir ve önceden esas olarak hematopoetik kök hücre belirteci olarak bilinmekteydi (138). Ancak son yıllarda baş ve boyun kanserinde, kolon kanserinde, prostat kanserinde, hepatosellüler karsinomlarda ve tiroid bezi kanserlerinde saptanan kanser kök hücrelerinin önemli yüzey belirteci olarak düşünülmektedir (139-144). Literatürde yapılan bir çalışmada, baş ve boyun skuamoz hücreli kanserlerde, CD133 ekspresyonu artması ile köklüklük ile ilişkili genlerin (Oct4 ve Nanog) ekspresyonunun ve tümörojenik kabiliyetin arttığı gösterilmiştir (145). Yine aynı çalışmada CD133+ hücrelerin baş ve boyun kanserlerinde, tümör gelişiminin başlatılmasında ve epitelyal-mezenkimal geçişin kontrolünde önemli rol oynadığı belirtilmiştir.

## 2.6. Oral Mikrobiyotanın Kanser Gelişimindeki Rolü

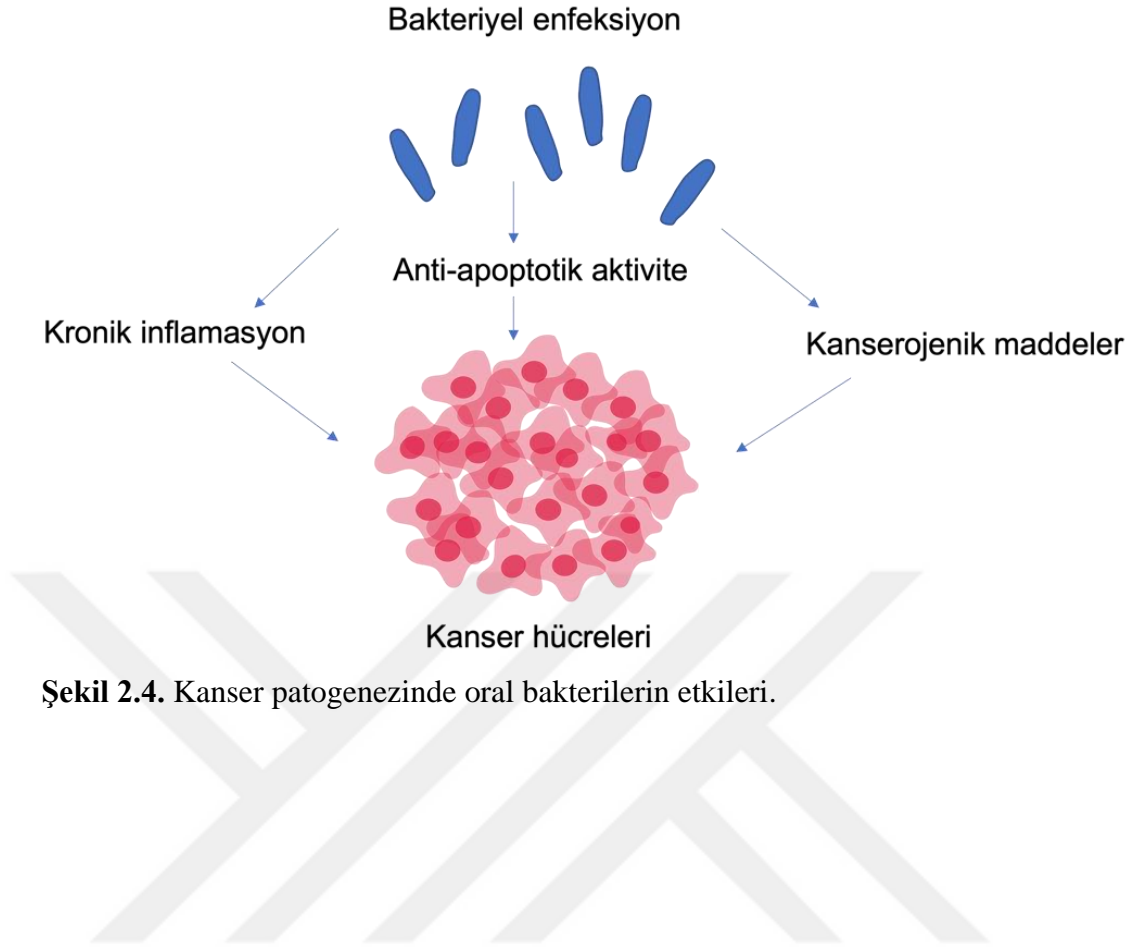
Skuamoz hücreli kanser gelişiminde sigara, alkol kullanımı, yaşlanma gibi bilinen risk faktörleri vardır. Ancak bazı koşullarda, belirtilen risk faktörlerinin yokluğunda skuamoz hücreli kanser gelişimi dikkat çekicidir ve bu durumda da oral mikrofloranın kanser gelişimindeki rolü ön plana çıkmaktadır. Baş boyun kanserleri epitel hücrelerinden ve mukozadan köken alan, oral kavitede ve farengeal alanda lokalize olan patolojilerdir. Her iki alan da, sürekli olarak çevresel faktörlere maruz kalır. Bu maruziyet de oral mikrobiyotada değişikliklere sebep olabilir (8). Yapılan kohort çalışmalarında, spesifik bakteri florasının varlığının baş ve boyun kanser gelişimi riskini arttırdığı belirtilmiştir (9, 10). Ayrıca HPV pozitifliği ya da negatifliği ve tümör lokalizasyonunun, oral mikrobiyotanın kompozisyonunda değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir (146). Kanser ile ilişkili oral mikrofloranın tam olarak ayırt edilmesi oldukça zor olsa da, yine de floral değişikliklerin ve spesifik bakteri türlerinin tanıda, tedavide ve takipte umut vaad eden belirteçler olduğu düşünülmektedir (Tablo 2.3). Spesifik kanser türleri için biyobelirteç olarak belirtilen spesifik oral bakteri türleri, hastalık durumunda sayıca artış göstermektedir. Bu nedenle bu bakteri türlerinin yoğunluğunda artış tespit edilmesi klinik açıdan önem kazanmaktadır.

**Tablo 2.3.** Baş boyun bölgesi spesifik kanser türleri için biyobelirteç olarak oral bakteri türleri.

Kanser lokalizasyonu	Biyobelirteç olarak oral flora bakterileri	Referans
Oral skuamoz hücreli karsinom	<i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Capnocytophaga gingivalis</i> ,	(147)
	<i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Bacillus</i> ,	(11)
	<i>Enterococcus</i> , <i>Parvimonas</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Slackia</i> ,	
	<i>Streptococcus sp. 058</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S.</i>	(148)
	<i>parasanguinis</i> , <i>Peptostreptococcus stomatis</i> , <i>Gemella</i>	(149)
	<i>haemolysans</i> , <i>G.morbilorum</i> , <i>Johnsonella ignava</i> ,	(150)
	<i>Capnocytophaga gingivalis</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> ,	(151)
	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>	
Gingival skuamoz hücreli karsinom	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	(151)
Oral mukozal kanser	<i>Streptococcus intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. oralis</i> ,	(12)
	<i>S. mitis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>Peptostreptococcus sp.</i>	
Baş ve boyun bölgesi skuamoz hücreli karsinomu	<i>Streptococcus sp. and Lactobacillus sp.</i> , <i>Streptococcus</i>	(152)
	<i>anginosus</i>	(153)
Özafagus kanseri	<i>Streptococcus anginosus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Treponema denticola</i> ,	(154)
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i>	(155)

Literatürde, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Capnocytophaga* türlerinin skuamoz hücreli kanserler ile ilişkili olabilecek bazı oral bakteri flora üyeleri olduğu belirtilmiştir. Bu türler hastalık durumunda baskın iken, sağlıklı mukoza varlığında *Rothia*, *Lautropia*, *Haemophilus* türlerinin baskın olduğu tanımlanmıştır (156). Mager ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kanser hastası olmayan hastalar ile oral skuamoz hücreli kansere sahip hastalar 40 farklı oral bakteri türü açısından incelenmiştir. *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* ve *Streptococcus mitis* türleri kanserli hastaların tükürük örneklerinde yüksek miktarda bulunmuştur. Bu üç bakteri türünün kanser durumlarında tanısız belirteç olarak kullanılması önerilmiştir (11). Yapılan bir başka çalışmada baş ve boyun kanserli hastalarda servikal lenf nodlarından en fazla izole edilen bakteri türlerinin oral streptokoklar olduğu saptanmıştır (12).

Literatürde, zayıf oral hijyen ve diş kayıpları ile oral skuamoz hücreli kanserin ilişkili olduğunu gösteren epidemiyolojik çalışmalar mevcuttur (157, 158). Skuamoz hücreli kanser gelişiminde, bazı bakterilerin neden olduğu kronik enfeksiyon oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Literatür incelendiğinde bakteriyel enfeksiyon üç farklı yol ile kanser gelişimine neden olabilir (159) (Şekil 2.4). Birincisi, enfeksiyonun sebep olduğu kronik inflamasyondur. Salınan inflamatuvar medyatörler (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-23, TNF-  $\alpha$ , MMP-8, MMP-9) hücre proliferasyonunu, onkogenik aktivasyonu ve anjiogenezisi kolaylaştırır. İkincisi, anti-apoptotik yolların aktivasyonudur. Özellikle *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* gibi patojen mikroorganizmalar bu basamakta rol oynarlar. Üçüncüsü ise bakteriler tarafından salınan asetaldehit, N-nitrozamin bileşikleri gibi genotoksik aktivite gösteren maddelerdir.



Şekil 2.4. Kanser patogeneğinde oral bakterilerin etkileri.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta örneklerinin toplanması ve tüm deneysel çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı (GO 20/595) ile Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı'nda, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Tükürük Örneklerinin Toplanması

Hacettepe Üniversite Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran baş ve boyun bölgesi kanserli altı hasta çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalarda baş ve boyun kanser tanısı konulmuş olup, hastaların daha önceden radyoterapi, kemoterapi, cerrahi veya alternatif başka bir tedavi görmemiş olması kriteri göz önünde bulunduruldu. Kontrol (sağlıklı) grubu olarak baş ve boyun kanser tanısı olmayan, rutin diş işlemleri için başvuran, son 15 gün içerisinde antibiyotik kullanmamış altı hasta çalışma kapsamında değerlendirildi. Kliniğe başvuran çalışma kapsamındaki tüm hastalar için klinik bilgilerin saklanması amacı ile hasta muayene kayıt formları dolduruldu.

Araştırma kriterlerine uyan ve aydınlatılmış onam alınmış hastalardan uyarılmamış 3 ml x 2 miktarında tükürük örnekleri steril tüpler içerisinde toplanarak ve sonraki deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere -80° C'de muhafaza edildi. Örnekler sabah saatlerinde, ağız su ile çalkalandıktan sonra alınmış olup, öncesinde hastalar en az bir saat kadar yemek ve içecek tüketmemesi konusunda uyarıldı.

#### 3.2. Tükürük Örneklerinden Eksozomların İzolasyonu

Tükürük örneklerinden eksozom eldesinde "Saliva Exosome Purification Kit (Norgen, Biotek)" ticari kiti kullanıldı. Her hastadan 6 ml örnek olacak şekilde tükürük toplanarak, örneklere fosfat tamponlu salin (PBS, Sigma) ilave edilerek örnekler dilüsyonları gerçekleştirildi. Dilüe örnek, eksfoliy hücrelerin ve debrinin uzaklaştırılması amacı ile 1000 rpm'de (santrifüj: eppendorf 5810 R, rotor: A-4-62) 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Hücresiz seyreltilmiş örneği yeni bir 15 ml'lik

konik tüpe aktarıp, rezidüel debriyi veya bakteri hücrelerini gidermek için örnek tekrardan 10 dakika boyunca 3000 rpm’de santrifüj edildi. Hücresiz seyreltilmiş tükürük örneği tekrardan 15ml’lik yeni konik tüpe aktarılıp eksozom saflaştırması için hazır hale getirildi.

Elde edilen hücresiz seyreltilmiş örneğe 6 µL Exo C tampon ve ardından 200 µL Slurry E eklendi. Örnek 10 saniye vorteksleme işleminden sonra, 2000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatanı uzaklaştırdıktan sonra, bulamaç peletine 200 µL ExoR tampon ilave edilip, 10 saniye boyunca vorteksledi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonu takiben tekrardan 10 saniye vorteksledikten sonra 2 dakika boyunca 1000 rpm’de santrifüj yapıldı. Süpernatan 2 ml tüp ile kombine edilmiş Mini Filter Spin’e aktarılıp 6000 rpm’de (santrifüj: Beckman Coulter Microfuge 16, rotor: A46544) 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Son ürünler karakterizasyonlarının yapılması için -80°C’de depolandı.

### **3.3. Eksozomların Karakterizasyonu**

Eksozomal karakterizasyon için “Human Tumor-derived Exosome Enrichment and Quantification ELISA Kit (Novus, Bio-Techne)” kullanıldı. Tükürük örneklerinden izole edilen eksozomal proteinlerin kantifikasyonu ve karakterizasyonu, eksozomla ilişkili antijenlere karşı uygun antikorların eşleşmesi ile sağlandı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda: eksozom izolasyonu yapılarak hazır hale getirilmiş her bir tükürük örneğinden 100 µl miktarında alınarak kuyucuklara eklenip, plaka üzeri parafin ile kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında plaka 37°C’de inkübatör içerisinde gece boyunca inkübe edildi. Ardından her bir kuyucuk ilk olarak 200 µl yıkama tamponu ile bir kez, daha sonrasında 300 µl yıkama tamponu ile üç kez yıkandı. Yıkamaları takiben her bir kuyucuğa 100 µl alfa CD9 antikor solüsyonu ilave edilip, plaka parafilm ile kapatılıp 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak plaka 37°C’de iki saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonu takiben yukarıda anlatılan yıkama işlemlerinden sonra, her bir kuyucuğa 100 µl HRP konjüge sekonder antikor solüsyonu ilave edildi. Plaka tekrar parafilm ile kapatıldıktan sonra 15 dakika boyunca, oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 37°C’de 1 saatlik inkübasyondan sonra yukarıda anlatıldığı gibi yıkama işlemi tekrarlandı. Inkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 100 µl substrat kromojenik

solüsyon ilave edilip plaka oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 2-5 dakika kadar inkübasyona bırakıldı. Mavi renk görünür hale gelince her bir kuyucuğa 100 µl durdurucu solüsyon ilave edildi. Mavi renkten sarı renge dönüş gözlemlendikten sonra mikrolaka okuyucu cihaza (Tecan) yerleştirildi. Okumalar 450 nm dalga boyunda gerçekleştirildi (n=6). Örnekler ileriki çalışmalar için birleştirildi.

Baş-boyun kanseri belirteci CD133 pozitif eksozom seçilimi için manyetik boncuklar ile MACS yöntemi uygulandı (Mitenyi Biotec). Elde edilen 2.5 ml tükürük örneğine 1 ml PBS ekleyerek 3.5 ml son hacime ulaşıldıktan sonra, 300 g'de 10 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Daha sonra örneğe 20 µl FCR ve 20 µl CD133 mikro boncuklar ilave edilerek, örnek 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. LS kolon işlem öncesinde 3 ml MACS tampon ile ıslatıldıktan sonra örnek uygulandı. Daha sonra kolon 3 defa MACS tampon ile yıkandı ve manyetik alanda kalan eksozomlar toplandı.

Sağlıklı ve hasta tükürük örneklerinden elde edilen eksozomların CD63 eksozom belirtecine karşı pozitiflikleri akım sitometri ile tayin edildi. Bu işlem için anti-insan CD63 floresein izotiyosiyanat (FITC, Becton Dickinson (BD)) kullanıldı. Hücrelerin antikor ile 1 saat 4°C'de işaretlenmesinin ardından FACs tamponu ile yıkamalar sonucunda Novocyte (ACEA) cihazı ile NovoExpress programı kullanılarak ölçümleri yapıldı (Hacettepe Üniversitesi, Translasyonel Tıp Araştırma Laboratuvarı).

### **3.3.1. Eksozomların Morfoloji ve Büyüklük Tayini**

İzole edilen eksozomların morfolojileri ve büyüklükleri geçirimli elektron mikroskopu (TEM, JEOL JEM-1220) ile tespit edildi. Bu işlem için örnekler 10 µl grid üzerine uygulandı ve 1 dakika inkübe edildi. Ardından örnekler 1-2 dakika paraformaldehit (Sigma) ile inkübe edildi. Uranil asetat ile grid üzerindeki örnekler boyandı. Bu işlemler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

### 3.4. Tükürük Örneklerinden Bakterilerin İzolasyonu

Toplanan tükürük örneklerinin 0.5 ml'si 9.5 ml serum fizyolojik içinde seyreltilerek potasyum tellürit içeren Mitis Salivarius Agar'a (Anaerobe Systems) ekimleri yapıldı ve 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda iki gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Üreyen koloniler hemoliz yönünden incelenip ayrıca gram boyamada gram pozitif kok gözlenen, katalaz negatif, optokin'e dirençli izolatlar, *S. mitis* için özgül 16srRNA primer dizileri kullanılarak konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulandı.

#### 3.4.1. *Streptococcus mitis* Bakterilerinden DNA İzolasyonu ve PZR Reaksiyonu

*S. mitis* saf kültürlerinden DNA izolasyonu ticari DNA ekstraksiyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu amaçla, *S. mitis* bakterileri %5 koyun kanlı agarda üretildi ve içerisinde 0.5 ml Tris EDTA (TE) tampon bulunan 1.5 ml ependorf tüplerine aktararak 7500 rpm'de 10 dakika çöktürüldü. Bakteri peleti üzerine 20 mg/ml lizozim içeren 20 mM Tris.HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA solüsyonunun 180 µl'si aktarıldı ve 37°C'de yarım saat inkübe edildi. Bu süspansiyonun içine 20µl proteinaz K ve 200 µl AL tamponu eklenerek iyice karıştırıldı ve ilk olarak 56°C'de yarım saat sonrasında da 95°C'de 15 dakika inkübe edildi. Birkaç saniye santrifüj edildikten sonra supernatant dökülerek üzerine 200 µl etanol eklendi ve 15 saniye karıştırıldı. Karışım dikkatlice 2 ml'lik toplama tüpü içinde bulunan QIAamp Mini spin kolonunun içine aktarıldı ve kapağı kapatılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. QIAamp Mini spin kolonu tekrar temiz bir toplama tüpü içine yerleştirilerek üzerine 500 µl AW1 tamponu eklendi ve kapağı kapatılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Sonrasında QIAamp Mini spin kolonu tekrar temiz bir toplama tüpü içine yerleştirilerek üzerine 500 µl AW2 tamponu eklendi ve kapağı kapatılarak 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüjleme sonrasında QIAamp Mini spin kolonu tekrar temiz bir toplama tüpü içine yerleştirilerek üzerine 500 µl AW2 tamponu eklendi ve kapağı kapatılarak 14.000 rpm'de 3 dakika daha santrifüjlendi. QIAamp Mini spin kolonu 1.5 ml ependorf içine yerleştirilerek üzerine 200 µl AE tampon eklendi ve 1 dakika boyunca oda ısısında inkübe edildi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjleme sonrasında 9

nolu basamak tekrar edildi. Sonrasında spin kolon atılarak ependorf içinde elde edilen DNA ekstraktları PZR reaksiyonu yapılana kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi.

*S. mitis* için çalışılacak 16sRNA primer dizileri (çoğaltılacak ürün boyutu 201 bp); forward 5'ATGAGTTGCGAACGGGTGAG3' ve reverse 5'GCTATGTATCGTCGCCTTGGT3' olacak şekilde literatürden seçildi (160). *S. mitis* ATCC 49456 suşu pozitif kontrol olarak, hasta ve sağlıklı gruplardan izole edilen *S. mitis* suşları ise çalışma grubu olarak kullanıldı. Bu analiz için HotStarTaq Master Mix (QIAGEN, USA) ticari kiti kullanıldı. 12.5 µl Master Mix, 2.5 µl forward, 2.5 µl reverse olmak üzere toplamda 5 µl primer mix, 2.5 µl ajirojen distile su ve 5 µl kalıp DNA ilave edilerek reaksiyon karışımı üretici önerileri doğrultusunda hazırlandı. Karışım PZR tüplerine aktararak termal döngü cihazına (SensoQuest, LabCycler) yerleştirildi. Cihazda kullanılan PZR programı aşağıda belirtilmektedir:

1.  $95^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika, 2.  $94^{\circ}\text{C}$ 'de 30 saniye, 3.  $57^{\circ}\text{C}$ 'de 30 saniye, 4.  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 1 dakika, 5. 2-4.basamaklar 30 kez tekrarlandı, 6.  $72^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika.

Yaklaşık 1.5 - 2 saat süren program sonrasında çoğalan PZR ürünlerini görüntülemek için örnekler % 0.8'lik agaroz jel elektroforezinde (OWL Separation System) yürütüldü. Agaroz jel hazırlanmasında şu protokol izlendi: Hassas terazide % 0.8 olacak şekilde 0.4 gr ölçülen agaroz tozu 50 ml 1x Tris-Borate-EDTA (TBE) tamponu ile karıştırıldı ve mikrodalga içerisinde eritildi. Eriyen agaroz çözeltisi hafif soğuyunca içine yükleme çukurları oluşturmak amacıyla tarak yerleştirilmiş olan 50 ml'lik jel tepsisine dökülmüş ve jelin katılaşması sağlandı. Jel tepsi 1x TBE içeren elektroforez tankına alındı, 4 µl PZR ürünü ve 4 µl yükleme tamponu (Orange G) karıştırılarak elde edilen karışım çukurların içine aktarıldı. Elektriksel alanda DNA'ların ilerlemesi için 50 dakika boyunca 110 volt akım uygulandı. Elektroforez işlemi sonrası, jelde bulunan DNA'ların ultraviyole (UV) ışık kaynağı ile görüntülenmesi için etidyum bromür çözeltisi içinde 15 dakika bekletildi. PZR ürünleri UV ışık kaynağı altında bilgisayar ortamında görüntülendi.

Bundan sonraki deneylerde baş ve boyun kanseri tanısı olan hastaların tükürük örneklerinden izole edilen *S. mitis* suşları ile çalışıldı.

### 3.4.2. Optokin (etilhidrokuprein hidrolör) Duyarlılık Testi

Çalışmaya alınan izolatların optokine duyarlılık profilini belirlemek amacı ile optokin duyarlılık testi yapıldı. Bu test için Mitis-Salivarius agarda üreyen Streptokok kolonilerinden birkaçı öze yardımı ile alınarak %5 koyun kanlı besiyerine homojen olacak şekilde ekildi. Ekimi yapılan plaklar üzerine 6 mm çaplı ve 5 µg optokin içeren Taxo “P” diski (BBL, USA) yerleştirilerek 35°C’de %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Diskin etrafında 14 mm’ye eşit ya da daha fazla inhibisyon zonu oluşan plaklarda üreyen bakteriler duyarlı olarak tanımlanırken, 14 mm’nin altındakiler dirençli olarak belirlendi.

### 3.4.3. Katalaz Testi

İncelenecek kültürden öze ile örnek alınıp, bir lam üzerinde damıtık su ile süspansiyon edildi. Örnek üzerine bir öze dolusu %3’lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) ilave edilip karıştırıldı. Hava kabarcıklarının çıkışı testin pozitif olduğunu gösteren belirteç olarak tanımlandı. Pozitif kontrol grubu olarak *Staphylococcus aureus* seçildi hava kabarcıklarının çıkışı katalaz pozitif olarak kabul edildi. *S. mitis* için ise hava kabarcıkları çıkışının gözlenmesi katalaz test sonucu negatif olarak kabul edildi.

### 3.5. Sağlıklı İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Sağlıklı kemik iliği mononükleer hücreleri ticari olarak Lonza firmasından temin edildi. Hücreler α-MEM, %20 fetal sığır serum (FBS), L-Glutamin, %1 pensilin + streptomisin içeren medyum içerisinde 37°C’de kültüre edildi. Kültür kabına yapışan ve iğsi özellik gösteren hücreler MKH’ler olarak kabul edildi. Pasaj 2’deki hücreler ilk önce PBS ile yıkandıktan sonra 5 ml tripsine (Gibco) maruz bırakıldı. Hücrelerin kalkması için 37°C’de inkübatörde bekletilmeyi takiben, 5 ml medium eklendi. 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra supernatan uzaklaştırıldı. Tripan mavisi ile sayım yapıldı. Hücrelerin, hücre yüzey belirteçleri akım sitometri ile incelendi. Anti-insan CD73 floresein izotiyosiyanat (FITC) ve anti-insan CD105 allofikosiyanın (APC) (mezenkimal kök hücreler için), anti-insan CD34 fikoeritrin(PE) (hematopoetik kök hücreler için) kullanıldı. Tüm antikorlar Becton Dickinson firmasından temin

edildi. MKH'ler FACS tamponu ile süspense edildi. Süspense edilen hücreler 1500 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Daha sonra hücreler floresan-konjuge anti-insan antikorları ile işaretlendi. Bu antikorlarla birlikte hücreler 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. İzotip kontrolü olarak da IgG1-PE, IgG1-FITC ve IgG1-APC kullanıldı ve hücreler FACS tamponu ile yıkandıktan sonra akım sitometri cihazı kullanılarak ölçüm yapıldı.

### **3.5.1. Ko-kültür Çalışmaları için Örnek Hazırlığı**

#### **3.5.1.1. Bakterilerin Çoğaltılması**

Klinik örneklerden izole edilen klinik *S. mitis* izolatu beyin kalp infüzyon (BHI) (Oxoid, Basingstoke, UK) sıvı besiyerine ekilip 24- 48 saat boyunca 37°C'de etüvde bekletilerek gün aşırı üremeleri sağlandı. Ertesi gün üreyen kültürler, 5 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edilerek ve sonrasında kültürlerin 590 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri yapılarak her mikroorganizma için son inokulum konsantrasyonları  $1 \times 10^4$  cfu/ml olarak hazırlandı. Hazırlanan bakteri inokulumları, transwell üzerinde çoğaltılarak indirek (Tans-well, Corning) MKH'ler ile ko-kültürleri yapılarak kullanıldı.

#### **3.5.1.2. Eksozom İçermeyen FBS Hazırlanması**

Eksozom içermeyen FBS (Sigma-Aldrich, USA), ko-kültür deneylerinde kullanılmak üzere "FBS Exosome Depletion Kit (Slurry Format) (Norgen/Biotek)" protokolü baz alınarak hazırlandı. 5 ml FBS, 1 ml  $\alpha$ -MEM, 100  $\mu$ L Exo C tampon ve 500  $\mu$ L Slurry E karışımı 10 saniye vortekslendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilip, yeniden 10 saniye vortekslendi. Daha sonra 2000 rpm'de iki dakika santrifüj edildi. Supernatan alınarak 0.2  $\mu$ l porlu filtreden geçirildikten sonra kullanıma hazır hale getirildi.

#### **3.5.1.3. Optimizasyon Çalışmaları**

Ko-kültür çalışmalarında medyum içeriği eksozom içermeyen FBS,  $\alpha$ -MEM (pensilin ve streptomisin olmadan) olacak şekilde hazırlandı. Ko-kültür çalışmaları için optimum eksozom ve bakteri konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 24

kuyucuklu plakada 48 saat boyunca ko-kültür çalışmaları gerçekleştirildi. Her bir kuyucukta pasaj 2'deki 20.000 MKH olacak şekilde ekim yapıldı. Eksozom içeren gruplara, klinik örneklerden izole edilen eksozomlardan 0-50 µg/ml olacak şekilde eksozom ilavesi, bakteri yoğunluğunun tayini içinse *S.mitis* içeren gruplara  $10^2$ - $10^4$  cfu/ml olacak şekilde *S. mitis* ilavesi gerçekleştirildi. Doz analizi ve canlılık tayini için WST-1 (Roche) kullanıldı. WST-1 analizi için kuyucuklardaki besiyeri çekildi ve 200 µl kültür besiyeri + 20 µl *WST-1* karışımı, hücre kültürleri ve yalnızca besiyeri içeren (blank) kuyucuklara eklenerek iki saat 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> koşulunda inkübe edildi. 96 kuyucuklu plaklara plak başına 100 µl olacak şekilde dağıtıldı ve mikropilaka okuyucusunda (Tecan Trading AG, Switzerland) 450 nm dalga boyunda okundu. Böylece 48. saatte eksozom ve bakterilerin optimum dozu belirlendi (n=3).

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ko-kültür çalışmalarında kullanılmak üzere bakteri miktarı  $10^4$ cfu/ml, eksozom konsantrasyonu 50 µg/ml olarak belirlendi ve bu kapsamda altı farklı grup incelendi.

1. MKH (kontrol)
2. MKH + *S. mitis*
3. MKH + Sağlıklı grup eksozomları
4. MKH + *S. mitis* + Sağlıklı grup eksozomları
5. MKH + Hasta grubu eksozomları
6. MKH + *S. mitis* + Hasta grubu eksozomları

### **3.6. Ko-kültür Sonrasında Hücre Karakteristiğindeki Değişkenlikler**

#### **3.6.1. Akım Sitometri Analizi**

Akım sitometri analizi için hücreler FACS tamponu ile süspansiyon edildi ve 1500 rpm'de beş dakika santrifüj ile çöktürüldü. Sonrasında hücreler floresan-konjuge anti-insan antikoları [anti-insan CD44-PE, anti-insan integrin alfa 6-FITC ile 30 dakika boyunca işaretlendi. Tüm antikolar Becton Dickinson Pharmingen'den (BD, USA) alındı. Hücreler bu antikolar ile 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. İzotip kontrol olarak IgG1-PE, IgG1-FITC kullanıldı. Hücreler FACS tamponu ile yıkandıktan sonra, analizleri akım sitometri cihazı ile gerçekleştirildi (n=3).

### 3.6.2. İmmüfloresan Boyama

Kanser hücrelerine özgü belirteçlerden vimentinin varlığı immüfloresan boyama yöntemiyle tayin edildi. Bu amaçla ko-kültür sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücreler %3,7 formaldehit (Sigma) ile 37°C'de 20 dakika fikse edildi. Ardından PBS ile iki kez yıkanan hücreler, %0,2 Triton / PBS (Sigma) ile 37°C'de 5 dakika bekletilerek permeabilize edildi. Blokaj işlemi için, %0,05 Tween / PBS (Sigma) ile iki kez yıkanan hücreler, %5 BSA / PBS (Applichem) içerisinde 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Blokaj işlemi sonrası hücreler, primer antikolar (mouse anti-vimentin antibody (Abcam Inc.) ile 1 saat 37°C'de bekletildi. %0,05 Tween / PBS ile beş kez yıkanan hücelere ikinci kez %5 BSA/PBS varlığında 15 dakika 37°C'de blokaj uygulandı. Son olarak, sekonder antikor Alexa 488 (Abcam) ve çekirdek boyası Dapi (Applichem) ile 1 saat 37°C'de işaretlenen hücreler, sekiz kez %0,05 Tween / PBS ve bir kez dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Hücreler üzerindeki floresan sinyali floresan mikroskop (Leica 6600) ile görüntülendi (n=2).

### 3.6.3. Sitokin Array

Ko-kültür sonrasında conditioned medyumlar toplanarak ortama salınan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin tayini "Human Cytokine Antibody Array C5 (RayBiotech)" kiti ile değerlendirildi (n=2). Üretici önerileri doğrultusunda her bir kuyucuk için bir membran olacak şekilde membranlar yerleştirildi. Her kuyucuğa 2 ml olacak şekilde blocking buffer ilave edildikten sonra, plaka oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından blocking buffer aspire edilerek, her kuyucuğa 1 ml conditioned medium eklendi örnekler gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben her kuyucuk yıkama tamponu I ve yıkama tamponu II ile yıkama basamaklarından geçirildi. Yıkama basamaklarını takiben her kuyucuğa 1 ml biyotinlenmiş antikor kokteyli ilave edilerek plaka oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Kokteyl aspire edildikten sonra yukarıda anlatılan yıkama prosedürü uygulandı. Ardından her kuyucuğa 2 ml HRP-streptavidin eklenerek yeniden 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi. HRP-streptavidin her kuyucuktan aspire edildikten sonra yıkama basamakları tekrarlandı. Kemoluminisens saptama için membranlar plastik levha üzerine transfer edildikten

sonra tespit tamponu C ve tespit tamponu D'nin eşit oranda eklenmesi ile oluşturulan karışımdan, her bir membran üzerine 500 µL koyuldu. Oda sıcaklığında iki dakika beklendikten sonra membranların üzeri de diğer plastik levha ile kapatılıp, sandviç edilmiş membranlar kemoluminisens görüntüleme cihazına (ProteinSimple) aktarıldı. Sonuçların yorumlanmasında “ImageJ software” programı kullanıldı.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	ENA-78 (CXCL5)	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g	GRO alpha (CXCL1)
2	I-309 (CCL1)	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8 (CXCL8)	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-gamma	MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 beta (CCL4)
4	MIP-1 delta	RANTES (CCL5)	SCF	SDF-1 alpha	TARC (CCL17)	TGF beta 1	TNF alpha	TNF beta (TNFSF1B)	EGF	IGF-1	Angiogenin
5	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC (CXCL13)	Ck beta 8-1 (CCL23)	Eotaxin-1 (CCL11)	Eotaxin-2 (CCL24)	Eotaxin-3 (CCL26)
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7 (KGF)	FGF-9	FLT-3 Ligand	Fractalkine (CX3CL1)	GCP-2 (CXCL6)	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10 (CXCL10)	LIF	LIGHT (TNFSF14)	MCP-4 (CCL13)	MIF	MIP-3 alpha	NAP-2 (CXCL7)	NT-3
8	NT-4	OPN (SPP1)	OPG (TNFRSF11)	PARC	PLGF	TGF beta 2	TGF beta 3	TIMP-1	TIMP-2	POS	POS

**Şekil 3.1.** “Human Cytokine Antibody Array C5” kitinde yer alan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin şematize hali.

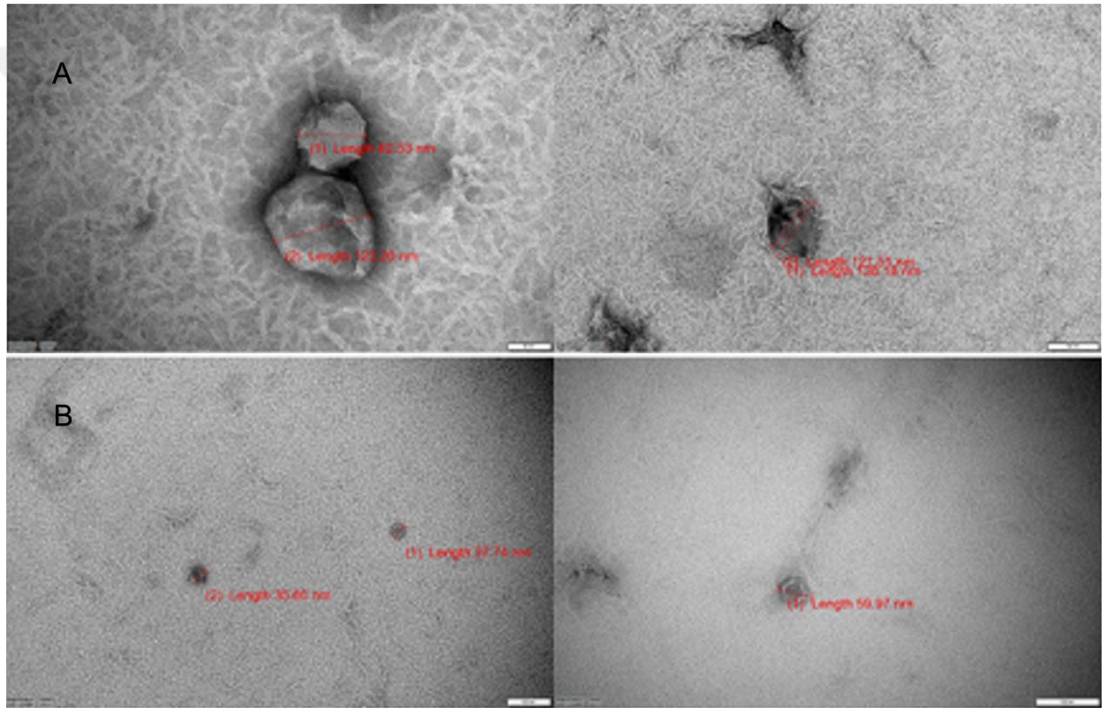
### 3.7. Verilerin Analizi

İstatiksel analizler SPSS Inc. yardımı ile farklı deney grupları arasında karşılaştırmalar yapılarak ve t-test, ANOVA, parametrik ve non-parametrik analiz yöntemleri kullanılarak yapıldı. P değeri 0.05'ten küçük olan karşılaştırmalar anlamlı olarak kabul edildi.

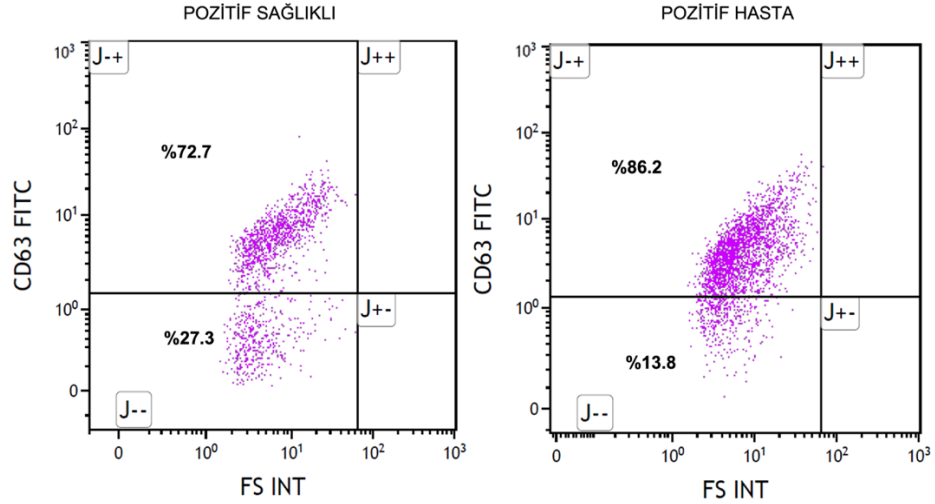
## 4. BULGULAR

### 4.1. Eksozom Eldesi ve Karakterizasyonu

Klinik örneklerden izole edilen eksozomların morfolojileri ve büyüklükleri TEM ile tespit edildi (Şekil 4.1). Sağlıklı ve hasta gruplardan izole edilen eksozom çaplarının 35-138 nm aralığında değişkenlik gösterdiği saptandı. İzole edilen eksozomların karakterizasyonları CD63 pozitifliği açısından akım sitometri analizi ile değerlendirildi (Şekil 4.2). Hasta örneklerinde sağlıklı gruplara göre daha yüksek pozitiflik görüldü.



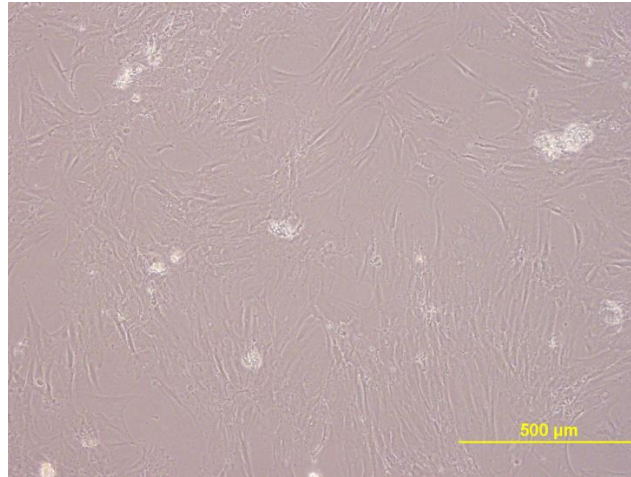
**Şekil 4.1.** Klinik tükürük örneklerinden izole edilen eksozomların TEM görüntüleri. A) Baş ve boyun kanseri tanısı olmayan bireylerden izole edilen eksozomların TEM görüntüleri. B) Baş ve boyun kanseri tanısı konulmuş hastalardan izole edilen eksozomların TEM görüntüleri. Ölçek çubuğu= 50-100 nm.



**Şekil 4.2.** İzole edilen ekzozom örneklerinin CD63 pozitifliklerini gösteren akım sitometri sonuçları.

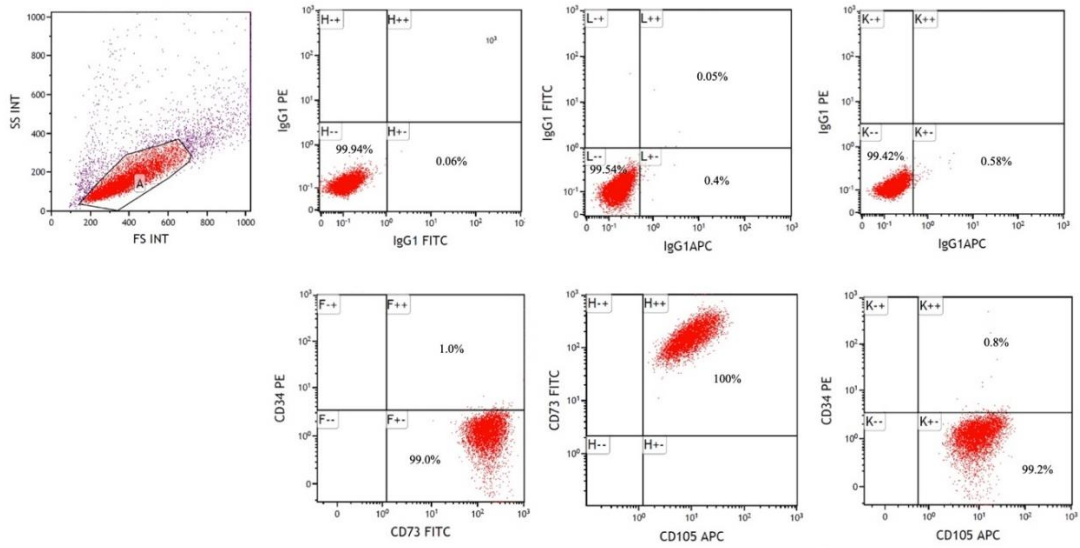
#### 4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Pasaj 2’de kültürün beşinci gününde çekilen ışık mikroskobu görüntülerine göre hücreler %90-95 konfluense ulaşmış olarak gözlemlendi (Şekil 4.3). MKH’lerin morfolojik görüntüleri büyük, iğsi uzantıları olan, yoğun fibroblast benzeri görünümde hücreler olarak tanımlandı.



**Şekil 4.3.** MKH’lerin beşinci günde ışık mikroskobu altında görüntüleri. Ölçek: 500 μm (10x büyütme).

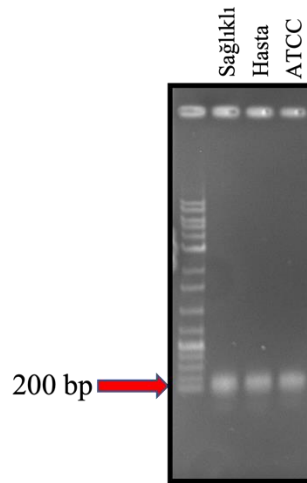
Pasaj 2’deki MKH’lerin karakterizasyonları akım sitometri analizi (CD73 ve CD105 pozitif, CD34 negatifliklerine göre) ile değerlendirildi (Şekil 4.4). Hücreler, MKH belirteçleri olan CD73 ( $98,5 \pm 0,6$ ) ve CD105 ( $98,5 \pm 1,6$ ) için pozitif iken, hematopoetik kök hücre belirteci CD34 ( $1,2 \pm 0,4$ ) için negatif olarak analiz edildi.



Şekil 4.4. Pasaj 2’de yer alan MKH’lerin akım sitometri analizi sonrası belirteç tayini.

### 4.3. Bakteri İzolasyonu

%5 koyun kanlı ağara tükürük örneklerinden ayrı ayrı ekim yapılarak, 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda iki gün boyunca inkübasyona bırakılarak üreyen kolonilerde *S. mitis* için özgül 16srRNA primer dizileri kullanılarak konvansiyonel PZR ile doğrulama yapıldı. Sağlıklı ve hasta klinik örneklerden izole edilen *S. mitis* ve ATCC suşlarının hepsinin 200 baz çiftinde bant verdiği görüldü (Şekil 4.5). Hasta örneklerinden izole edilen *S. mitis* suşları hemoliz yönünden incelendi ve gram boyamada gram pozitif kok gözlenen (Şekil 4.6), optokin’e dirençli (Şekil 4.7), katalaz negatif (Şekil 4.8) izolatlar karakterize edildi.



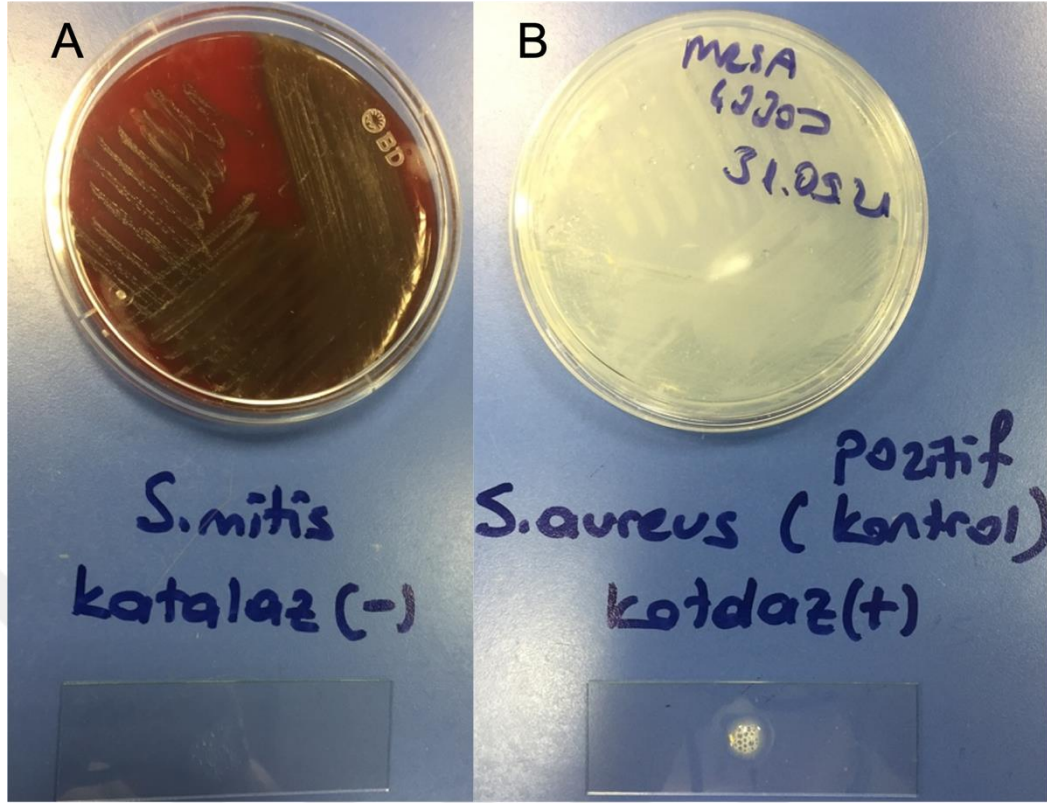
Şekil 4.5. *S. mitis* için konvansiyonel PZR ile doğrulama görüntülemesi.



**Şekil 4.6.** Hemoliz yönünden incelenen *S.mitis*'in (hasta örneği) makroskobik koloni görüntüsü.



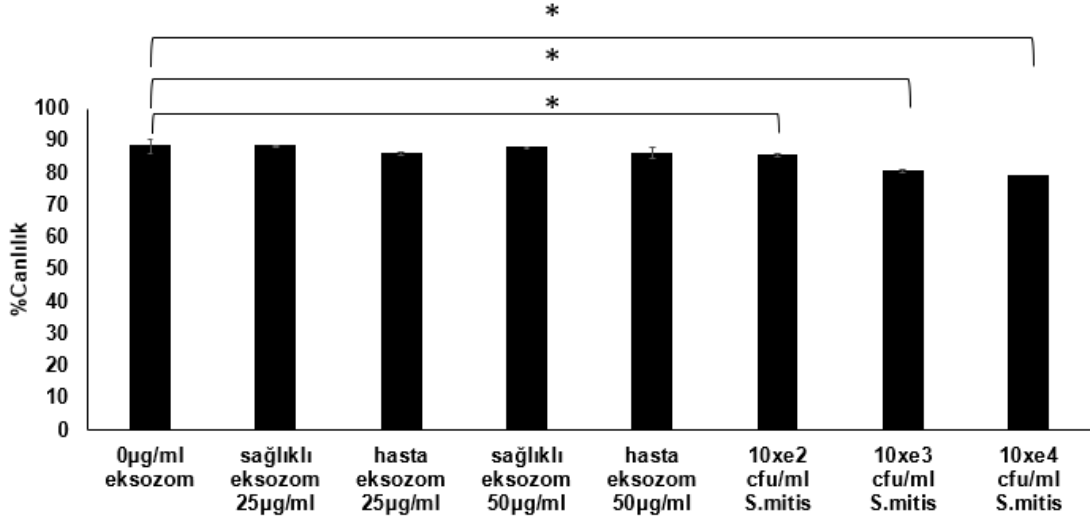
**Şekil 4.7.** Optokine dirençli *S. mitis* (hasta örneği) kolonileri.



**Şekil 4.8.** Katalaz testi sonuçları. A) *S. mitis* (hasta örneği) için katalaz testi negatif gözlenirken B) *S. aureus* kontrol grubunda pozitif reaksiyon (kabarcık oluşumu) gözlemlendi.

#### 4.4. Ko-kültür Çalışmaları

Bakteri ve eksozom ilavesi sonucunda yapılan WST-1 analizleri sonucunda ko-kültüre edilen MKH'lerin canlılık oranları ortalama %80 oranında saptandı. Bakteriler ile yapılan ko-kültür çalışmalarında doz artışına bağlı olarak bakteri bulunmayan ortama kıyasla istatistiksel olarak MKH canlılığının azaldığı ( $p \leq 0.05$ ) ancak en yüksek bakteri konsantrasyonunda bile  $79,4 \pm 0,6$  ( $p \leq 0.05$ ) oranında kaldığı saptandı. Eksozom ilave edilen ortamda ise MKH canlılıklarında istatistiksel olarak herhangi bir fark saptanmadı ve bundan sonraki çalışmalarda maksimum dozlar çalışıldı (Şekil 4.8).



**Şekil 4.9.** Ko-kültürdeki MKH'lerin canlılık tayini. Eksozom için çalışılan doz aralığı 0-50 µg/ml, *S. mitis* için çalışılan doz aralığı  $10^2$ - $10^4$  cfu/ml olarak belirlendi (n=3, ortalama ± standart sapma, \*p≤ 0.05).

#### 4.4.1. Akım Sitometri

Akım sitometri analizleri sonrasında çalışılan ko-kültür koşullarındaki MKH'lerin CD44 ve integrin alfa 6 için ekspresyon seviyeleri Tablo 1'deki gibidir. *S. mitis* varlığında MKH'lerde CD44 ve integrin alfa 6'nın ekspresyon seviyeleri düşmesine rağmen kontrol grubuna kıyasla bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. CD44 ekspresyonu diğer gruplarda benzer oranda ifade edilmektedir. İntegrin alfa 6 için de benzer ekspresyonlar gözlemlendi.

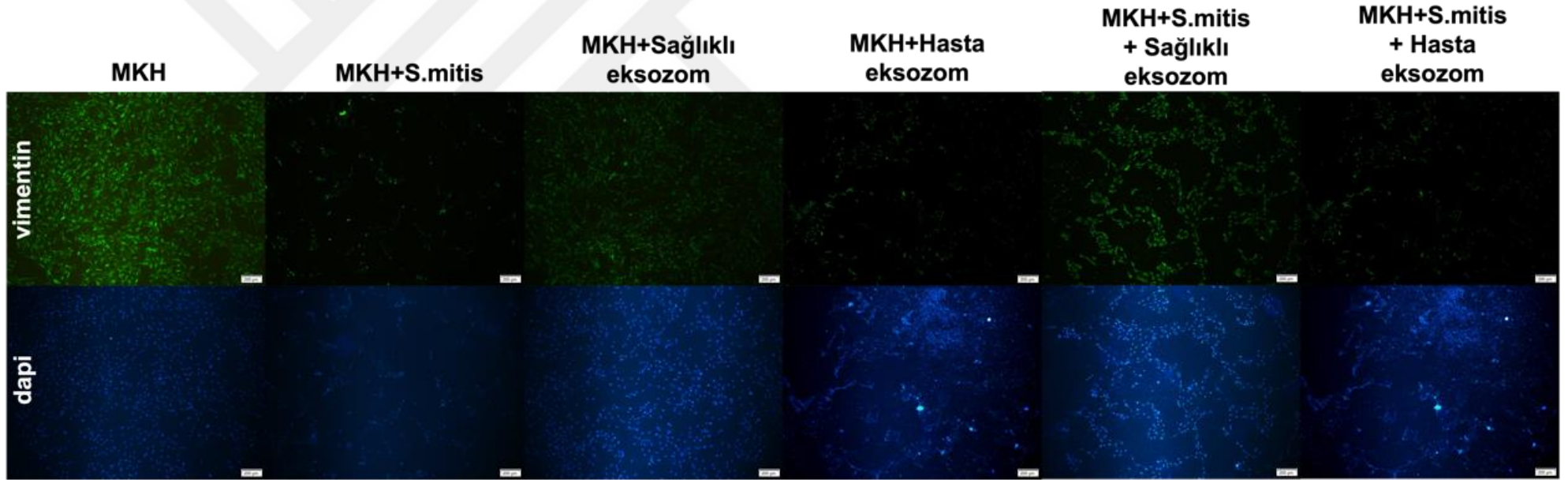
**Tablo 4.1.** CD44 ve integrin alfa 6 ekspresyonu için akım sitometri analizi verileri (n=3, ortalama ± standart sapma).

	CD44	integrin alfa 6
MKH	99,90 ± 0,01	93,03 ± 8,9
MKH + <i>S. mitis</i>	69,40 ± 29,20	75,00 ± 35,36
MKH + Sağlıklı grup eksozom	97,30 ± 4,20	96,13 ± 2,4
MKH + <i>S. mitis</i> + Sağlıklı grup eksozom	97,05 ± 4,10	92,05 ± 6,84
MKH + Hasta grup eksozom	99,60 ± 0,30	96,66 ± 4,26
MKH + <i>S. mitis</i> + Hasta grup eksozom	99,60 ± 0,20	96,76 ± 3,36

#### 4.4.2. İmmünfloresan Boyama

Yapılan immünfloresan görüntüleme sonucunda 100 hücre sayıldı ve tüm gruplarda vimentin ekspresyonu pozitif olarak saptandı. Bu oran MKH + *S. mitis* grubunda %75 iken diğer gruplarda %100 olarak hesaplandı (n=2) (Şekil 4.9).





Şekil 4.10. İmmünfloresan boyama ile vimentin ekspresyonu görüntülemesi. Ölçek çubuğu= 100 µm.

#### 4.4.3. Sitokin Array

İnflamasyon ve immün cevapta önemli rol oynayan spesifik sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin ekspresyon seviyeleri saptandı. Toplamda 69 sitokin/kemokin/büyüme faktörü anlamlı olarak eksprese edildi (Tablo 4.2). MKH içeren gruba göre değerler normalize edildiğinde, MKH + *S. mitis* grubunda toplamda 8 sitokin/kemokin/büyüme faktörünün ekspresyonunda artış, MKH + sağlıklı hasta eksozomu içeren grupta toplamda 53 sitokin/kemokin/büyüme faktörü ekspresyonunda artış, MKH + *S. mitis* + sağlıklı hasta eksozomu içeren grupta toplamda 30 sitokin/kemokin/büyüme faktörü ekspresyonunda artış, MKH + hasta grubu eksozomu içeren grupta toplamda 8 sitokin/kemokin/büyüme faktörü ekspresyonunda artış, MKH + *S. mitis* + hasta grubu eksozomu içeren grupta toplamda 36 sitokin/kemokin/büyüme faktörü ekspresyonunda artış saptandı. MKH'ye göre sitokin/kemokin/büyüme faktörü ekspresyon seviyeleri 1 ya da daha az olan sonuçlar tabloda gösterilmemiştir.

**Tablo 4.2.** Çalışma gruplarına ait kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri değerlerinin sadece MKH içeren gruba göre normalize edilerek elde edilen verilerin n=2, ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri.

<i>Kat değişimi</i>	MKH + S. mitis	MKH + Sağlıklı Eksozom	MKH + S. mitis + Sağlıklı Eksozom	MKH + Hasta Eksozom	MKH + S. mitis + Hasta Eksozom
Kemokin, Sitokin, Büyüme Faktörü					
Epitelyal nötrofil aktive edici peptit (ENA-78)		17,36 $\pm$ 18,09	2,17 $\pm$ 1,14		
Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF)		17,99 $\pm$ 16,91	2,58 $\pm$ 0,90		1,23 $\pm$ 1,20
Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)		17,31 $\pm$ 15,23	2,73 $\pm$ 0,90		1,31 $\pm$ 1,32
Büyüme regüle protein (GRO)		22,24 $\pm$ 25,43	3,42 $\pm$ 1,99		1,10 $\pm$ 1,14
Büyüme regüle protein alfa (GRO alfa)		28,91 $\pm$ 33,36	3,06 $\pm$ 1,20		1,05 $\pm$ 0,97
İnflamatuar sitokin 309 (I-309)		31,37 $\pm$ 43,70	5,47 $\pm$ 5,87		
İnterlökin 1 alfa (IL-1 alfa)	1,89 $\pm$ 1,62				2,29 $\pm$ 0,00
İnterlökin 1 beta (IL-1 beta)					1,07 $\pm$ 0,31
İnterlökin 2 (IL-2)		4,53 $\pm$ 4,43		1,03 $\pm$ 0,26	
İnterlökin 3 (IL-3)		12,19 $\pm$ 15,68	1,91 $\pm$ 1,13		1,02 $\pm$ 1,00
İnterlökin 4 (IL-4)		8,93 $\pm$ 11,07	1,26 $\pm$ 0,47		
İnterlökin 5 (IL-5)		11,33 $\pm$ 15,40	3,28 $\pm$ 3,33		
İnterlökin 6 (IL-6)		27,37 $\pm$ 38,20	3,80 $\pm$ 4,03		2,22 $\pm$ 2,72
İnterlökin 7 (IL-7)		16,84 $\pm$ 22,73	3,67 $\pm$ 3,01		1,25 $\pm$ 1,81
İnterlökin 8 (IL-8)		33,44 $\pm$ 46,37	4,30 $\pm$ 4,26		1,49 $\pm$ 2,16
İnterlökin 10 (IL-10)	1,38 $\pm$ 2,15	13,76 $\pm$ 18,48	4,06 $\pm$ 2,67		2,36 $\pm$ 3,90
İnterlökin 12 (IL-12)		9,90 $\pm$ 13,06	3,17 $\pm$ 2,45		
İnterlökin 13 (IL-13)		27,08 $\pm$ 36,06	8,91 $\pm$ 9,71		
İnterlökin 15 (IL-15)	1,40 $\pm$ 0,09				2,21 $\pm$ 1,42
İnterferon gamma (IFN gamma)		8,66 $\pm$ 10,76			
Monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1)		8,42 $\pm$ 11,11	1,37 $\pm$ 0,95		
Monosit kemotaktik protein-2 (MCP-2)		14,68 $\pm$ 20,41			
Monosit kemotaktik protein-3 (MCP-3)		23,79 $\pm$ 33,43		1,15 $\pm$ 1,91	
Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF)		9,75 $\pm$ 12,84	2,05 $\pm$ 1,28		1,36 $\pm$ 1,84
Makrofaj-kaynaklı kemokin (MDC)		4,18 $\pm$ 4,32	1,92 $\pm$ 0,84		2,40 $\pm$ 3,50
İnterferon-gamma ile uyarılmış monokin (MIG)	7,71 $\pm$ 10,89	5,76 $\pm$ 4,30	14,28 $\pm$ 18,20		17,04 $\pm$ 24,3

**Tablo 4.2. (Devamı)** Çalışma gruplarına ait kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri değerlerinin sadece MKH içeren gruba göre normalize edilerek elde edilen verilerin n=2, ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri.

<i>Kat değişimi</i>	MKH + S. mitis	MKH + Sağlıklı Eksozom	MKH + S. mitis + Sağlıklı Eksozom	MKH + Hasta Eksozom	MKH + S. mitis + Hasta Eksozom
Kemokin, Sitokin, Büyüme Faktörü					
Makrofaj inflamatuvar protein-1 beta (MIP-1 beta)	3,56 $\pm$ 5,04	6,58 $\pm$ 7,92	4,80 $\pm$ 7,52		1,98 $\pm$ 3,04
Makrofaj inflamatuvar protein-1 delta (MIP-1 delta)			2,38 $\pm$ 1,02		1,15 $\pm$ 2,68
Kemokin (C-C motif) ligand 5 (RANTES)			4,69 $\pm$ 6,51		
Kök hücre faktörü (SCF)				8,20 $\pm$ 8,90	
Stromal hücre kaynaklı faktör 1 (SDF-1)		5,63 $\pm$ 6,75			
Timus ve aktive edici regüle kemokin (TARC)		7,94 $\pm$ 10,0			
Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF beta 1)		7,03 $\pm$ 8,7			
Tümör nekroz faktörü alfa (TNF alfa)		4,64 $\pm$ 5,51			
Tümör nekroz faktör beta (TNF beta)				51,02 $\pm$ 70,90	
Epidermal büyüme faktörü (EGF)				2,49 $\pm$ 2,29	
Onkostatın M (OSM)		8,67 $\pm$ 11,46	3,07 $\pm$ 2,76		
Tiroid peroksidaz (TPO)		7,10 $\pm$ 8,75	5,57 $\pm$ 3,71		1,40 $\pm$ 4,87
Vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGF-A)	5,92 $\pm$ 7,24		3,19 $\pm$ 6,35		2,41 $\pm$ 2,19
Platelet-kaynaklı büyüme faktörü BB (PDGF-BB)	4,76 $\pm$ 6,05		2,03 $\pm$ 4,34		
Leptin		4,89 $\pm$ 1,95			
Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF)		4,72 $\pm$ 2,58			
B lenfosit kemoatraktan (BLC)				4,15 $\pm$ 4,77	
Kemokin (C-C motif) ligand 23 (Ck beta 8-1)				1,42 $\pm$ 0,99	
Fibroblast büyüme faktörü-4 (FGF-4)		16,39 $\pm$ 22,43	5,64 $\pm$ 6,39		
Fibroblast büyüme faktörü -6 (FGF-6)		8,68 $\pm$ 12,17	5,06 $\pm$ 5,29		
Fibroblast büyüme faktörü -7 (FGF-7)		2,38 $\pm$ 3,74			1,20 $\pm$ 0,85
Fibroblast büyüme faktörü -9 (FGF-9)		2,46 $\pm$ 4,27			
FMS-benzeri tirozin kinaz 3 Ligand (FLT-3 Ligand)		2,81 $\pm$ 4,68			
Fraktalkin					1,05 $\pm$ 1,26
İnsulin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 2 (IGFBP-2)		1,41 $\pm$ 1,35			

**Tablo 4.2. (Devamı)** Çalışma gruplarına ait kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri değerlerinin sadece MKH içeren gruba göre normalize edilerek elde edilen verilerin n=2, ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri.

<i>Kat değişimi</i>	MKH + S. mitis	MKH + Sağlıklı Eksozom	MKH + S. mitis + Sağlıklı Eksozom	MKH + Hasta Eksozom	MKH + S. mitis + Hasta Eksozom
Kemokin, Sitokin, Büyüme Faktörü					
İnsulin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3 (IGFBP-3)	1,08 $\pm$ 2,24				1,61 $\pm$ 0,44
İnsulin-benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 4 (IGFBP-4)		1,43 $\pm$ 1,78			1,14 $\pm$ 1,15
İnterlökin 16 (IL-16)		5,59 $\pm$ 8,67			1,30 $\pm$ 1,48
İnterferon gamma uyarılmış protein 10 (IP-10)		5,10 $\pm$ 7,09			1,09 $\pm$ 1,23
Lökemi inhibitör faktör (LIF)		8,10 $\pm$ 12,03			
Tümör nekroz faktör süperail üyesi 14 (LIGHT)		2,35 $\pm$ 3,15			1,07 $\pm$ 1,39
Makrofaj migrasyonu inhibe edici faktör (MIF)		1,31 $\pm$ 1,48			1,00 $\pm$ 1,36
Makrofaj inflamatuvar protein 3 alfa (MIP-3 alfa)		2,22 $\pm$ 2,56	1,36 $\pm$ 1,48		1,56 $\pm$ 2,22
Kemokin (C-X-C motif) ligand 7 (NAP-2)					1,13 $\pm$ 1,68
Nörotrofin 4 (NT-4)					1,46 $\pm$ 0,68
Osteopontin (OPN)		9,36 $\pm$ 13,08			1,41 $\pm$ 1,66
Osteoprotegerin (OPG)		11,02 $\pm$ 11,57		1,65 $\pm$ 1,19	
Pulmoner ve aktivasyonla düzenlenen kemokin (PARC)		5,31 $\pm$ 8,11	1,06 $\pm$ 1,44		1,25 $\pm$ 1,62
Plasental büyüme faktörü (PLGF)		2,10 $\pm$ 2,74			1,11 $\pm$ 1,56
Dönüştürücü büyüme faktörü beta 2 (TGF beta 2)		1,66 $\pm$ 2,20			1,12 $\pm$ 1,55
Dönüştürücü büyüme faktörü beta 3 (TGF beta 3)		1,71 $\pm$ 2,21			1,06 $\pm$ 1,56
Doku inhibitörü metalloproteaz-1 (TIMP-1)		1,27 $\pm$ 11,39			5,26 $\pm$ 7,38
Doku inhibitörü metalloproteaz 2 (TIMP-2)		7,02 $\pm$ 7,21			

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, baş ve boyun kanseri tanısı konulmuş hastalardan ve kontrol grubu olarak baş ve boyun kanseri tanısı olmayan bireylerden tükürük örnekleri toplandı. Alınan klinik örneklerden izole edilen eksozom ve bakterilerin, sağlıklı kemik iliği MKH'ler üzerine etkileri değerlendirildi. Çalışma kapsamında tükürük örneklerinden eksozom izolasyonunda ticari kit kullanıldı. Santrifüj tekniğine dayanan bu kit ile izolasyon sonrası, literatür ile uyumlu olarak eksozom karakterizasyonu TEM analiziyle eksozomların fonksiyonel belirteçlerinden biri olan CD63 için pozitiflikleri akım sitometri analiziyle ve miktar tayinleri ise CD9 baz alınarak ELISA yöntemiyle değerlendirildi (161). Çalışmamızda yapılan eksozom karakterizasyon analizlerinde öncelikli bulgu olarak kontrol grubuna kıyasla, baş ve boyun kanseri olan hastalarda artmış CD63 ekspresyon seviyeleri ile birlikte daha yüksek eksozom konsantrasyonları tespit edildi. Literatürde yapılan çalışmalarda da oral kanserli hastaların tükürük örneklerinden izole edilen eksozomların daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmış ve artmış CD63 ekspresyonları gösterilmiştir (162, 163). TEM ile yaptığımız karakterizasyon görüntülemesinde, baş ve boyun kanseri tanısı olan hastalardan izole edilen eksozomların (35-60 nm), kontrol grubuna (82-138 nm) göre daha küçük boyutlarda olduğu saptandı. Literatürde bir çalışmada hasta gruplarında daha büyük boyutlarda eksozomların izole edildiği (6), diğer bir çalışmada ise baş ve boyun kanser hücrelerinden kaynaklanan eksozom boyutlarının 20-400 nm arasında değişen bir aralıkta olabileceği belirtilmiştir (162). Bu farklılıklar, likit biyopsinin alındığı zamandaki kanser evresine ya da baş ve boyun bölgesinde patolojinin geliştiği lokalizasyona bağlı olabilir. Literatürde farklı lokalizasyonlara ya da kanser evrelerine göre eksozomların morfolojilerini, özelliklerini belirten bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda mezenkimal-epitelyal geçiş ve kanserleşme ile ilgili CD44, integrin alfa-6, vimentin ekspresyonlarının yanında sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin ekspresyon dereceleri, her bir alt grup için değerlendirildi. Yapılan analizler sonrasında tüm gruplarda vimentin ekspresyonu gözlenirken, MKH'lerde CD44 ve integrin alfa 6'nın ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre *S. mitis* varlığında düşük gözlemlendi. Diğer gruplarda ise CD44 ve integrin alfa 6 ekspresyonu

benzer oranda ifade edildiği saptandı. İntegrin alfa 6, kök hücrelerin kendilerini yenileme ve köklülük özelliklerinin kontrolünde önemli fonksiyonlara sahiptir (127). Ekspresyon seviyelerindeki artış proliferasyon, migrasyon ve klonojenite ile ilişkilendirilir. Yapılan bir çalışmada, integrin alfa 6'nın MKH progenitör potansiyeli tahmini için aday olabileceği söylenmiştir (128). MKH'lerin konfluense ulaşmaları durumunda integrin alfa 6 ekspresyon seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. Ayrıca integrin alfa 6 seviyelerinde düşüş veya inhibisyon olmasının, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin migrasyonunda bozukluğa sebep olduğu belirtilmiştir (128). CD44 ise MKH ve kanser kök hücre yüzey belirteçidir. Çalışmamızda değerlendirilen gruplar arasında CD44 ekspresyonu yüksek ve benzer olmak ile birlikte sadece *S. mitis* içeren grupta daha düşük seviyede saptanmıştır. Literatürde, CD44<sup>+</sup> / CD133<sup>+</sup> kolon kanseri hücrelerin, CD44<sup>-</sup> / CD133<sup>-</sup> kolon kanser hücrelerine göre daha karsinojenik ve agresif olduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir (137). CD44<sup>-</sup> hücreler tümörojenik özellik göstermezken, CD44<sup>+</sup> hücreler kanser kök hücrelerinin tanımlanmasında önemli bir belirteçtir (164). Baş ve boyun kanserlerinde de kanser hücrelerinde CD44<sup>+</sup> / CD133<sup>+</sup> hücrelerin analiz edilmesi tanıda, tedavide ve prognoz takibinde oldukça yol gösterici olabilir. Vimentin ise MKH'lerin adezyonunda ve migrasyonunda önemli rol oynayan bir ara filamandır. Vimentinin yapısal bozuklukları kanser hücrelerinin daha yavaş adezyonu ile ilişkilendirilir (165). Kanser hücrelerinin protrüzyonunda vimentinin önemini gösteren literatür çalışmaları, meme kanseri ve kolorektal kanserlerde hücrelerin elongasyon için vimentine ihtiyaç duyduğunu göstermiştir (166, 167). Yaptığımız immünfloresan analiz ile tüm gruplarda vimentin ekspresyonu pozitif ve birbirine yakın oranlarda gözlemlendi. Bu oran MKH + *S. mitis* grubunda %75 iken diğer gruplarda %100 olarak saptandı. Eksozomların ve bakterilerin MKH kültüründe vimentin ekspresyonunda aksamaya neden olmadıklarını ve mezenkimal-epitelyal geçişte bu sürekliliğin sağlandığını söyleyebiliriz.

Kanser hücrelerinden salgılanan eksozomlar tümör mikroçevresinde birçok moleküler etkileşimden sorumludur. Çalışmamızda mezenkimal-epitelyal geçiş ile ilişkili sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonları sitokin array analizi ile değerlendirildi. En fazla ekspresyon miktarı MKH + sağlıklı birey eksozomu, MKH + sağlıklı birey eksozomu + *S. mitis* ve MKH + *S. mitis* + hasta grubu eksozomu içeren gruplarda saptandı. Özellikle MKH + sağlıklı birey eksozomu grubunda çok yüksek

sayıda ekspresyon sonuçları, hastaların baş ve boyun kanseri gelişimi için olası risk taşımaları açısından soru işareti yaratmaktadır. Zaten mevcut çalışmada da en önemli amacımız baş ve boyun kanserlerinde likit biyopsi ile biyo-belirteçlerin saptanarak erken tanıda, rekürrens takiplerinde, tedavi etkinliklerinde yeni bir perspektif oluşturabilmektir. Bu nedenle hem bakteriler hem de eksozomlar ile MKH'lerin ko-kültür çalışmaları yapılmış ve hangi etmenin kanserleşmede daha fazla aktif rol oynadığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu konseptte bir çalışma literatürde mevcut değildir. MKH + hasta eksozom grubunda IL-2 seviyesinde diğer gruplara göre belirgin artış gözlenmiştir ancak esas olarak MKH + hasta eksozom + *S. mitis* içeren grupta mezenkimal-epitelyal geçiş ile ilişkili sitokin/kemokin/büyüme faktörü ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır. Yani oral flora kanser gelişimine katkı sağlayarak süreci hızlandırabilir ya da tümöral hücrelerin davranışlarını etkileyebilir. MKH + sağlıklı / hasta eksozomları ile birlikte *S. mitis* içeren gruplarda özellikle G-CSF, GM-CSF, GRO alfa, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, MIP-1 delta, IGFBP-3, NT-4 ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. Elde edilen veriler ile, bakterilerin tek başına etkilerinden daha çok eksozomlar ile birlikte ekspresyon miktarlarında aktif rol oynadıkları çıkarımı yapılmıştır.

Literatürde yapılan bir çalışma, kolon kanseri hücrelerinden izole edilen eksozomların tümör gelişiminden ve invazivliğinden sorumlu olan KRAS, EGFR, SRC ailesi kinazları ve integrinleri içerdiğini göstermiştir (168). Bir başka çalışmada yüksek metastatik özellik gösteren melanoma hücrelerinden salınan eksozomların reseptör tirozin kinaz onkoprotein aracılığı ile, mezenkimal-epitelyal geçişi ve tümör gelişimini desteklediği gösterilmiştir (169). Pankreatik duktal adenokarsinom hücreleri kaynaklı eksozomların ise yüksek miktarlarda makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) eksprese ettikleri saptanmış ve böylece makrofajların metastatik nişe göçü engellenerek metastatik aktivitenin arttığı gösterilmiştir (96). Gastrointestinal stromal tümör hücrelerinin sekrete ettiği eksozomların ise onkojenik protein tirozin-kinaz içerdiği saptanmış ve buna bağlı olarak MMP1 aktivasyonunda artışla tümör gelişiminin desteklendiği belirtilmiştir (170). MKH'lerden kaynaklı eksozomlar ise meme ve küçük hücreli ovaryum kanserlerinde hücrel aktivitenin bozulması ile ilişkilendirilmiştir (171). Son olarak lösemi hücrelerinden salınan eksozomların kemik iliğini uyararak IL-8 salınımı uyardığı, buna bağlı olarak C-X-C motif kemokin ligand

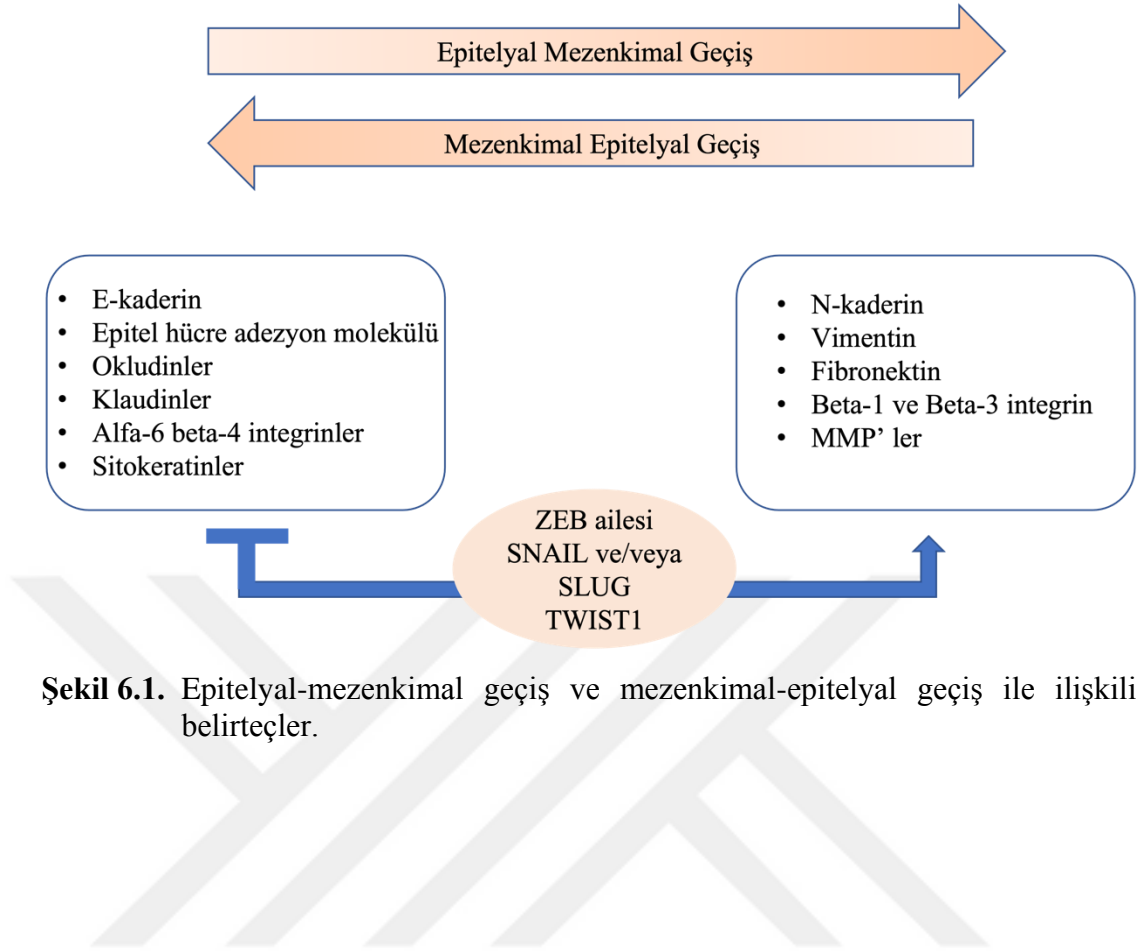
1 ve 2'nin aktive olduğu ve malign fenotipin uyarıldığı gösterilmiştir (172). Tümöral hücrelerden kaynaklı eksozomlar endotel hücrelerinde proliferasyonu ve bu hücrelerin migrasyonunu uyararak yeniden damarlanma için aracı olarak görev alırlar. TGF- $\beta$ 'nin eksozomal transferi ile fibroblastlarda hücresel farklılaşma uyarılarak tümör damarlanmasını arttıran miyofibroblast fenotipine geçiş olur (173).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda oral florada bulunan mikroorganizmaların skuamoz hücreli kanser gelişimindeki rolü ve önemi sıklıkla vurgulanmaktadır (174-176). Oral streptokok türleri baş ve boyun kanserli hastaların oral mikrobiyotasında en sık izole edilen bakteriler olarak belirtilmiştir (12). Oral skuamoz hücreli kanserin geliştiği ağız bölgesinde *Streptococcus* cinsi bakteri sayılarında anlamlı değişiklikler gözlenmesi dikkat çekici olup, kanser gelişiminin değerlendirilmesinde önem arz etmektedir (177). Literatür bilgileri baz alınarak çalışmamızda, klinik örneklerden *S. mitis* izolasyonu yapılarak kanserleşme sürecini araştıran analizler gerçekleştirilmiştir. Oral bakterilerin kanser patogeneziindeki rolü üç hipotez ile açıklanmaktadır (178). İlk olarak bakterilerin neden olduğu kronik inflamasyonun ve buna bağlı olarak salınan inflamatuvar mediyatörlerin kanser gelişiminde rolü olabileceği söylenmektedir. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$ , MMP-8, MMP-9 gibi inflamatuvar mediyatörlerin fibroblastlar, epitel hücreleri, ekstrasellüler komponentler ve endotel hücreleri üzerinde hasar verici etkileri vardır (159). Bütün bunların sonucunda ise kontrolsüz hücre proliferasyonu, onkojenik aktivite ve damarlanma görülebilir. IL-1 $\beta$  endotel hücrelerini aktive ederek VEGF salınmasını indükler. Böylece anjiyogenezis ve tümör gelişimi için uygun inflamatuvar mikroçevreyi hazırlar (179). IL-1 $\beta$ 'nin yüksek ekspresyon seviyeleri tümör invazivliği, migrasyon kapasitesi ve daha agresif fenotip ile ilişkilendirilmiştir (180). IL-1 $\beta$  ekspresyonu MMP-9 indüklenmesine yol açarak ekstrasellüler matriksin degradasyonuna ve tümör invazyonuna yardımcı olur. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada düşük seviyelerde E-kaderin ekspresyonu hücre migrasyonu ile ilişkilendirilmiştir (181). E-kaderinin düşük ekspresyon seviyeleri hücre fonksiyonunda, apoptosizde, büyüme baskılanmasında, hücresel siklusta ve farklılaşmada bozukluk ile ilişkilidir. Tüm bunlar da daha agresif karsinomlar ve düşük hasta sağ kalımları ile ilişkilendirilmiştir (182). Bir diğer proinflamatuvar sitokin olan IL-6 ise kemik rezorpsiyonunu indükler ve akut faz proteinleri, kemokinlerin ve PGE2'nin sentezini uyarır (183). Aynı zamanda oksidatif

stresi uyararak mitokondri içerisine  $H_2O_2$  alımını arttırır ve mitokondri hasarına neden olur (184). Yine MMP'ler üzerinden de etki ederek invazyon ve metastazı destekler. Bir diğer ana inflamatuvar sitokinlerden olan TNF-  $\alpha$  ise osteojenik hücrelerin ve fibroblastların sayıca azalmasına neden olur. Yüksek dozlardaki TNF-  $\alpha$  tümör destrüksiyonu ile bağlantılı iken, düşük dozlardaki TNF-  $\alpha$  tümör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (185). Oral bakterilerin kanser gelişimde rolünü açıklayan bir diğer hipotez ise bakterilerin göstermiş olduğu anti-apoptotik aktivitedir. İntrinsik mitokondriyal apoptozis yollarını kontrol eden Jak1 / Akt / Stat3 anti-apoptotik sinyal yolağı oral flora bakterileri tarafından aktive edilir. Özellikle *Porphyromonas gingivalis* bu etkiden sorumlu tutulmaktadır (186). En son hipotez ise oral flora bakterilerinin ürettiği kanserojenik maddelerdir. Reaktif oksijen ürünleri, reaktif nitrojen ürünleri, volatil sülfür bileşikleri ve organik asitler bu maddeler arasında sayılmaktadır (187). İnflamatuvar cevap boyunca TNF-  $\alpha$ , IL-6 ve TGF-  $\beta$  etkisi altında olan epitel ve immün hücreler reaktif oksijen radikalleri ve reaktif nitrojen radikallerinin sentezini uyarırlar. Bu radikallerin üretimi ile NADPH oksidaz ve nitrik oksit sentaz indüklenir. Böylece  $H_2O_2$  ve nitrik oksit üretimi olur (188). Oral florada bulunan bazı bakteri türleri bu prosese dahil olarak  $H_2O_2$  üretirler ve bu bakteriler peroksijenik bakteriler olarak adlandırılır. Bunların arasında *S.mitis*, *S. sanguinis*, *S.gordonii*, *S. oligofermentans* türleri yer almaktadır (189). Kronik inflamasyon ile birlikte bu serbest radikallerin varlığı kanser gelişiminde önemli bir etkidir. Hooper ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada oral skuamoz hücreli kanserlerde en çok *Streptokok* türlerinin laktik asit üretiminden sorumlu olduklarını göstermiş ve lokal mikroçevrede pH düşüklüklerinden sorumlu olduklarını belirtmişlerdir (190). Bu asidojenik bakterilerin asit üretimi ile asidik ve hipoksik tümör mikroçevresine katkıda buldukları ve metastatik etkinliği arttırdıkları düşünülmektedir (191).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında baş ve boyun kanseri olan hastalardan tükürük örnekleri alınarak, örneklerden eksozom ve *S. mitis* izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirildi ve sonrasında sağlıklı kemik iliği MKH hücreleri üzerinde ko-kültür çalışmaları yapıldı. Bu çalışmadaki en önemli amaç her birinin ayrı ayrı kanserleşmedeki rolleri literatürde gösterilen etmenlerin, spesifik olarak baş ve boyun kanserlerine özgü bir şekilde ve ko-kültür çalışmaları ile değerlendirilmesidir. Sonuçlarımıza göre baş ve boyun kanser tanısı olan hastalarda *S. mitis* seviyelerindeki artış kanser prognozunu daha da kötüye götüren bir etmen adayıdır. Bu nedenle bu hasta gruplarında oral hijyen prosedürlerine daha fazla dikkat etmek, hastaları bu konuda bilinçlendirmek ve hastaların mevcut diş tedavilerini ivedilikle yapmak önem kazanmaktadır. Baş ve boyun kanser tanısı olmayan hastalarda da hastalardan alınan anamnezlerde kanser gelişimi için risk faktörleri (alkol alımı, sigara kullanımı, HPV+ durumu gibi) olduğu düşünülüyorsa erken tanı bu noktada çok önem kazanmaktadır. Bu amaçla basit bir şekilde yapılan likit biyopsi ile kanser ile ilişkilendirilen pek çok belirtecin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilebilmesi büyük avantaj sağlar. Mevcut çalışmamızdan yola çıkarak, kanserleşmede epitelyal-mezenkimal ve mezenkimal-epitelyal geçiş ile ilişkili diğer belirteçlerin de (Şekil 6.1.) analiz edilmesi bir başka yaklaşım olabilir. Ayrıca, eksozomlar içerisinde yer alan genlerin PZR analizleri ile baş ve boyun kanserlerinde, özellikle kemoterapiye direnç gelişiminde anahtar rol oynayan yapılar olarak görülen miR-196a, miR-21, miR146-a gibi eksozomal miRNA'ların tespitinin yapılması gelecekte klinik uygulamalar için umut vaad edici çalışmalar olacaktır. Çalışmamızın bu yönden, literatüre katkı sağlayacağını düşünüyoruz ve likit biyopsinin rutin klinik uygulamalara geçişinde bakış açısı sağlayacağını umuyoruz.



## 7. KAYNAKLAR

1. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015;7(293):293ra104.
2. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.
3. Kaczor-Urbanowicz KE, Wei F, Rao SL, Kim J, Shin H, Cheng J, et al. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1872(1):49-59.
4. Wulfkühle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(4):267-75.
5. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.
6. Nair S, Tang KD, Kenny L, Punyadeera C. Salivary exosomes as potential biomarkers in cancer. *Oral Oncol*. 2018;84:31-40.
7. Hasegawa T, Nakashiro KI, Fukumoto C, Hyodo T, Sawatani Y, Shimura M, et al. Oral squamous cell carcinoma may originate from bone marrow-derived stem cells. *Oncol Lett*. 2021;21(2):170.
8. Le Bars P, Matamoros S, Montassier E, Le Vacon F, Potel G, Soueidan A, et al. The oral cavity microbiota: between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract. *Can J Microbiol*. 2017;63(6):475-92.
9. Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY, et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2010;46(4):226-31.
10. Pushalkar S, Ji X, Li Y, Estilo C, Yegnanarayana R, Singh B, et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiol*. 2012;12:144.
11. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med*. 2005;3:27.
12. Sakamoto H, Naito H, Ohta Y, Tanakna R, Maeda N, Sasaki J, et al. Isolation of bacteria from cervical lymph nodes in patients with oral cancer. *Arch Oral Biol*. 1999;44(10):789-93.
13. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5-29.
14. Cramer JD, Burtneß B, Le QT, Ferris RL. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(11):669-83.

15. Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Investig.* 1992;70(3-4):320-7.
16. Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YC, Zhang ZF, Yu GP, et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol.* 2013;178(5):679-90.
17. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014;50(5):387-403.
18. Hwang E, Johnson-Obaseki S, McDonald JT, Connell C, Corsten M. Incidence of head and neck cancer and socioeconomic status in Canada from 1992 to 2007. *Oral Oncol.* 2013;49(11):1072-6.
19. Adoga AA, Silas OA, Nimkur TL. Open cervical lymph node biopsy for head and neck cancers: any benefit? *Head Neck Oncol.* 2009;1:9.
20. Chow LQM. Head and Neck Cancer. Reply. *N Engl J Med.* 2020;382(20):e57.
21. Bossi P, Resteghini C, Paielli N, Licitra L, Pilotti S, Perrone F. Prognostic and predictive value of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(45):74362-79.
22. Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskisl K, Lander E, Gabriel SB, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517(7536):576-82.
23. Michel L, Ley J, Wildes TM, Schaffer A, Robinson A, Chun SE, et al. Phase I trial of palbociclib, a selective cyclin dependent kinase 4/6 inhibitor, in combination with cetuximab in patients with recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2016;58:41-8.
24. Soulieres D, Faivre S, Mesia R, Remenar E, Li SH, Karpenko A, et al. Buparlisib and paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(3):323-35.
25. Theodoraki MN, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL. Clinical Significance of PD-L1(+) Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clinical Cancer Research.* 2018;24(4):896-905.
26. Dong HD, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion (vol 8, pg 793, 2002). *Nat Med.* 2002;8(9).
27. Cohen EEW, Soulieres D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2019;393(10167):156-67.
28. Wessler S, Aberger F, Hartmann TN. The sound of tumor cell-microenvironment communication - composed by the Cancer Cluster Salzburg research network. *Cell Commun Signal.* 2017;15(1):20.

29. Nonaka T, Wong DTW. Liquid Biopsy in Head and Neck Cancer: Promises and Challenges. *J Dent Res*. 2018;97(6):701-8.
30. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(4):781-91.
31. Liu J, Duan Y. Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol*. 2012;48(7):569-77.
32. Al Kawas S, Rahim ZH, Ferguson DB. Potential uses of human salivary protein and peptide analysis in the diagnosis of disease. *Arch Oral Biol*. 2012;57(1):1-9.
33. Arantes L, De Carvalho AC, Melendez ME, Lopes Carvalho A. Serum, plasma and saliva biomarkers for head and neck cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(1):85-112.
34. Amado FM, Ferreira RP, Vitorino R. One decade of salivary proteomics: current approaches and outstanding challenges. *Clin Biochem*. 2013;46(6):506-17.
35. S ELA, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):347-57.
36. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Bi*. 2014;30:255-89.
37. Ratajczak MZ, Ratajczak J. Extracellular Microvesicles as Game Changers in Better Understanding the Complexity of Cellular Interactions-From Bench to Clinical Applications. *Am J Med Sci*. 2017;354(5):449-52.
38. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*. 2010;51(8):2105-20.
39. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*. 2009;9(21):4997-5000.
40. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular Endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244-7.
41. Kucukguven MB, Celebi-Saltik B. Stem Cell Based Exosomes: Are They Effective in Disease or Health? *Adv Exp Med Biol*. 2021;1341:45-65.
42. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MLG, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119(3):756-66.
43. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*. 2006;107(2):102-8.
44. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581-93.

45. Ha D, Yang NN, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(4):287-96.
46. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med*. 2013;91(4):431-7.
47. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yanoshita R. Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol Pharm Bull*. 2008;31(6):1059-62.
48. Cheng Y, Pereira M, Raukar N, Reagan JL, Queseneberry M, Goldberg L, et al. Potential biomarkers to detect traumatic brain injury by the profiling of salivary extracellular vesicles. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):14377-88.
49. Cao ZT, Wu YF, Liu GL, Jiang Y, Wang XM, Wang Z, et al. alpha-Synuclein in salivary extracellular vesicles as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2019;696:114-20.
50. Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, Gimzewski JK. Quantitative Nanostructural and Single-Molecule Force Spectroscopy Biomolecular Analysis of Human-Saliva-Derived Exosomes. *Langmuir*. 2011;27(23):14394-400.
51. Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals. *J Cancer Res Clin*. 2016;142(1):101-10.
52. Winck FV, Ribeiro ACP, Domingues RR, Ling LY, Riano-Pachon DM, Rivera C, et al. Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles. *Sci Rep-Uk*. 2015;5.
53. Gai C, Camussi F, Broccoletti R, Gambino A, Cabras M, Molinaro L, et al. Salivary extracellular vesicle-associated miRNAs as potential biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Bmc Cancer*. 2018;18.
54. Sun Y, Huo CH, Qao Z, Shang Z, Uzzaman A, Liu S, et al. Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. *J Proteome Res*. 2018;17(3):1101-7.
55. Sun Y, Xia ZJ, Shang Z, Sun KB, Niu XM, Qian LQ, et al. Facile preparation of salivary extracellular vesicles for cancer proteomics. *Sci Rep-Uk*. 2016;6.
56. Langevin S, Kuhnell D, Parry T, Biesiada J, Huang SX, Wise-Draper T, et al. Comprehensive microRNA-sequencing of exosomes derived from head and neck carcinoma cells in vitro reveals common secretion profiles and potential utility as salivary biomarkers. *Oncotarget*. 2017;8(47):82459-74.
57. Lau C, Kim Y, Chia D, Spielmann N, Eibl G, Elashoff D, et al. Role of Pancreatic Cancer-derived Exosomes in Salivary Biomarker Development. *J Biol Chem*. 2013;288(37):26888-97.
58. Machida T, Tomofuji T, Maruyama T, Yoneda T, Ekuni D, Azuma T, et al. miR-1246 and miR-4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. *Oncol Rep*. 2016;36(4):2375-81.

59. Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, Korvala J, Salo T, Sormunen R, et al. Human Saliva-Derived Exosomes: Comparing Methods of Isolation. *J Histochem Cytochem.* 2015;63(3):181-9.
60. Muller L, Hong CS, Stolz DB, Watkins SC, Whiteside TL. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods.* 2014;411:55-65.
61. Abramowicz A, Widlak P, Pietrowska M. Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. *Mol Biosyst.* 2016;12(5):1407-19.
62. Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. *Methods Mol Biol.* 2015;1295:179-209.
63. Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CSF, Wiegmans AP, Leimgruber A, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles.* 2015;4.
64. Semreen MH, Alniss HY, Mousa MK, El-Awady R, Khan F, Abu Al-Rub K. Quantitative determination of doxorubicin in the exosomes of A549/MCF-7 cancer cells and human plasma using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Saudi Pharm J.* 2018;26(7):1027-34.
65. Maroto R, Zhao YX, Jamaluddin M, Popov VL, Wang HW, Kalubowilage M, et al. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *J Extracell Vesicles.* 2017;6(1).
66. Martins TS, Catita J, Rosa IM, Silva OABDE, Henriques AG. Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *Plos One.* 2018;13(6).
67. Buschmann D, Kirchner B, Hermann S, Marte M, Wurmser C, Brandes F, et al. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1481321.
68. Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A, Antes TJ. Integrated systems for exosome investigation. *Methods.* 2015;87:31-45.
69. Mehdiani A, Maier A, Pinto A, Barth M, Akhyari P, Lichtenberg A. An innovative method for exosome quantification and size measurement. *J Vis Exp.* 2015(95):50974.
70. Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes. *Methods.* 2015;87:3-10.
71. Aguilar-Gallardo C, Simon C. Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Semin Reprod Med.* 2013;31(1):5-13.
72. Zakrzewski W, Dobrzynski M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68.
73. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10.

74. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014;13(7):497-512.
75. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*. 2015;17(3):260-71.
76. Chen ZG. The cancer stem cell concept in progression of head and neck cancer. *J Oncol*. 2009;2009:894064.
77. Major AG, Pitty LP, Farah CS. Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells Int*. 2013;2013:319489.
78. Ritchie KE, Nor JE. Perivascular stem cell niche in head and neck cancer. *Cancer Lett*. 2013;338(1):41-6.
79. Borovski T, De Sousa EMF, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res*. 2011;71(3):634-9.
80. Reid PA, Wilson P, Li Y, Marcu LG, Bezak E. Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers. *Head Neck*. 2017;39(9):1920-32.
81. Peitzsch C, Kurth I, Ebert N, Dubrovskaya A, Baumann M. Cancer stem cells in radiation response: current views and future perspectives in radiation oncology. *Int J Radiat Biol*. 2019;95(7):900-11.
82. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):973-8.
83. Martens-de Kemp SR, Brink A, Stigter-van Walsum M, Damen JM, Rustenburg F, Wu T, et al. CD98 marks a subpopulation of head and neck squamous cell carcinoma cells with stem cell properties. *Stem Cell Res*. 2013;10(3):477-88.
84. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(3):307-13.
85. Fukusumi T, Ishii H, Konno M, Yasui T, Nakahara S, Takenaka Y, et al. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014;111(3):506-14.
86. Lagadec C, Vlashi E, Bhuta S, Lai C, Mischel P, Werner M, et al. Tumor cells with low proteasome subunit expression predict overall survival in head and neck cancer patients. *Bmc Cancer*. 2014;14:152.
87. Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One*. 2010;5(7):e11456.
88. Kucukguven MB, Celebi-Saltik B. Different Aspects of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Cancer Stem Cells, their Niche and Targeted Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2021;16(3):286-306.

89. Moreb JS, Ucar-Bilyeu DA, Khan A. Use of retinoic acid/aldehyde dehydrogenase pathway as potential targeted therapy against cancer stem cells. *Cancer Chemoth Pharm.* 2017;79(2):295-301.
90. Kim WT, Ryu CJ. Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *Bmb Rep.* 2017;50(6):285-98.
91. Keysar SB, Le PN, Miller B, Jackson BC, Eagles JR, Nieto C, et al. Regulation of Head and Neck Squamous Cancer Stem Cells by PI3K and SOX2. *Inci-J Natl Cancer I.* 2017;109(1).
92. Kaseb HO, Fohrer-Ting H, Lewis DW, Lagasse E, Gollin SM. Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Cell Res.* 2016;348(1):75-86.
93. Bourguignon LYW, Earle C, Shiina M. Activation of Matrix Hyaluronan-Mediated CD44 Signaling, Epigenetic Regulation and Chemoresistance in Head and Neck Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
94. Lindoso RS, Collino F, Vieyra A. Extracellular vesicles as regulators of tumor fate: crosstalk among cancer stem cells, tumor cells and mesenchymal stem cells. *Stem Cell Investig.* 2017;4:75.
95. Corcoran C, Rani S, O'Brien K, O'Neill A, Prencipe M, Sheikh R, et al. Docetaxel-Resistance in Prostate Cancer: Evaluating Associated Phenotypic Changes and Potential for Resistance Transfer via Exosomes. *Plos One.* 2012;7(12).
96. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang HY, Thakur BK, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology.* 2015;17(6):816-+.
97. Ludwig S, Floros T, Theodoraki MN, Hong CS, Jackson EK, Lang S, et al. Suppression of Lymphocyte Functions by Plasma Exosomes Correlates with Disease Activity in Patients with Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2017;23(16):4843-54.
98. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, et al. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature.* 2018;560(7718):382-+.
99. Yen EY, Miaw SC, Yu JS, Lai IR. Exosomal TGF-beta is correlated with lymphatic metastasis of gastric cancers. *Am J Cancer Res.* 2017;7(11):2199-+.
100. Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):824-33.
101. Wang Z, Wang Y, Wang ZY, Gutkind JS, Wang ZL, Wang F, et al. Engineered Mesenchymal Stem Cells with Enhanced Tropism and Paracrine Secretion of Cytokines and Growth Factors to Treat Traumatic Brain Injury. *Stem Cells.* 2015;33(2):456-67.
102. Fennema EM, Tchang LAH, Yuan HP, van Blitterswijk CA, Martin I, Scherberich A, et al. Ectopic bone formation by aggregated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: A comparative study. *J Tissue Eng Regen M.* 2018;12(1):E150-E8.

103. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, et al. Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *Plos One*. 2009;4(4).
104. De Boeck A, Narine K, De Neve W, Mareel M, Bracke M, De Wever O. Resident and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2010;46(5):336-42.
105. Lozito TP, Kuo CK, Taboas JM, Tuan RS. Human Mesenchymal Stem Cells Express Vascular Cell Phenotypes Upon Interaction With Endothelial Cell Matrix. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009;107(4):714-22.
106. Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL. Role of angiogenic factors: Coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. *Laryngoscope*. 1999;109(5):687-93.
107. Hamou C, Callaghan MJ, Thangarajah H, Chang E, Chang EI, Grogan RH, et al. Mesenchymal Stem Cells Can Participate in Ischemic Neovascularization. *Plast Reconstr Surg*. 2009;123(2):45s-55s.
108. Gonzalez-Gonzalez R, Ortiz-Sarabia G, Molina-Frechero N, Salas-Pacheco JM, Salas-Pacheco SM, Lavalle-Carrasco J, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition Associated with Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: A Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13(12).
109. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2014;15(3):178-96.
110. Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol*. 2019;29(3):212-26.
111. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
112. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
113. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion - Migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(9):744-9.
114. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res*. 2011;9(12):1608-20.
115. Buijs JT, Henriquez NV, van Overveld PG, van der Horst G, Que I, Schwaninger R, et al. Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer Res*. 2007;67(18):8742-51.
116. Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G, van Civerfeld PGM, Wetterwald A, Schwaninger R, et al. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *Am J Pathol*. 2007;171(3):1047-57.

117. Mbalaviele G, Dunstan CR, Sasaki A, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T. E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. *Cancer Research*. 1996;56(17):4063-70.
118. Patteson AE, Vahabikashi A, Goldman RD, Janmey PA. Mechanical and Non-Mechanical Functions of Filamentous and Non-Filamentous Vimentin. *Bioessays*. 2020;42(11).
119. Krause DS. Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1044:117-24.
120. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004;306(5701):1568-71.
121. Liu CF, Chen ZW, Chen ZH, Zhang T, Lu Y. Multiple tumor types may originate from bone marrow-derived cells. *Neoplasia*. 2006;8(9):716-U19.
122. Rubio D, Garcia S, De la Cueva T, Paz MF, Lloyd AC, Bernad A, et al. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. *Exp Cell Res*. 2008;314(4):691-8.
123. Battaglia RA, Delic S, Herrmann H, Snider NT. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Res*. 2018;7.
124. Dal Vechio AM, Giudice FS, Sperandio FF, Mantesso A, Pinto Junior Ddos S. Vimentin expression and the influence of Matrigel in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *Braz Oral Res*. 2011;25(3):235-40.
125. Steinbichler TB, Dudas J, Ingruber J, Glueckert R, Sprung S, Fleischer F, et al. Slug Is A Surrogate Marker of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Head and Neck Cancer. *J Clin Med*. 2020;9(7).
126. Wangmo C, Charoen N, Jantharapattana K, Dechaphunkul A, Thongsuksai P. Epithelial-Mesenchymal Transition Predicts Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(3):1511-8.
127. Villa-Diaz LG, Kim JK, Laperle A, Palecek SP, Krebsbach PH. Inhibition of Focal Adhesion Kinase Signaling by Integrin  $\alpha 6 \beta 1$  Supports Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*. 2016;34(7):1753-64.
128. Nieto-Nicolau N, de la Torre RM, Farinas O, Savio A, Vilarrodona A, Casaroli-Marano RP. Extrinsic modulation of integrin  $\alpha 6$  and progenitor cell behavior in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*. 2020;47:101899.
129. Lopez J, Poitevin A, Mendoza-Martinez V, Perez-Plasencia C, Garcia-Carranca A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *Bmc Cancer*. 2012;12.
130. Vieira AF, Ricardo S, Ablett MP, Dionisio MR, Mendes N, Albergaria A, et al. P-Cadherin Is Coexpressed with CD44 and CD49f and Mediates Stem Cell Properties in Basal-like Breast Cancer. *Stem Cells*. 2012;30(5):854-64.
131. Chung J, Mercurio AM. Contributions of the  $\alpha 6$  integrins to breast carcinoma survival and progression. *Mol Cells*. 2004;17(2):203-9.

132. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Ohta K, Uemura M, Nishimura J, et al. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol*. 2013;43(2):425-30.
133. Yamamoto H, Masters JR, Dasgupta P, Chandra A, Popert R, Freeman A, et al. CD49f Is an Efficient Marker of Monolayer- and Spheroid Colony-Forming Cells of the Benign and Malignant Human Prostate. *Plos One*. 2012;7(10).
134. Yang B, Chen ZF, Huang Y, Han GX, Li WZ. Identification of potential biomarkers and analysis of prognostic values in head and neck squamous cell carcinoma by bioinformatics analysis. *Oncotargets Ther*. 2017;10:2315-21.
135. Chen T, You YA, Jiang H, Wang ZZ. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J Cell Physiol*. 2017;232(12):3261-72.
136. Davis SJ, Divi V, Owen JH, Bradford CR, Carey TE, Papagerakis S, et al. Metastatic potential of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;136(12):1260-6.
137. Ma XY, Chen JY, Liu JJ, Xu BX, Liang XY, Yang XT, et al. IL-8/CXCR2 mediates tropism of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward CD133(+)/CD44(+)Colon cancer stem cells. *J Cell Physiol*. 2021;236(4):3114-28.
138. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, AlmeidaPorada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90(12):5002-12.
139. Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, De Francesco F, Pirozzi G, Galderisi U, et al. Detection and Characterization of CD133(+) Cancer Stem Cells in Human Solid Tumours. *Plos One*. 2008;3(10).
140. Zito G, Richiusa P, Bommarito A, Carissimi E, Russo L, Coppola A, et al. In Vitro Identification and Characterization of CD133(pos) Cancer Stem-Like Cells in Anaplastic Thyroid Carcinoma Cell Lines. *Plos One*. 2008;3(10).
141. Wu MJ, Jan CI, Tsay YG, Yu YH, Huang CY, Lin SC, et al. Elimination of head and neck cancer initiating cells through targeting glucose regulated protein78 signaling. *Mol Cancer*. 2010;9.
142. Griend DJV, Karthaus WL, Dalrymple S, Meeker A, DeMarzo AM, Isaacs JT. The Role of CD133 in Normal Human Prostate Stem Cells and Malignant Cancer-Initiating Cells. *Cancer Research*. 2008;68(23):9703-11.
143. Chu P, Clanton DJ, Snipas TS, Lee J, Mitchell E, Nguyen ML, et al. Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties. *Int J Cancer*. 2009;124(6):1312-21.
144. Yin SY, Li JJ, Hu C, Chen XH, Yao M, Yan MX, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*. 2007;120(7):1444-50.
145. Chen YS, Wu MJ, Huang CY, Lin SC, Chuang TH, Yu CC, et al. CD133/Src Axis Mediates Tumor Initiating Property and Epithelial-Mesenchymal Transition of Head and Neck Cancer. *Plos One*. 2011;6(11).

146. Guerrero-Preston R, Godoy-Vitorino F, Jedlicka A, Rodriguez-Hilario A, Gonzalez H, Bondy J, et al. 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, Human Papilloma Virus infection and surgical treatment. *Oncotarget*. 2016;7(32):51320-34.
147. Sasaki M, Yamaura C, Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Kodama Y, Ohya T, et al. *Streptococcus anginosus* infection in oral cancer and its infection route. *Oral Dis*. 2005;11(3):151-6.
148. Lee WH, Chen HM, Yang SF, Liang C, Peng CY, Lin FM, et al. Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer. *Sci Rep-Uk*. 2017;7.
149. Pushalkar S, Ji XJ, Li YH, Estilo C, Yegnanarayana R, Singh B, et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *Bmc Microbiology*. 2012;12.
150. Galvao-Moreira LV, da Cruz MCFN. Oral microbiome, periodontitis and risk of head and neck cancer. *Oral Oncology*. 2016;53:17-9.
151. Katz J, Onate MD, Pauley KM, Bhattacharyya I, Cha S. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in gingival squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci*. 2011;3(4):209-15.
152. Guerrero-Preston R, Godoy-Vitorino F, Jedlicka A, Rodriguez A, Gonzalez H, Bondy J, et al. 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, Human Papilloma Virus infection and surgical treatment. *Toxicol Lett*. 2016;259:S55-S.
153. Shiga K, Tateda M, Saijo S, Hori T, Sato I, Tateno H, et al. Presence of *Streptococcus* infection in extra-oropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma and its implication in carcinogenesis. *Oncol Rep*. 2001;8(2):245-8.
154. Narikiyo M, Tanabe C, Yamada Y, Igaki H, Tachimori Y, Kato H, et al. Frequent and preferential infection of *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus anginosus* in esophageal cancers. *Cancer Sci*. 2004;95(7):569-74.
155. Peters BA, Wu J, Pei ZH, Yang LY, Purdue MP, Freedman ND, et al. Oral Microbiome Composition Reflects Prospective Risk for Esophageal Cancers. *Cancer Research*. 2017;77(23):6777-87.
156. Healy CM, Moran GP. The microbiome and oral cancer: More questions than answers. *Oral Oncology*. 2019;89:30-3.
157. Yao QW, Zhou DS, Peng HJ, Ji P, Liu DS. Association of periodontal disease with oral cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014;35(7):7073-7.
158. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2002;29:177-206.
159. Karpinski TM. Role of Oral Microbiota in Cancer Development. *Microorganisms*. 2019;7(1).
160. Harth-Chu EN, Alves LA, Theobaldo JD, Salomao MF, Hofling JF, King WF, et al. PcsB Expression Diversity Influences on *Streptococcus mitis* Phenotypes Associated With Host Persistence and Virulence. *Front Microbiol*. 2019;10:2567.

161. Principe S, Hui ABY, Bruce J, Sinha A, Liu FF, Kislinger T. Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer: Implications for tumor biology and biomarker discovery. *Proteomics*. 2013;13(10-11):1608-23.
162. Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, Gimzewski JK. Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes. *Langmuir*. 2011;27(23):14394-400.
163. Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(1):101-10.
164. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *P Natl Acad Sci USA*. 2007;104(3):973-8.
165. Havel LS, Kline ER, Salgueiro AM, Marcus AI. Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2-Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity. *Oncogene*. 2015;34(15):1979-90.
166. Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic DM. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol*. 2010;189(3):541-56.
167. Whipple RA, Balzer EM, Cho EH, Matrone MA, Yoon JR, Martin SS. Vimentin filaments support extension of tubulin-based microtentacles in detached breast tumor cells. *Cancer Research*. 2008;68(14):5678-88.
168. Beckler MD, Higginbotham JN, Franklin JL, Ham AJ, Halvey PJ, Imasuen IE, et al. Proteomic Analysis of Exosomes from Mutant KRAS Colon Cancer Cells Identifies Intercellular Transfer of Mutant KRAS. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013;12(2):343-55.
169. Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012;18(6):883-+.
170. Atay S, Banskota S, Crow J, Sethi G, Rink L, Godwin AK. Oncogenic KIT-containing exosomes increase gastrointestinal stromal tumor cell invasion. *P Natl Acad Sci USA*. 2014;111(2):711-6.
171. Yang YY, Bucan V, Baehre H, Von der Ohe J, Otte A, Hass R. Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes. *Int J Oncol*. 2015;47(1):244-52.
172. Corrado C, Raimondo S, Saieva L, Flugy AM, De Leo G, Alessandro R. Exosome-mediated crosstalk between chronic myelogenous leukemia cells and human bone marrow stromal cells triggers an Interleukin 8-dependent survival of leukemia cells. *Cancer Letters*. 2014;348(1-2):71-6.
173. Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Research*. 2010;70(23):9621-30.

174. Yang CY, Yeh YM, Yu HY, Chin CY, Hsu CW, Liu H, et al. Oral Microbiota Community Dynamics Associated With Oral Squamous Cell Carcinoma Staging. *Front Microbiol.* 2018;9.
175. Furquim CP, Soares GMS, Ribeiro LL, Azcarate-Peril MA, Butz N, Roach J, et al. The Salivary Microbiome and Oral Cancer Risk: A Pilot Study in Fanconi Anemia. *Journal of Dental Research.* 2017;96(3):292-9.
176. Perera M, Al-hebshi NN, Perera I, Ipe D, Ulett GC, Speicher DJ, et al. Inflammatory Bacteriome and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Dental Research.* 2018;97(6):725-32.
177. Nagy KN, Sonkodi I, Szoke I, Nagy E, Newman HN. The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncology.* 1998;34(4):304-8.
178. Zhang YH, Wang X, Li HX, Ni C, Du ZB, Yan FH. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:883-93.
179. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, et al. The Role of IL-1 beta in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response. *J Immunol.* 2013;190(7):3500-9.
180. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *P Natl Acad Sci USA.* 2003;100(5):2645-50.
181. Wang FM, Liu HQ, Liu SR, Tang SP, Yang L, Feng GS. SHP-2 promoting migration and metastasis of MCF-7 with loss of E-cadherin, dephosphorylation of FAK and secretion of MMP-9 induced by IL-1beta in vivo and in vitro. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;89(1):5-14.
182. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;121:11-22.
183. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006;8 Suppl 2:S3.
184. Murata M, Thanan R, Ma N, Kawanishi S. Role of nitrate and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:623019.
185. Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer.* 2006;42(6):745-50.
186. Yilmaz O, Jungas T, Verbeke P, Ojcius DM. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway contributes to survival of primary epithelial cells infected with the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2004;72(7):3743-51.
187. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014.
188. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-+.

189. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer S, Chakraborty B, Wen ZZ, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr*. 2018;6(5).
190. Hooper SJ, Crean SJ, Fardy MJ, Lewis MAO, Spratt DA, Wade WG, et al. A molecular analysis of the bacteria present within oral squamous cell carcinoma. *Journal of Medical Microbiology*. 2007;56(12):1651-9.
191. Mazzio EA, Smith B, Soliman KFA. Evaluation of endogenous acidic metabolic products associated with carbohydrate metabolism in tumor cells. *Cell Biol Toxicol*. 2010;26(3):177-88.



## 8. EKLER

### EK-1: Tez Çalışması ile ilgili Etik Kurul İzni



T.C.  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-871

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 23 HAZİRAN 2020 SALI  
Toplantı No : 2020/12  
Proje No : GÖ 20/595(Değerlendirme Tarihi: 23.06.2020)  
Karar No : 2020/12-17

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Dr. Öğr. Üyesi Didem KART ile birlikte çalışacakları ve Üzm. Dt. Meriç Bilgiç KÜÇÜKGÜVEN'in yüksek lisans tezi olan, GÖ 20/595 kayıt numaralı "*Baş Boyun Kanserli Hastaların Tükürük Örneklerinden İzole Edilen Eksozom ve Bakterilerin, Sağlıklı Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Eylül 2020-01 Eylül 2021 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Başkan)	9. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	10. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
İZİNLİ			
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA	(Üye)	11. Doç. Dr. İl. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
4. Prof. Dr. N. N. ANGLAM	(Üye)	12. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
5. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	13. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
İZİNLİ			
6. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)	14. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	(Üye)
7. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	15. Av. Meltem ONURLU	(Üye)
8. Doç. Dr. Gözde GİRGIN	(Üye)		

**EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar**

1. Bilgiç Küçüküven M., Çelebi-Saltık B. Different Aspects of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Cancer Stem Cells, their Niche and Targeted Therapy. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2021, 16, 1-21.
2. Bilgiç Küçüküven M., Çelebi-Saltık B. Stem Cell Based Exosomes: Are They Effective in Disease or Health?. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2021;1341:45-65.



### EK-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

## BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARIN TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN EKSOZOM VE BAKTERİLERİN, SAĞLIKLI KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

#### ORJİNALLİK RAPORU

<b>%7</b> BENZERLİK ENDEKSİ	<b>%5</b> İNTERNET KAYNAKLARI	<b>%2</b> YAYINLAR	<b>%4</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Hacettepe University</b> Öğrenci Ödevi	<b>%2</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to Envoyé à Univerza v Ljubljani le 2012-10-08</b> Öğrenci Ödevi	<b>%1</b>
<b>3</b>	<b>pdfs.semanticscholar.org</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>4</b>	<b>www.mdpi.com</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	<b>nek.istanbul.edu.tr:4444</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	<b>www.pedistem.hacettepe.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>7</b>	<b>openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>8</b>	<b>bmcmicrobiol.biomedcentral.com</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>

**EK-4: Dijital Makbuz****Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Meriç Bilgiç Küçüküven  
Ödev başlığı: BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARIN TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİND...  
Gönderi Başlığı: BAŞ BOYUN KANSERLİ HASTALARIN TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİND...  
Dosya adı: TEZ\_SON\_BASIM\_BETACOPY.docx  
Dosya boyutu: 6.46M  
Sayfa sayısı: 57  
Word count: 11,539  
Karakter sayısı: 78,342  
Gönderim Tarihi: 25-Oca-2022 10:02ÖÖ (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1747706776

