



TC
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA İLAÇ DİRENCİ
VE PLURİPOTENSİ İLİŞKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Hazırlayan
Başak Bilge SÜER

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi

Mayıs 2024
KAYSERİ

TC
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

**MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA İLAÇ DİRENCİ VE
PLURİPOTENSİ İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan
Başak Bilge SÜER

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2023-12935 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Mayıs 2024
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı- Soyadı: Başak Bilge SÜER

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Meme Kanseri Hücre Hattında İlaç Direnci ve Pluripotensi İlişkisinin Değerlendirilmesi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Başak Bilge SÜER

Danışman
Prof. Dr. Servet ÖZCAN

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Prof. Dr. Servet ÖZCAN danışmanlığında **Başak Bilge SÜER** tarafından hazırlanan “**Meme Kanseri Hücre Hattında İlaç Direnci ve Pluripotensi İlişkisinin Değerlendirilmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

06.05.2024

İmza

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Kemal Erdem BAŞARAN.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Emel Başak GENCER AKÇOK

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılması hususlarında ve yüksek lisans eğitimim süresince göstermiş olduğu destek ve yardımlarından ötürü tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Servet ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi birikimi ve deneyimleriyle yüksek lisansım süresince desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan Dr. Mustafa Burak ACAR'a teşekkür ederim.

Prof. Dr. Coşkun TEZ'e destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yanımda olan ekip arkadaşlarım; Nilay ALTINSOY'a, Zeynep GÜNAYDIN'a, Murat ÇOKKEÇECİ'ye, Selin Kübra YILDIR'a, Şirin KARDAŞ'a, Fatih ÖMERLİ'ye ve GENKÖK personeline teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteğini esirgemeyen ve her koşulda yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan arkadaşım İrem KÜÇÜK, sevgili annesi ve değerli ailesine teşekkür ederim.

Ayrıca bu tez çalışmasını destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Başak Bilge SÜER

Mayıs, 2024

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA İLAÇ DİRENCİ VE PLURİPOTENSİ İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Başak Bilge SÜER

**Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Kök Hücre Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Mayıs 2024
Danışman: Prof. Dr. Servet ÖZCAN**

ÖZET

Meme kanseri ölümlerinin büyük bir kısmından sorumlu olan meme kanseri agresif alt tipi Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC) kemoterapiye dirençlidir ve bu alt tipte kemoterapi sonrası nüks yaygındır. Kanser Kök Hücrelerinin (KKH) dirence ve nükse neden olduğu bilinmektedir. Kemoterapi tedavisinde canlı kalan dirençli KKH'ler tümör popülasyonunu tedavinin kesilmesinden sonra tekrar oluşturur. Kanserin tekrarlamasına neden olan bu dirençli alt popülasyonun aydınlatılması önemlidir. Bu tez çalışmasıyla; meme kanserinde ilaç direncinin pluripotensi ile ilişkili olup olmadığını irdelemeyi amaçladık. Ayrıca kemoterapi sonrası nükse sebebiyet veren hücre grubunun pluripotensi karakterde olup olmadığı hipotezini test ettik. Bu amaç doğrultusunda; TNBC hücre serisi MDA-MB-231 hücrelerine 28 gün boyunca kemoterapi ajanı Doksorubisin (DOX) uygulandı ve 28. günün sonunda canlı kalan hücrelerin pluripotent belirteçleri (SSEA-3, SSEA-4 ve TRA-1-60) yönünden pozitiflik oranı, akış sitometrisi ve konfokal mikroskobu kullanılarak incelendi. Bulgulara göre; DOX uygulamasından sonra, canlı kalan kanser popülasyonunda, SSEA-3, SSEA-4 ve TRA-1-60 pluripotent belirteçleri taşıyan hücre oranında belirgin artış olduğu görülmüştür. DOX uygulamasından sonra GFP (+) hücrelerinin oranının pluripotent hücrelerin oranından daha yüksek olduğu belirlendi. Sonuç olarak agresif meme kanserinde kemoterapi sonrası canlı kalan hücrelerin çoğunun pluripotent karakterde olduğu görülmüştür. Bu pluripotent hücrelerin sonrasında farklılaşmasıyla nüks gerçekleşmektedir. Özetle, kemoterapi sonrası canlı kalan hücrelerin büyük bir kısmının başlangıçta %2 oranındaki pluripotent kanser kök hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İlaç Direnci; Kanser Kök Hücreleri; Meme Kanseri; Pluripotensi; TNBC

THE EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN DRUG RESISTANCE AND PLURIPOTENCY IN BREAST CANCER CELL LINE

Başak Bilge SÜER

Erciyes University Institute of Health Sciences

Stem Cell Sciences

Master's Thesi, May 2024

Supervisor: Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ABSTRACT

Chemotherapy resistance and post-chemotherapy relapse are common in Triple Negative Breast Cancer (TNBC), the aggressive subtype responsible for the majority of breast cancer deaths. Cancer Stem Cells (CSC) are known to cause resistance and recurrence in cancer. Surviving, refractory CSCs repopulates tumor population after chemotherapy discontinuation. It is important to elucidate this resistant subpopulation that causes cancer recurrence. With this thesis study; we aimed to examine whether drug resistance in cancer is associated with pluripotency by applying drugs to breast cancer cells. We also tested the hypothesis whether the cell group that causes relapse after chemotherapy is pluripotent. In accordance with this purpose; the chemotherapy agent doxorubicin (DOX) was administered to the TNBC cell line MDA-MB-231 cells for 28 days and on day 28, the pluripotency (SSEA-3, SSEA-4 ve TRA-1-60) positivity rate of surviving cells was examined using flow cytometry and confocal microscopy. According to the findings; an increase in the proportion of cells carrying the pluripotent markers SSEA-3, SSEA-4, and TRA-1-60 was identified in the surviving cancer population after DOX administration. After DOX application, the proportion of GFP (+) cells was observed to be higher than the proportion of pluripotent cells. In conclusion; in aggressive breast cancer, most cells that survive after chemotherapy have been shown to be pluripotent. Relapse occurs with subsequent differentiation of these pluripotent cells. In summary, the majority of surviving cells initially originated from 2% pluripotent cells.

Key Words: Breast Cancer; Cancer Stem Cell; Drug Resistance; Pluripotency; TNBC.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR.....	x
TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Kök Hücre.....	3
2. 1. 1. Pluripotensi	6
2. 2. Kanser	7
2. 2. 1. Meme Kanseri.....	8
2. 2. 1. 1. Üçlü Negatif Meme Kanserleri (TNBC).....	9
2. 2. 1. 1. 1. MDA-MB-231	10
2. 2. 2. Kemoterapi.....	11
2. 2. 2. 1. Doksorubisin.....	12
2. 2. 2. 2. İlaç Direnci	13
2. 2. 3. Kanser Kök Hücresi	15

3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3. 1. Hücre Temini ve Kültürü	17
3. 2. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC) Tayini	18
3. 3. Green Fluorescent Protein (GFP) Transfeksiyonu.	18
3. 4. İmmünoflorasan Boyama ve Konfokal Mikroskopta Görüntüleme.....	19
3. 5. Manyetik Aktif Hücre Sıralaması (MACS) Kullanılarak Pluripotent Hücrelerin Seçimi ve Pozitif Hücrelerin Negatif Grup ile Karıştırılması	20
3. 6. Hücre Gruplarına Doksorubisin Uygulanması.....	21
3. 7. DOX Sonrası İmmünoflorasan Boyama ve Konfokal Mikroskopta Görüntüleme	21
3. 8. DOX Sonrası Hücrelerin Akış Sitometri Analizi.....	22
3. 9. Biyoistatistik Analizler	23
4. BULGULAR.....	24
4.1 Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC) Tayini Bulguları	24
4. 2. GFP ile Transfeksiyonu Sonrası Konfokal Mikroskop Bulguları	25
4. 3. DOX Sonrası İmmünoflorasan Boyama ve Konfokal Mikroskop Bulguları.....	27
4. 4. DOX Sonrası Akış Sitometrisi Bulguları.....	29
4. 5. DOX Sonrası Mikroskop Görüntüleri.....	32
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	39
7. KAYNAKLAR	40
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ATCC	: American Type Culture Collection
AKT	: Amerikan Kanser Topluluğu (American Cancer Society)
BSA	: Bovin Serum Albümin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DPBS	: Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Çözeltisi
DOX	: Dokсорubisin Hidroklorür
E Buffer	: Electrolytic Buffer
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ER	: Östrojen Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
GFP	: Green Fluorescent Protein
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2
KKH	: Kanser Kök Hücre
MACS	: Manyetik Aktif Hücre Sıralaması
MIC	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
PBS	: Phosphatasebuffered Saline
PR	: Progesteron Reseptörü
PS	: Penisilin-Streptomisin
R Buffer	: Resusension Buffer
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SSEA-3	: Stage Specific Embryonic Antigen-3

SSEA-4 : Stage Specific Embryonic Antigen-4

STR : Kısa Ardışık Tekrarlar

TNBC : Üçlü Negatif Meme Kanseri

TRA-1-60 : Podocalyxin

WT : Wild Tıpe



ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2. 1. Yeni Kanser Vakaları ve Ölümleri Global-2018.....	7
Tablo 4. 1. MACS Sonrası Grup Konfokal GFP (+) Hücre Yüzdeleri Başlangıç ve DOX 28. Gün.....	28
Şekil 2.1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeline ve kökenlerine göre sınıflandırılması.....	3
Şekil 2.2. Döllenmeden yaklaşık dört gün sonra blastosist aşamasındaki embriyonun iç hücre kütlesi kullanılarak pluripotent kök hücrelerin elde edilmesi.....	5
Şekil 2.3. 2022 yılında Türkiye'de kadınlarda görülen yeni kanser vakaları	8
Şekil 2.4. Kanserde ilaç direnci modelleri.....	14
Şekil 4.1. Higromisin B için MIC Tayini. Farklı yoğunlukta higromisin uygulanan MDA-MB-231 hücre kültürlerinin 15 gün boyunca mikroskopta takibi .	25
Şekil 4.2. GFP transfeksiyonu sonrası transfekte hücreler ve WT hücrelerin konfokal mikroskop görüntülerinin karşılaştırması.....	26
Şekil 4.3. MACS sonrası kontrol ve DOX 28. gün konfokal mikroskop görüntüleri.	28
Şekil 4.4. Konfokal sonuçlarına göre MACS sonrası grup GFP (+) hücre yüzdesi başlangıç ve DOX 28. gün.....	28
Şekil 4.5. MDA-MB-231 hücre popülasyonunda başlangıçtaki pluripotent belirteçleri SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 pozitif hücre oranları	29
Şekil 4.6. 28 gün DOX uygulanmış MDA-MB-231 hücre popülasyonunda pluripotent belirteçleri SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 pozitif hücre oranları.....	30
Şekil 4.7. Akış sitometri sonuçlarına göre WT grup Pluripotent hücre yüzdesi başlangıç ve DOX 28. gün.....	30
Şekil 4.8. WT grup ve 28 gün DOX uygulanmış başlangıçta %2 GFP (+) olan MACS sonrası grup akış sitometri analizleri ve GFP oranları.	31
Şekil 4.9. Akış sitometri sonuçlarına göre MACS sonrası grup GFP (+) hücre yüzdesi başlangıç ve DOX 28. gün	31

Şekil 4.10. MACS sonrası grup başlangıç ve 28 gün DOX uygulandıktan sonraki, WT grup başlangıç ve 28 gün DOX uygulandıktan sonraki ışık mikroskobu görüntüleri.**32**



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler, kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesine sahip özelleşmiş hücrelerdir (Donovan ve Gearhart, 2001). Yetişkin kök hücreler, nispeten farklılaşmamış, tüm dokularda bulunan hücrelerin küçük bir yüzdesidir. Kendini yenileme ve farklılaşma yetenekleri ile bu hücreler doku onarımı ve homeostazide önemlidir (Donovan ve Gearhart, 2001). Yetişkin kök hücreler genellikle yüksek DNA onarım kapasitesi gösterir ve bu kapasite farklılaşmayla azalır (Rocha ve ark., 2013). Yetişkin kök hücreler arasında farklılaşma kapasitesi en fazla olan kök hücreler pluripotent karakterdeki kök hücrelerdir (Kuroda ve ark., 2010). Kök hücrelerin dokularda varlığını uzun süre sürdürmesi, popülasyonun devamını sağlaması bazı kanserlerinin kök hücrelerden köken alabileceğini düşündürmüştür (Foster ve ark., 2002).

Kanser, hücre tiplerinin çoğundan kaynaklanır ve hücrelerin nispeten sınırsız çoğalmasıyla karakterize edilir (Stratton ve ark., 2009). Ülkeler eğitim, sağlık, yaşam standardına göre; düşük, orta, yüksek ve çok yüksek İnsani Gelişme Endeksli ülkeler şeklinde gruplandırılır. Meme kanseri dünya çapında kadınlarda kansere bağlı ölümden birinci sıradadır. Orta İnsani Gelişme Endeksli ülkelerde kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve diğer İnsani Gelişme Endeks seviyelerindeki ülkelerde ikinci sıradadır (Society, 2018). 5 yılda hayatta kalma oranları; meme kanserinde %90, Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC) ise genel durumda %77, uzak metastaz saptandığında ise %12'dir (Siegel ve ark., 2021). TNBC hormon bağımsız

olması ile bilinen meme kanserinin agresif alt tipidir ve meme kanseri ölümlerinin büyük bir kısmından sorumludur (Bauer ve ark., 2007; Masuda ve ark., 2013).

TNBC'de nüks oranı yüksektir ve nükseden tümörlerde kemoterapiye direnç yaygındır. (André ve Zielinski, 2012). TNBC'de kemoterapi direncine ve tümörün nüksetmesine kanser kök hücrelerinin (KKH) neden olduğuna dair kanıtlar vardır (Lee ve ark., 2011). KKH modeline göre; kemoterapiyle normal tümör hücreleri ölürken ilaca dirençli kök hücreler canlı kalır. Tedavi kesildikten sonra bu hücreler başlangıçtaki gibi tümörü tekrar oluşturur (Dean ve ark., 2005). Dolayısıyla eğer tümör kontrol altına alınmak isteniyorsa temelde bu hücrelerin kontrol altına alınması gerekmektedir (Wicha ve ark., 2006).

Meme kanseri kök hücrelerinin normal meme kanseri hücrelerine oranla metastaz ve direnç yeteneklerinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu nedenle meme kanseriyle başa çıkabilmek için de meme kanseri kök hücre popülasyonunun aydınlatılması önemlidir (Tang ve ark., 2007). TNBC'nin ilaca direnç sebeplerinin daha iyi anlaşılması kanser için yeni tedavi yönteminin bulunmasına katkı sağlayacaktır. Bir antrasiklin antibiyotik olan DOX, TNBC tedavisinde en etkili ajanlardan kabul edilmektedir. Ne yazık ki, TNBC'de DOX direnci yaygın bir sorundur. (André ve Zielinski, 2012).

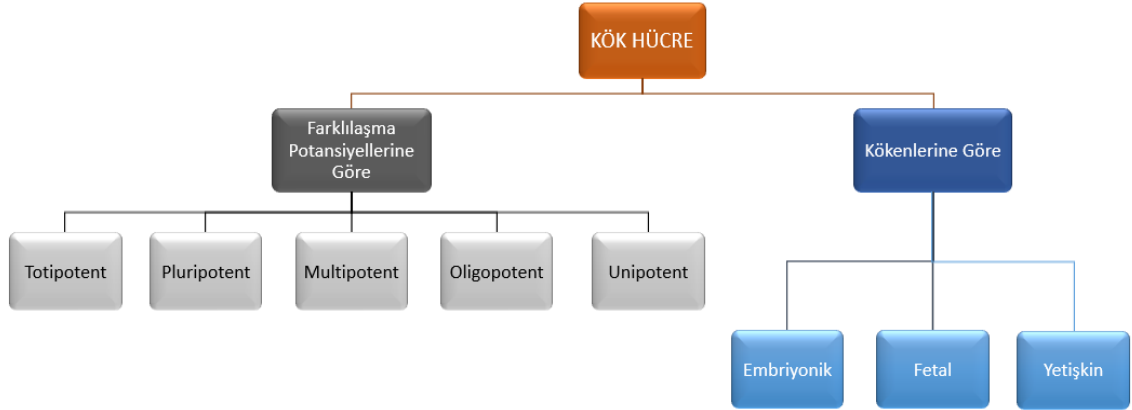
Tüm bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, meme kanserinde ilaç uygulamasından sonra canlı kalan hücrelerin pluripotent kök hücreler ile aynı karaktere sahip olabileceğini ileri sürmekteyiz. Çalışmamızda direncin ve kemoterapi sonrası nüksün temel sebeplerinin anlaşılması için meme kanseri hücrelerine ilaç uygulayarak kanserde ilaç direncinin ve nüksün pluripotensi ile ilişkili olup olmadığının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen verilerin, meme kanserinde kanser kök hücre benzeri hücrelerin karakterize edilmesiyle; meme kanseri direnç çalışmalarına, kanser için yeni tedavi yöntemlerinin bulunmasına katkı sağlayacağı ve nüks, direnç ve metastaz gibi fenomenlerin aydınlatılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler, uzun vadede kendini yenileme, yaşlanmama ve bir veya birden çok hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip özelleşmiş hücrelerdir (Donovan ve Gearhart, 2001).



Şekil 2.1. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeline ve kökenlerine göre sınıflandırılması.

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak beş gruba ayrılabilir (Şekil 2.1)(Kolios ve Moodley, 2013).

Totipotent kök hücreler, tüm embriyonik ve ekstra-embriyonik dokulara yol açma potansiyeli ile embriyoyu ve plasentayı oluştururlar; ancak gelişimi *in vitro* olarak yakalanmamıştır. Döllenmiş yumurta totipotent hücreye bir örnektir (Ilic ve ark., 2011; Rossant, 2001).

Embriyonik kök hücreler olarak bilinen pluripotent kök hücrelerse, vücudun tüm dokularını oluşturabilen ancak ekstra embriyonik dokulara sınırlı katkı sağlayan kök hücrelerdir (Rossant, 2001).

Multipotent kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi, köken aldıkları dokudaki hücre türlerini oluşturmakla sınırlıdır. Tüm kan hücrelerine farklılaşabilen hematopoietik kök hücreler, yaygın olarak bilinen multipotent kök hücre örneğidir (Augello ve ark., 2010).

Oligopotent kök hücreler yalnızca yakın ilişkili hücre tiplerine farklılaşabilir. Miyeloid ve lenfoid hücreler oligopotent kök hücrelerdir (Ilic ve ark., 2011).

Unipotent kök hücreler ise, sınırlı gelişim potansiyeli sergilerler ve spermatogoniyalın sperme farklılaşması gibi yalnızca tek bir hücre tipine yol açar (De Los Angeles ve ark.,2015).

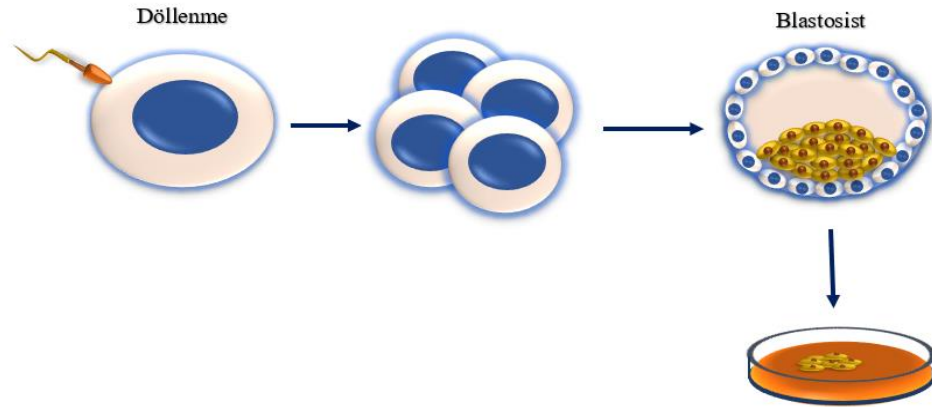
Kök hücreler simetrik bölünmeyle kök hücre özelliklerini korudukları iki eş hücre üretebilirken; birinin kök hücre olarak kaldığı, diğerinin ise farklılaşarak özelleşmiş hücrelere dönüştüğü asimetrik bölünme gerçekleştirilerek birbirinden farklı iki hücre de oluşturabilir (Ulloa-Montoya ve ark., 2005).

Kök hücreler görevlerinin daha iyi anlaşılması için kökenlerine göre; embriyonik, fetal ve yetişkin kök hücreler olarak üç grupta değerlendirilebilir (Şekil 2.1). Yetişkin kök hücrelerin vücutta çoğu organda yer aldığı bilinir. Bu kök hücreler nispeten farklılaşmamıştır ve dokulardaki toplam hücrelerin küçük bir yüzdesini oluşturur. Asimetrik ve simetrik bölünme ile kök hücre oranını ve hücre popülasyonunu apoptoz gibi süreçlere karşı dengede tutar. Kendini yenileme ve farklılaşma yetenekleri ile kök hücreler doku onarımı ve homeostazide önemlidir (Donovan ve Gearhart, 2001). Ayrıca dokularda uzun süre boyunca varlığını sürdürerek popülasyonun devamını sağlaması bazı doku kanserlerinin kök hücrelerden köken alabileceğini düşündürmüştür (Foster ve ark., 2002).

Fetal kök hücreler iki farklı kaynaktan izole edilebilir. Bunlar; fetusun kendisi ve destekleyici ekstra embriyonik yapılar. Kan, böbrek, karaciğer, akciğer gibi fetal dokular kök hücre kaynağıdır. Ayrıca amniyotik membran, amniyotik sıvı, wharton jölesi ve plasenta gibi ekstra embriyonik dokulardan da kök hücreler izole edilmiştir ancak etik itirazlar bunların uygulanmasındaki başlıca sorundur (Marcus ve ark., 2008; Kmiecik ve ark., 2013).

Embriyonik kök hücreler ise; endoderm, ektoderm ve mezoderm olarak adlandırılan üç embriyonik germ tabakasına farklılaşabilen pluripotent özellikli kök hücrelerdir (Martin, 1981; Kleinsmith ve Pierce, 1964).

Kültürde yetiştirilebilen ilk pluripotent hücreler bir tümör olan teratokarsinomlar olsa da, blastosist aşamasındaki embriyonun iç hücre kütesinden pluripotent kök hücre elde edilebildiğinin keşfedilmesiyle bu yöntem yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Şekil 2.2) (Martin, 1981; Stevens, 1958).



Şekil 2.2. Pluripotent kök hücrelerin döllenmeden yaklaşık dört gün sonra blastosist aşamasındaki embriyonun iç hücre kütesi kullanılarak kültüre edilmesi (Donovan ve Gearhart, 2001).

Embriyonik kök hücrelere alternatif olarak yeniden programlamayla ve çekirdek transferiyle pluripotent hücreler elde edilir. Ayrıca halihazırda yetişkin dokulardan da pluripotent özellikte kök hücreler elde edilir (Liu ve ark., 2020).

Yetişkin pluripotent kök hücreler teratom oluşturmadan tek bir hücreden *in vivo* ve *in vitro* olarak u germ katmanını üretebilir. Strese dayanıklıdır ve embriyonik kök hücrelerden farklı olarak çoğalma aktiviteleri çok yüksek değildir (Kuroda ve ark., 2010). Yetişkin kök hücreleri genellikle yüksek DNA onarım kapasitesi gösterir ve bu kapasite farklılaşmayla azalır. DNA hasarı gerçekleşmezse veya yanlış onarırsa kök hücrede mutasyonlar birikerek genetik istikrarsızlığa ve kanserleşmeye sebep olabilir (Rocha ve ark., 2013).

2.1.1. Pluripotensi

Pluripotensi tek bir hücrenin, gelişmekte olan ve yetişkin organizmanın tüm hücre soylarını esnek bir şekilde oluşturma kapasitesidir (Silva ve ark., 2009).

Pluripotent hücreler onları diğer hücre tiplerinden ayıran birçok ortak özelliğe sahiptir. Bu özelliklerden bazıları dokulardan ve yetişkin hücrelerden elde edilen pluripotent hücrelerin seçiminde ve karakterizasyonunda kullanılabilir. Pluripotent kök hücreler Oct4, Nanog ve Sox2 transkripsiyon faktörlerini, hücre yüzey proteinleri olan glikolipid antijenleri; Stage Specific Embryonic Antigen (SSEA) 3 ve SSEA-4 ve keratan sülfatla ilişkili TRA-1-60 ve TRA-1-81 antijenlerini eksprese ederler. Hücre seçiminde hücre yüzey belirteçlerinin kullanılması sağlam ve basit bir yöntemdir (Goodwin ve ark., 2020; Thomson ve ark., 1995; Wang ve ark., 2012).

Buna ek olarak bir membran enzimi olan alkalen fosfataz insanlarda farklı dokularda bulunmasına rağmen pluripotent özellikteki plasentada bulunanı yüksek sıcaklığa dayanıklı olması ile diğer dokulardan ayrılır. Bu nedenle immün boyama öncesi ısı uygulamasıyla plasentada olmayan alkalen fosfatazlar etkisiz hale getirilebilir. Ayrıca farklılaşma testleri, karyotip analizi, kısa ardışık tekrar (STR) analizi gibi analizler de karakterizasyonda kullanılabilir (Martı ve ark., 2013).

2.2. Kanser

Kanser; genellikle doğrudan veya dolaylı olarak genom hasarıyla başlayan, hücre tiplerinin çoğundan köken alabilen, mikroçevresinin büyüme ve büyüme karşıtı sinyallerinden bağımsız şekilde nispeten sınırsız çoğalabilen, apoptoza dirençli, normal doku sınırlarını aşarak metastaz yapabilen heterojen bir hastalıktır (Hanahan ve Weinberg, 2000; Stratton ve ark., 2009). Tedavi edilmediğinde ölümle sonuçlanma oranı yüksektir. Ayrıca dünya çapında her 6 ölümden 1'inin nedeni olan yaygın bir hastalıktır (Society, 2018).

Tablo 2.1. Yeni Kanser Vakaları ve Ölümleri Global-2018 (Society, 2018)

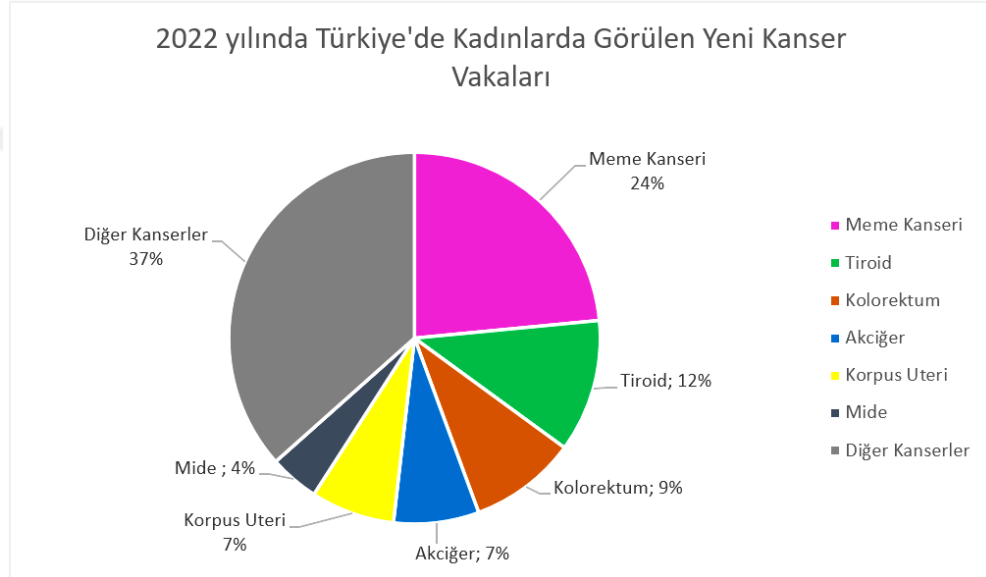
	Erkek			Kadın		
Yeni Kanser Vakaları	Akciğer & bronş	1,368,500	%16	Meme	2,088,800	%25
	Prostat	1,276,100	%14	Kolon & rektum	823,300	%10
	Kolon & rektum	1,026,200	%12	Akciğer & bronş	725,400	%9
	Mide	683,800	%8	Rahim Ağzı	569,800	%7
	Karaciğer	596,600	%7	Tiroid	436,300	%5
	Mesane	424,100	%5	Uterin korpus	382,100	%5
	Özafagus	399,700	%5	Mide	349,900	%4
	Non-Hodgkin lenfoma	284,700	%3	Ovaryum	295,400	%4
	Böbrek	254,500	%3	Karaciğer	244,500	%3
	Lösemi	249,500	%3	Non-Hodgkin lenfoma	224,900	%3
	Toplam Vaka	8,818,700		Toplam Vaka	8,218,200	

	Erkek			Kadın		
Kanser Ölüm Oranları	Akciğer & bronş	1,184,900	%22	Meme	626,700	%15
	Karaciğer	548,400	%10	Akciğer & bronş	576,100	%14
	Mide	513,600	%10	Kolon & rektum	396,600	%10
	Kolon & rektum	484,200	%9	Rahim Ağzı	311,400	%8
	Prostat	359,000	%7	Mide	269,100	%6
	Özafagus	357,200	%7	Karaciğer	233,300	%6
	Pankreas	226,900	%4	Pankreas	205,300	%5
	Lösemi	179,500	%3	Ovaryum	184,800	%4
	Mesane	148,300	%3	Özefagus	151,400	%4
	Non-Hodgkin lenfoma	146,000	%3	Lösemi	129,500	%3
	Toplam Vaka	5,347,300		Toplam Vaka	4,142,600	

Amerikan Kanser Topluluğu (American Cancer Society) (AKT)'nin verilerine göre; dünya çapında erkeklerde görülen kanser vakalarının %16'sı akciğer kanseri, %14'ü prostat kanseridir. En yüksek oranda görülen bu iki kanserden akciğer kanseri %22 ile erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Kadınlarda görülen kanser vakalarının %25'i meme kanseri, %10'u kolon kanseridir. Kadınlarda meme kanseri %15 oranında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir (Tablo 2.1) (Society, 2018).

2.2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda en sık teşhis edilen kanserdir ve kadınlarda kansere bağlı ölüme birinci sıradadır. Ülkeler eğitim, sağlık, yaşam standardına göre; düşük, orta, yüksek ve çok yüksek İnsani Gelişme Endeksli ülkeler şeklinde gruplandırılır. Orta İnsani Gelişme Endeksli ülkelerde kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve diğer İnsani Gelişme Endeks seviyelerindeki ülkelerde ikinci sıradadır (Society, 2018). Meme kanseri insidans oranları 2000'li yılların ortalarından bu yana yılda yaklaşık %0.5 artmıştır. Meme kanserinde 5 yıllık sağ kalım oranı 1975-1977 arasında %75 iken 2012-2018 yıllarına gelindiğinde bu oran %91'e çıkmıştır. Meme kanserine yakalanma veya meme kanserinden ölme riski genellikle yaşla birlikte artar (Society, 2018).



Şekil 2.3. 2022 yılında Türkiye'de Kadınlarda Görülen Yeni Kanser Vakaları (WHO, 2022).

Dünya sağlık örgütü 2022'de Türkiye'de 240 013 yeni kanser vakası ve 129 672 kansere bağlı ölüm olduğuna dair rapor yayınladı. 2022'de 107 537 kadına kanser vakası teşhisi konulmuştur. Bunların 25 249 (%23,5)'i meme kanseridir. Kansere bağlı ölümlerin 7 360 (%5,7)'i meme kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir (Şekil 2.3) (WHO, 2022).

Hastalığın erken aşamasında tespiti iyileşme yüzdesini önemli ölçüde artırır. Meme kanseri ilk dönemde belirtileri göstermeyerek hastalığın geç tespit edilmesine neden olur. Bunun önüne geçmek için kadınlara meme kanseri hakkında bilgilendirme, sağlık eğitimi ve belirti taşımasa bile sık muayene ve taramaların yapılması önerilmektedir. Yaş, cinsiyet, genetik yatkınlık ve bazı zararlı etkenlere maruz kalma gibi risk faktörlerini taşıyan grupların takip ve taramalarının aksatılmaması önemlidir.

Kadın olmak, yaşlanma, beyaz etnik grup, pozitif aile öyküsü, daha önce meme kanseri öyküsü, kusurlu genin varlığı, adet döneminin erken yaşta başlaması ve geç menopoza, diyabet meme kanserinin bilinen önemli risk faktörleridir. Bunun yanında kontrol edilebilen bazı risk faktörleri de vardır. Bunlar; doğum kontrol hapları, alkol ve sigara tüketimi, iyonlaştırıcı radyasyon, obezite, 30 yaş öncesinde çocuk sahibi olmamak ve uyku bozukluğudur (Madigan ve ark., 1995; Milosevic ve ark., 2018).

Meme kanseri normal meme epitel hücrelerinin olağan dışı artışı ve bunun sonucu doku düzeninin bozulmasıyla gelişir (Rivenbark ve ark., 2013). Meme kanseri; östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ile insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) gibi reseptörlerin ekspresyonuyla çeşitli morfolojileri ve alt tipleri olan heterojen bir hastalıktır (Nakada ve ark., 2017). Reseptörlerin durumuna göre lüminal A, lüminal B, HER2 pozitif ve üçlü negatif alt tipler olarak sınıflandırılabilir (Dai ve ark., 2017).

2.2.1.1. Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC)

Meme kanserinin agresif bir alt tipi olan ER, PR ve HER2 ekspresyonlarının olmaması ile tanımlanan Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC); meme kanseri hastaların yaklaşık %15 ila %20'sini oluşturur (Masuda ve ark., 2013). Buna rağmen meme kanseri ölümlerinin büyük bir kısmından sorumludur. TNBC erken nüks ile ilişkilendirilir. Hastalarda kanser 4 yıl içinde yüksek oranda nükseder, aynı zamanda 5 yıllık sağ kalım da düşüktür (Bauer ve ark., 2007; Dent ve ark., 2007).

TNBC'lerde sıklıkla erken ve uzak metastaz görülmesi ve hastalığın seyrinin daha kötü olması diğer alt tiplere oranla biyolojik olarak daha agresif olduğunu gösterir (Haffty ve ark., 2006).

ER, PR ve HER2 reseptörlerinin eksikliği nedeniyle TNBC, Tamoksifen ve aromataz inhibitörleri gibi hormonal bazlı tedavilerden ve Trastazumab gibi HER2'ye yönelik tedavilerden fayda görmez (Carey ve ark., 2007). Cerrahi tedavi ve kemoterapi TNBC tedavisinde mevcut seçenekler arasında en uygunları gibi görünmektedir (Wahba ve El-Hadaad, 2015). TNBC kemoterapiye duyarlı olsa da duyarlılığı, tümör heterojenliğinin yüksek olması sebebiyle, kemoterapi ilacının türüne ve TNBC'nin alt tipine göre değişiklik gösterir (Isakoff, 2010).

TNBC diğer alt tiplere oranla başlangıçta antrasiklin bazlı kemoterapiye daha yüksek duyarlılık göstermesine rağmen kemoterapiden sonra nüksetme oranı yüksektir. Bu nükseden tümörlerde tipik olarak kemoterapiye direnç vardır ve daha kötü sağkalımla ilişkilidir (André ve Zielinski, 2012; Carey ve ark., 2007).

TNBC'de kemoterapi direncine, tedavinin ardından tümörün yeniden büyümesine, kendini ve popülasyonu yenileme yeteneğine sahip tümörün alt popülasyonu kanser kök hücrelerinin (KKH) neden olduğuna dair kanıtlar vardır (Lee ve ark., 2011). KKH'nin tüm meme kanseri alt tiplerinde olsa da TNBC'de oranın daha yüksek olduğu bilinmektedir (Park ve ark., 2010).

2.2.1.1.1. MDA-MB-231

MDA-MB-231 M. D. Anderson Hastanesi ve Tümör Enstitüsü'ndeki hastalardan izole edilmiş epitelyal insan meme kanserinin en sık kullanılan TNBC hücre dizisidir (Cailleau ve ark., 1978; Chavez ve ark., 2010).

ER, PR ve HER2 negatif olmasından ötürü hücre dizisi başlangıçta bazal meme kanseri hücre dizisi olarak düşünülse de claudin-3 ve claudin-4'ün aşağı regülasyonunu, Ki-67 düşük ifadesini, epitelyal-mezenkimal geçişle ilişkili işaretleyicilerin zenginleşmesini ve

CD44+ /CD24- gibi meme kanseri kök hücreleri ile ilişkili özelliklerin ekspresyonunu sergilediği için Claudin düzeyi düşük moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilmektedir (Holliday ve Speirs, 2011).

Claudin düzeyi düşük tümör alt tipleri diğer alt tiplerle karşılaştırıldığında en yüksek damar yapısına sahip olduğundan metastaz yapmaya yatkındır. Bu kanser hücreleri endotelial özelliklere sahiptir. Bu yüzden beyin ve akciğer gibi hayati organlara yayılma ihtimali yüksektir. (Harrell ve ark., 2014).

2.2.2. Kemoterapi

Kanserin tedavi yöntemleri çoğunlukla radyasyon, cerrahi, kemoterapi, immünoterapi ve hormonal tedaviden oluşur (Baskar ve ark., 2012).

Lokalize tümörde hastaların bir kısmı cerrahi veya radyoterapi ile tedavi edilmektedir. Ancak geri kalan vakalarda erken metastaz karakteristik bir özelliktir ve etkili kanser tedavisi için kemoterapi gereklidir. Lokal olarak ilerlemiş hastalarda kemoterapi sıklıkla radyoterapi ile birleştirilir ve bu tür kombine yöntemlerle klinik sonuçların iyileşmesi sağlanır (Chu ve Sartorelli, 2018).

Kemoterapi; ilerlemiş veya daha etkili tedavinin bulunmadığı kanserler için birincil tedavi, cerrahi veya radyasyon tedavisinin yetersiz kaldığında yardımcı tedavi olarak kullanılmaktadır. İlerlemiş metastatik hastaların tedavisinde ana yaklaşım olmuştur ancak ileri evre tümörlerde kemoterapi tüm hastalarının yüzde 10'undan azını tedavi edebilmektedir (Chu ve Sartorelli, 2018).

Kemoterapi, hızlı büyüyen kanserli hücrelerin bölünmesinin engellenmesine dayanmaktadır bu yüzden saç kökleri, kemik iliği ve mide-bağırsak sistemi hücreleri gibi hızlı çoğalan normal hücreleri de etkilemektedir. Kemoterapinin normal hücreleri gelişigüzel yok etmesi, kemoterapötik ilaçların toksisitesi ve çoklu ilaç direncinin gelişmesi kemoterapinin istenmeyen yan etkileridir (Pérez-Herrero ve Fernández-Medarde, 2015).

Toksisiteden kaçınmak için doz azaltımı uygulansa da bu durum genellikle tedaviyi olumsuz etkiler. Doz yoğunluğu kemoterapinin etkisini sınırlayan ana faktörlerden biridir. Dozdaki azalma genellikle tümörü tedavi etme kapasitesinde bir kayıpla sonuçlanır ve tümör hücreleri tamamen ortadan kaldırılamayabilir, bu da nüksetmeye yol açabilir. İlerlemiş yumurtalık, meme, akciğer ve kolon kanserleri gibi birçok katı tümörde doz yoğunluğu ile klinik etkinlik arasında pozitif bir ilişki belgelenmiştir (Chu ve Sartorelli, 2018).

2.2.2.1. Doksorubisin

DNA replikasyonunda, transkripsiyonunda ve diğer hücrel işlemlerde çift sarmalın açılmasıyla süpersarmal (süperkoiller) olarak adlandırılan düğümler oluşabilir. Topoizomerazlar geçici tek ya da çift sarmal kırığı oluşturarak süpersarmalı düzenler. Topoizomerazların çalışmaması durumunda süpersarmal düğümleri çözülemez. Buna bağlı olarak DNA iplikleri birbirinden ayrılamaz, bu da hücre için ölümcül sonuçlar doğurabilir (Wang, 2002).

Farklı kanser türlerinde yaygın olarak kullanılan DOX; DNA baz çiftleri arasına girip, topoizomeraz I ve II'yi inhibe ederek çift zincir kırığı, histonları çıkararak ise kromatin hasarı oluşturur ve hücreyi apoptoza götürür (Moiseeva, 2019; Pang ve ark., 2013). Hücre içine pasif difüzyon ile girerek stoplazmada serbest radikal oluşumuna neden olan reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir oksidatif strese de neden olabilir (Franco ve ark., 2018).

DOX diğer ismiyle andriamisin; *Streptomyces peucetius*'tan elde edilmiştir ve antrasiklin antibiyotiklerinin zayıf kimyasal baz özelliği taşıyan, suda çözünebilen bir türevidir (PubChem, 2022; Moiseeva, 2019). DOX; erken ve geç evre meme kanserinin, yumurtalık kanserinin tedavisinde sık kullanılan, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı anti-neoplastik ajandır (Franco ve ark., 2018; PubChem, 2022). Yüksek dozda katı ve sıvı tümörlerde büyük etki göstermesine rağmen yan etkilerden korunmak için sınırlı dozda, genellikle hastanın vücut yüzey alanına göre ayarlanmış dozda verilir (Franco ve ark., 2018; McKenna ve ark., 2017; Pang ve ark.,2013; Weiss, 1992).

Akut olarak bulantı, kusma ve miyelosüpresyon görülürken; kalp, karaciğer, beyin veya böbrekte kronik toksisite geliştirebilir. Yüksek doz kullanımını büyük oranda DOX un en belirgin yan etkisi olan geri dönüşümsüz kardiyotoksisite sınırlar (Lefrak ve ark., 1973; Wang ve ark., 2012). Yan etkiler ve ilaç direnci DOX kullanımında en büyük sınırlamalardır (Hortobágyi, 1997).

Kanser hücresinde DOX direncine; ilaç dışı atım sistemleri ve DOX un zincir kırığı oluşturma yeteneğindeki, topoizomeraz II aktivasyonundaki ve apoptoz sinyallemedeki değişiklikler neden olur. Bu değişikliklerin çoğu, kök hücre benzeri bir fenotipe sahip tümör hücrelerinde belirgindir (Cox ve Weinman, 2016; Lage ve ark., 2000).

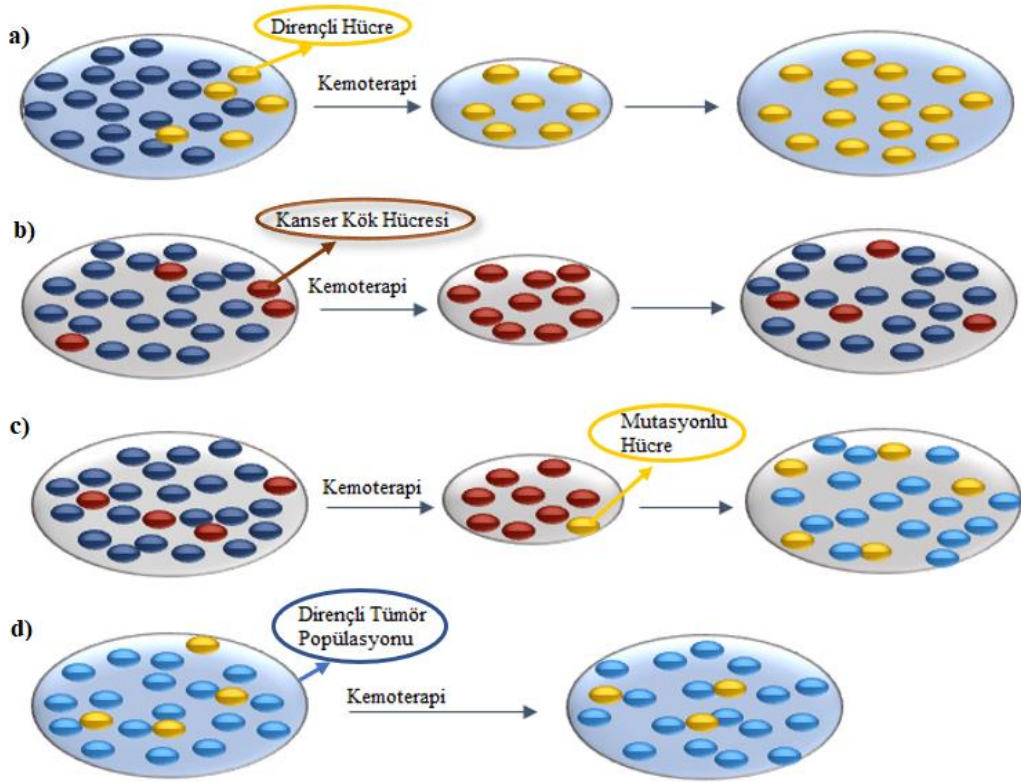
DOX buzdolabında ve ışıktan uzak bir yerde saklanmalıdır. Dokulara hızlı dağılım gösterir ve 48 saate kadar eliminasyon yarı ömrüne sahiptir (Johnson-Arbor K ve Dubey, 2017).

2.2.2.2. İlaç Direnci

Kanserde kemoterapinin başarısız olmasındaki temel sebep ilaç direncidir (Chu ve Sartorelli, 2018).

Kemoterapi direncine; kanserin tümör mikro ortamı, ilaç metabolizmasını değiştirmesi, ilaçların emilimini azaltması, kemoterapötik ajanların hedeflerini değiştirmesi, DNA onarımını geliştirmesi, ilaçların hücre dışına salınımını arttırması, antikanser ilaçlarını inaktive etmesi, hücre ölümünü baskılaması, ayrıca KKH'lerin varlığı, epigenetik değişiklikler, mikroRNA'lar, pH ve diğer tümör hücreleriyle etkileşimler gibi çeşitli içsel ve dışsal faktörler neden olabilir (Mansoori ve ark.,2017).

Geleneksel kemoterapiler başlangıçta tümör büyümesinin kontrol edilmesinde etkilidir ancak birçok hastada zaman içinde nüks eder. Tipik olarak kemoterapiye ilk yanıtta sonra tekrarlayan tümörler birden fazla ilaca dirençlidir. Tümör ilaç direncini açıklayan 4 ilaç direnci modeli tanımlanmıştır (Dean ve ark., 2005).



Şekil 2.4. Tümör ilaç direnci modelleri (Dean ve ark.,2005).

a) Geleneksel ilaç direnci modeline göre; genetik değişiklikler sebebiyle çoklu ilaç direncine sahip az sayıdaki hücre kemoterapi sırasında canlı kalır ve kemoterapinin kesilmesinden sonra çoğalarak ilaca dirençli yeni popülasyonu oluşturur (Şekil 2.4) (Dean ve ark., 2005).

b) KKH modeline göre; tümörler ilaca dirençli küçük bir tümör kök hücresi popülasyonu ve farklılaşmış normal tümör hücrelerini içerir. Kemoterapiyle normal tümör hücreleri ölür, ilaca dirençli kök hücreler canlı kalır. Tedavinin kesilmesinden sonra bu hücreler başlangıçtaki gibi heterojen bir tümör popülasyonu oluşturur (Şekil 2.4) (Dean ve ark., 2005).

c) Edinilmiş direnç kök hücre modeline göre; tümör kök hücreleri tedavide canlı kalırken, farklılaşmış hücreler ölür. Canlı kalan tümör kök hücrelerinde bulunan mutasyonlar ilaca dirençli bir fenotip kazandırır (Şekil 2.4) (Dean ve ark., 2005).

d) İçsel direnç modeline göre; hem kök hücreler hem de farklılaşmış hücreler doğası gereği ilaca dirençlidir. Bu nedenle tedavi sırasında az bir kısmı etkilenir veya hiç etkilenmez, böylece tümör büyümesine neden olur (Şekil 2.4) (Dean ve ark., 2005).

2.2.3. Kanser Kök Hücresi

Kanser Kök Hücreleri (KKH); kendilerini ve buldukları tümör popülasyonunu oluşturma kapasitesine sahip tümör alt popülasyonudur ve kendilerine özgü yüzey belirteçlerini ifade eder (Xu ve ark., 2009). Tedavi kesildikten bir süre sonra tedavi ile tamamen temizlenememiş uykudaki KKH tümörü tamamen yeniler ve bu durum kanserin hastalarda neden tekrar nüksettiğini açıklar (Al-Hajj ve Clarke, 2004).

KKH'nin kökenini açıklarken iki olasılık üzerinde durulur. Birincisi, somatik kök veya progenitör hücrelerden genetik değişikliklerle kanserleşerek ortaya çıkmasıdır. Diğeri, mutasyon yoluyla kanserleşen hücrenin farklılaşarak kök hücre özellikleri kazanmasıdır (Lawson ve ark., 2009).

KKH'lerinin, normal kök hücreler gibi apoptoza ve kemoterapiye dirençli olduğu görülmüştür. KKH'nin direncinin birçok sebebi olabilir. Örneğin; kök hücreler kendilerini yenileme ve farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra hareketsizdirler ve nadiren bölünürler. KKH genellikle G_0 'dadır dolayısıyla hücre döngüsünü hedefleyen kemoterapi ajanlarına dirençlidir. KKH'lerinin göreceli hareketsizlikleri ve yüksek düzeyde spesifik ilaç taşıyıcılarını eksprese etmeleri kemoterapiye doğal olarak dirençli olduklarını kanıtlar niteliktedir. Gelişmiş DNA onarım mekanizmaları nedeniyle de DNA'ya zarar veren ajanlara karşı dirençli olabilirler. Kök hücreler antiapoptotik proteinler de sentezlemektedir. Ayrıca tümöre özgü antijenleri ifade etmeyen KKH'ler antijen hedefleyen tedavilerden de korunabilir (Dean ve ark., 2005; Shervington ve Lu, 2008; Wicha ve ark., 2006).

KKH tek bir hücreden tümörü yeniden büyütebilen bir hücredir dolayısıyla eğer tümör kontrol altına alınmak isteniyorsa temelde bu hücrelerin kontrol altına alınması gerekmektedir (Wicha ve ark., 2006).

Meme kanseri kök hücre kavramı yakın zamanda oluşturulmuştur. KKH'ler genetik istikrarsızlıklarını yansıtan kromozom anormallikleri ile karakterize edilirler. Bu genetik dengesizlik aynı zamanda kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olmalarına katkı sağlar. Yapılan çalışmalarda; meme kanseri kök hücrelerinin metastaz yapma yeteneklerinin, radyasyona ve kemoterapiye karşı dirençlerinin normal kanser hücrelerine oranla daha fazla olduğu görülmüştür (Chu ve Sartorelli, 2018; Ma ve ark., 2014; Tang ve ark., 2007).

Meme kanserinin tümörü tekrar oluşturabilen bu alt popülasyonunun, kök hücre belirteci olan CD44 eksprese ettiği görülmüştür (Ponti ve ark., 2005). Ekspresyon oranının TNBC'de diğer meme kanseri alt tiplerine göre daha yüksek oranda olduğu rapor edilmiştir (Idowu ve ark., 2012).

Nanog, Oct4 ve Sox2 gibi pluripotensi ilişkili transkripsiyon faktörleri tümör agresifliği, ilaç direnci ve kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. TNBC'ler bu bulgularla tutarlı şekilde pluripotensi ilişkili transkripsiyon faktörlerini diğer alt tiplere oranla daha fazla eksprese eder (Fultang ve ark., 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Temini ve Kültürü

Bu tez çalışmasında; MDA-MB-231 hücre kültürü hattı American Type Culture Collection (ATCC)'den ticari olarak satın alınmıştır.

MDA-MB-231 hücre kültürü için %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin (PS) içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) High besiyeri kullanıldı (Seabra ve ark., 2023).

Azot tankında muhafaza edilen hücreler Dimetil Sülfoksit (DMSO) etkisinden korunmak için Bazal DMEM içerisinde 1:10 oranında çözdürüldü. 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından 10 mL Dulbecco'nun fosfat tamponlu çözeltisi (DPBS) ile bir kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra hücreler; %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 PS içeren 20 mL High DMEM besiyerinde çözülüp 175 cm²'lik kültür kaplarına ekildi. %5'lik CO₂ ve 37⁰ C'lik inkübatöre konuldu. Hücreler her gün ışık mikroskopunda kontrol edildi.

Pasaj için Tripsin- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) hazırlandı. 175 cm²'lik kültür kabındaki hücelere kültür kabının yüzeyini kaplayacak kadar (18 mL) Tripsin-EDTA eklendi. 1.5 dakika inkübatörde bekletildi. Mikroskopta kontrol edildi. Hücrelerin tamamen kalkması için kültür kabına yavaşça vurularak tekrar mikroskopta bakıldı. Daha sonra tripsin aktivitesini durdurmak için tripsin-EDTA miktarının 10 da 1'i kadar (1.8 mL) FBS konuldu. Ardından hücreler 50 mL'lik falkona aktarıldı. Kültür kabı DPBS ile yıkanıp aynı falkona aktarıldı. 350 x g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernetant atıldı. Pellet 10 mL DPBS ile çözülüp sayımı yapıldı. Sayılan 10⁷ hücrenin 54.000'i 6 kuyucuklu plakaya ekmek için 2 mL'si ayrı bir falkona alındı. 350 x g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. 12 mL DMEM (High) besiyerinde çözülerek 6 kuyucuk

plakaya her bölmeye 2 mL (her bölmeye 90.000 hücre) konuldu. Mikroskopta bakılıp inkübatöre kaldırıldı. Kalan hücreler azot tankına konulmak üzere hazırlandı. Dondurma mediumu %70 FBS, %10 DMSO, %20 DMEM oranında hazırlandı. Hücreler 4.5 mL dondurma mediumu içerisinde çözülerek etiketlenen 3 adet cryo tüpüne 1.5 mL'şer olacak şekilde aktarıldı. Bir gece -80°C 'ye daha sonra azot tankına kaldırıldı.

3.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC) Tayini

Barkotlanan 6 kuyucuklu plakaya ekim yapıldı. GFP (Green Fluorescent Protein) transfeksiyonunda kullandığımız plazmit, higromisin direnç geni taşıdığından MDA-MB-231 hücrelerine higromisin için MIC tayini yapıldı.

Konsantrasyonlarında higromisin içeren besiyeri elde etmek için stok Higromisin B 50 mg/mL stoğundan 2 mL DMEM (High) besiyerine konulması gereken higromisin miktarı hesaplandı.

1. Kuyucuk 10 μg / mL için: 0.4 μL
2. Kuyucuk 25 μg / mL için: 1 μL
3. Kuyucuk 50 μg / mL için: 2 μL
4. Kuyucuk 100 μg / mL için: 4 μL
5. Kuyucuk 200 μg / mL için: 8 μL
6. Kuyucuk 300 μg / mL için: 12 μL

6 kuyucuklu plakadaki eski besiyeri atıldı. DPBS ile yıkandı. Her kuyucuya 2 mL besiyeri ve ardından hesaplanan miktarlarda higromisin konuldu. Mikroskopta kontrol edildikten sonra inkübatöre konuldu. 15 gün boyunca bu işlem 2 günde 1 yapıldı. 15. günün sonunda MIC değeri canlılığın gözlemlenmediği en düşük konsantrasyon 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlendi (Gul Amuk ve ark., 2020).

3.3. Hücrelere Green Fluorescent Protein (GFP) Transfeksiyonu

175 cm^2 'lik kültür kabında yeterli yoğunluğa ulaşan MDA-MB-231 hücrelerine pCMV-GFP plazmid transfeksiyonu elektroporasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi.

Bunun için 175 cm²'lik kültür kabındaki eski besiyeri atıldı ve DPBS ile yıkandı. Tripsinle hücreler falkona toplandı. Santrifüj ardından DPBS ile çözümlenerek hücreler sayıldı. 15 x 10⁶ hücreye tekrar santrifüj yapılır.

MDA-MB-231 hücrelerinin Green Fluorescent Protein (GFP) ile transfeksiyonu Neon transfeksiyon kiti ve neon transfeksiyon sistemi kullanılarak firmanın talimatlarına göre yapıldı. Santrifüj sonrası hücre pelleti 600 µL (Resuspension Buffer) R Buffer ile çözüldü üzerine 7 µL GFP plazmid eklendi. Pipetajlanan karışım Neon tip (100 µL'lik) içerisine çekilip 4 mL (Electrolytic Buffer) E Buffer koyulan tüp içerisinde transfeksiyon standına yerleştirilip 1400 V 10 ms 4 pulse ve 1350 V 20 ms 2 pulse parametreleri kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirilir. 2 mL'şer besiyeri ile konulan 6 kuyucuklu plakaya ekildi. 24 saat sonra mic değeri 100 µg/mL olarak belirlenen higromisinden 100 µg/mL (2 mL'şer besiyeri için 4 µL'şer) uygulamaya başlandı. Bu işlem 15 gün boyunca besiyeri idamesi ile gerçekleştirildi. Her gün mikroskopta takip edildi. 15 günün sonunda GFP (+) hücreler elde edildi.

3.4. İmmünoflorasan Boyama ve Konfokal Mikroskopta Görüntüleme

Hiçbir uygulamanın yapılmadığı Wild Tipe (WT) MDA-MB-231 hücreleri ve transfeksiyon ile GFP (+) olan MDA-MB-231 hücreleri konfokal mikroskop için hazırlanmıştır. (Bu işlemlerde sterilizasyon önemli olmadığı için kabinde yapılmadı.) Bunun için; 1 gün önce içerisine disk konmuş 6 kuyucuklu plakaya ekimi yapılan hücrelerin eski besiyeri atıldı. 1 mL DPBS ile 3 kez yıkandı. Fiksasyon için %4'lük paraformaldehitten 1 mL konularak 15 dakika bekletildi. Daha sonra 3 kez DPBS ile yıkandı. 20 mL DPBS ve 1 mL DAPI konularak hazırlanan DAPI çözeltisinden 1 mL konuldu. Karanlıkta 5 dakika bekletildi. (DAPI'nin hazırlanması ve uygulanması sırasında görüntü alınana kadar tüm aşamalarda karanlık olmalıdır.) 5 dakikanın sonunda 3 kez DPBS ile yıkandı. Son yıkamada DPBS çekilmeden disk alındı ve yapıştırma solüsyonu konulan lam üzerine hücreler iç yüzeyde olacak şekilde konuldu. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra +4⁰ C buzdolabına kaldırıldı. 2 günün ardından mikroskopta görüntülendi (Acar ve ark., 2021).

3.5. Manyetik Aktif Hücre Sıralaması (MACS) Kullanılarak Pluripotent Hücrelerin Seçimi ve Pozitif Hücrelerin Negatif Grup ile Karıştırılması

SSEA-3 ve SSEA-4 belirteçleri ile GFP (+) MDA-MB-231 hücre hattında pluripotent pozitif hücre seçimi ve GFP (-) MDA-MB-231 hücre hattında pluripotent negatif hücre seçimi MS kolon kullanılarak manyetik aktif hücre sıralaması (MACS) metodu ile yapıldı.

GFP (+) ve GFP (-) Hücre kültürlerinin ikisi de tripsin ile kaldırıldı. DPBS ile yıkadıktan sonra strainerdan geçirildi. Sayımı yapıldı. 2×10^6 hücre olacak şekilde falkona aktarıldı. 350 x g'de 5 dakika santrifüjlenip süpernetantları atıldı. 20 mL MACS solüsyonuna 1 mL BSA konularak MACS Buffer hazırlandı. Santrifüjden alınan hücrelerin süpernetantı atıldı. Pellet 160 µL MACS Buffer ile çözülüp üzerine 20 µL anti-SSEA-3 ekleyip 15 dakika +4'de inkübe edildi. Ardından 20 µL anti-PE ve 20 µL anti-SSEA-4 mikrobeadleri eklendi. 15 dakika inkübasyon için +4^o C buzdolabına konuldu. İnkübasyondan sonra süspansiyon 2 mL'ye tamamlanarak 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti 500 µL MACS Bufferda çözüldü. Manyetik alanına yerleştirilen MS kolon 1 kez 500 µL MACS Buffer ile yıkandı. Hücre solüsyonu kolondan geçirildi. Ardından 3 kez 500 µL MACS Buffer ile yıkandı.

Geçiş yapıp toplanan grup negatif gruptur. GFP (-) grubun kolondan geçerek toplanan SSEA-3 ve SSEA-4 negatif hücreler sayıldı. Kolon atıldı. GFP (+) grubun kolondan geçen hücreler atıldı. Kolondaki SSEA-3 ve SSEA-4 pozitif hücreleri toplamak için kolon manyetik alandan çıkarılıp temiz bir falkonun üzerine konuldu. 2 mL MACS Buffer konularak piston yardımı ile basınç uygulayarak falkona aktarıldı. Elde edilen hücreler sayıldı. Toplam hücrenin %98'i GFP (-)'den elde edilen pluripotent belirteci yönünden negatif hücreler, %2'si GFP (+) pluripotent belirteçleri yönünden pozitif hücreler olacak şekilde karıştırıldı. 20 mL besiyerinde çözerek 175 cm²'lik ekildi. Bu deney grubu MACS sonrası grup olarak adlandırıldı (Alessio ve ark., 2018).

3.6. Hücre Gruplarına Doksorubisin Uygulanması

Deneyin başlangıcında, iki ayrı 175 cm²'lik kültür kabına WT MDA-MB-231 ve MACS sonrası oluşturulan MDA-MB-231 (%98'i GFP (-) pluripotent belirteci yönünden negatif hücreler, %2'si GFP (+) pluripotent belirteçleri yönünden pozitif hücreler) hücreleri ekildi. Başlangıçta 25 nM DOX ile kültürlendi. 28 gün boyunca hücrelere uygulanan DOX miktarı kontrollü şekilde artırıldı. Hücreler DOXun etkisindeyken büyümeye devam edebildikleri gözlemlendiğinde DOX'un yoğunluğu önce 50nM'a daha sonra 75 nM'a çıkarıldı. Başlangıçta 1 hafta boyunca 25 nM DOX uygulandı. Daha sonra DOX yoğunluğu 50 nM'a yükseltildi. Hücrelerin bölünmeye devam ettiği gözlemlenmeye başladığında doz 75 nM'a çıkartıldı. Bu da yaklaşık olarak 2 hafta sürdü. Kalan 1 hafta da DOX yoğunluğu 75 nM olarak uygulandı. İlaç iki günde bir eski besiyeri atılıp kültür kabı DPBS ile yıkandıktan sonra yeni besiyeriyle beraber uygulandı (Marinello ve ark., 2019).

3.7. DOX Sonrası İmmünoflorasan Boyama ve Konfokal Mikroskopta Görüntüleme

Kontrol grup olarak MACS sonrası grup (%98'i GFP (-) pluripotent belirteci yönünden negatif hücreler, %2'si GFP (+) pluripotent belirteçleri yönünden pozitif hücreler), deney grubu olarak 28 gün boyunca ilaç uyguladığımız MACS sonrası grup kullanılmıştı. Her iki grubun 1 gün önceden içerisine disk konmuş 6 kuyucuklu plakaya ekimi yapıldı. Ertesi gün boyama için; hücrelerin eski besiyeri atıldı. 1 mL DPBS ile 3 kez yıkandı. Fiksasyon için %4'lük paraformaldehitten 1 mL konularak 15 dakika bekletildi. Daha sonra 3 kez DPBS ile yıkandı. 20 mL DPBS ve 1 mL DAPI konularak hazırlanan DAPI'den 1 mL konuldu. Karanlıkta 5 dakika bekletildi. (DAPI'nin hazırlanması ve uygulanması sırasında görüntü alınana kadar tüm aşamalarda karanlık olmalıdır.) 5 dakikanın sonunda 3 kez DPBS ile yıkandı. Son yıkamada DPBS çekilmeden disk alındı ve yapıştırma solüsyonu konulan lam üzerine hücreler iç yüzeyde olacak şekilde konuldu. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra +4⁰ C buzdolabına kaldırıldı. 2 günün ardından konfokal mikroskopta görüntülendi (Acar ve ark., 2021).

3.8. DOX Sonrası Hücrelerin Akış Sitometri Analizi

Cell wash Solüsyonu: %0.5 Bovin Serum Albümin (BSA) ve 2 mM EDTA Phosphatasebuffered Saline (PBS) olacak şekilde hazırlanır.

DOX uygulanmış MDA-MB-231 WT grubun SSEA-3-PE, SSEA-4-FITC ve TRA-1-60-PE pluripotent belirteçlerinin oranı ve DOX uygulanmış MACS sonrası grubun GFP (+) oranı akış sitometrisi yardımı ile analiz edildi ve ilaç uygulanmamış MDA-MB-231 kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

28 gün DOX uygulanmış WT grup, 28 gün DOX uygulanmış MACS sonrası grup tripsin kullanarak kültür kaplarından kaldırılıp akış sitometri için hazırlandı. Ayrıca hücrelerin kendi floresan özellikleri olduğundan eşik değeri belirlemek için bir tüpe de işaretlenmemiş WT grup hücreler kör olarak kullanılmak üzere konulur. DPBS ile çözülüp sayım yapıldı. Sayım sonrası her gruptan yaklaşık 2-3 milyon olacak şekilde alındı ve santrifüj yapıldı. 100 µL DPBS ile çözülerek 1.5 mL'lik ependorf tüplere alındı. 350 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernetant atıldı. Hücreler barkotlanan ependorflara her ependorfa 50 µL'şer cell wash olacak şekilde cell wash ile çözülerek bölündü.

Kontrol grup 200 µL cell wash da çözülerek SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, Autoflo olmak üzere barkotlanan yeni ependorflara 50 µL'şer aktarıldı. DOX uygulanmış WT hücreler 150 µL cell wash da çözülerek SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 olmak üzere barkotlanan yeni ependorflara 50 µL'şer aktarıldı. MACS sonrası DOX uygulanan grup ise 100 µL cell wash da çözülerek GFP (+) ve autoflo olmak üzere barkotlanan ependorflara 50 µL'şer aktarıldı. TRA-1-60-PE, Anti-SSEA-4-FITC, PE- anti-SSEA-3 belirteçleri ependorflardaki barkota göre 50 µL'şer eklendi. 20 dakika inkübasyonun ardından 1 kez yıkama yapıldı. Hücrelere 500 µL cell wash eklendi ve akış sitometri tüpüne aktarıldı ardından FACS Aria III cihazında analizler yapıldı.

3.9. Biyoistatistik Analizler

Biyoistatistik analizler GraphPad Prism programı kullanılarak gerçekleştirildi. Analizler sırasında Paired t test metodu kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. [0.01 $\leq p < 0.05$ (*): istatistiksel olarak anlamlı. 0.001 $\leq p < 0.01$ (**): Yüksek seviye istatistiksel anlamlılık. $p < 0.001$ (***) : Çok yüksek seviye istatistiksel anlamlılık. 0.05 $\leq p < 0.10$ (*): Sınırdan anlamlılık. $p > 0.10$: istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.]

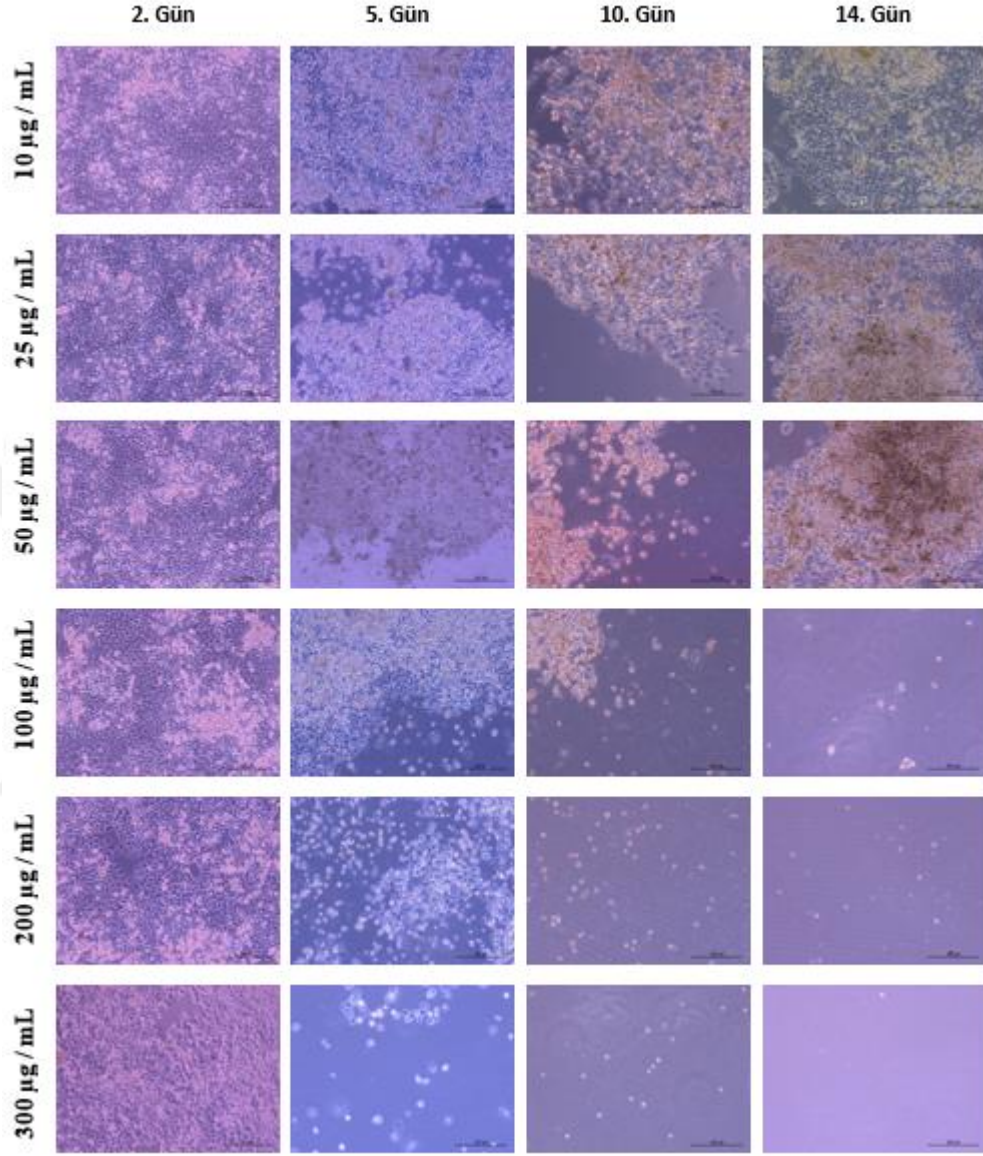


4.BULGULAR

4. 1. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIC) Tayini Bulguları

GFP transfeksiyonunda kullandığımız plazmitin, higromisin direnç geni taşıdığı bilindiğinden transfeksiyon sonrası transfekte olmamış hücreleri ortadan kaldırmak için Higromisin B seçici baskısı uygulandı. Bu sebeple 6 kuyucuklu plakaya ekimi yapılan MDA-MB-231 hücrelerine farklı miktarlarda higromisin uygulayarak kültür 15 gün boyunca mikroskop altında takip edildi. 15. günde canlılığın gözlemlenmediği en düşük dozun tespitiyle higromisin MIC tayini yapıldı.

15 gün boyunca tüm kuyulardaki popülasyonlarda hem uygulanan gün süresi hem de higromisin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak azalma gözlemlenmiştir. 10 µg / mL, 25 µg / mL ve 50 µg / mL higromisin uygulanan kuyucuklardaki hücre miktarlarında azalma olsa da 15. günün sonunda tamamen canlılık ortadan kalkmamıştır. Kolonilerin varlığı görülmektedir. 100 µg / mL, 200 µg / mL, 300 µg / mL higromisin uygulanan kuyucuklarda hücre miktarlarında günden güne azalma olmasıyla beraber 300 µg / mL'de 5. günden itibaren, 200 µg / mL'de 10. günden itibaren, 100 µg / mL'de 14. günden itibaren canlılık gözlemlenmemiştir. Canlılığın gözlemlenmediği en düşük konsantrasyon 100 µg/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



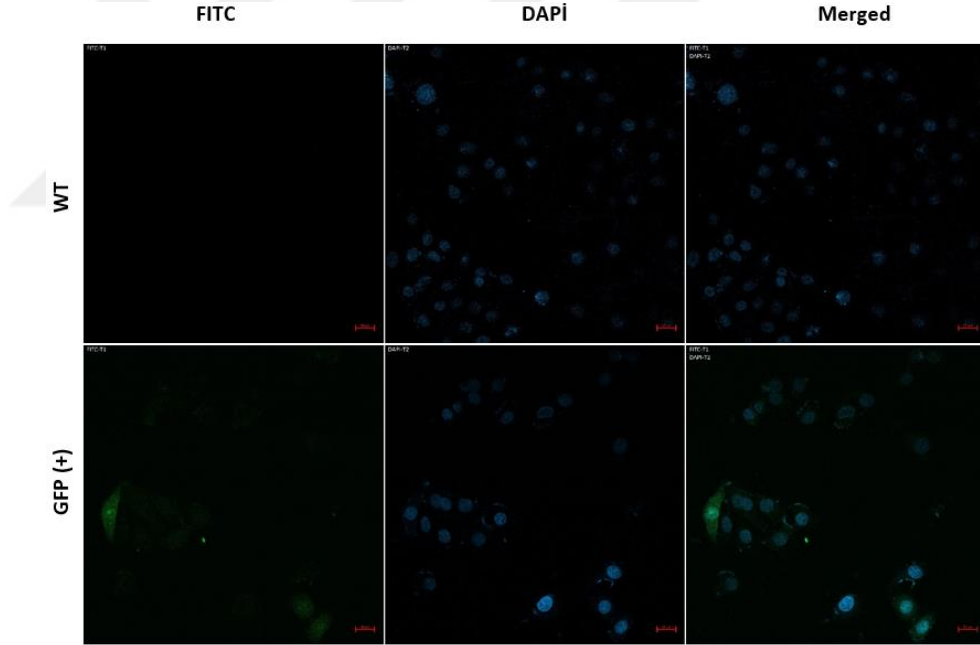
Şekil 4.1. Higromisin B için MIC Tayini. Farklı yoğunlukta higromisin uygulanan MDA-MB-231 hücre kültürlerinin 15 gün boyunca mikroskopta takibi (Büyütme: 100 X).

4.2. Hücelere GFP Transfeksiyonu Sonrası Konfokal Mikroskop Bulguları

MDA-MB-231 hücrelerine GFP plazmiti transfeksiyonu elektroporasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Higromisin direnç geni taşıyan GFP plazmitinin transfekte olmadığı hücreleri popülasyondan elimine edebilmek için 15 gün boyunca MIC tayini ile belirlenen miktarda (100 µg/mL) higromisin uygulanmıştır. 15 gün higromisin

uygulamasının ardından hücrelerin GFP plazmid transfeksiyonun, ayrıca boyama sonrası popülasyondaki GFP ışım oranının ve ışım yoğunluğunun kontrolü için hücreler DAPI ile boyanarak konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Ayrıca hücrelerin kendi florasan özelliklerin sonucu etkilememesi için işaretlenmemiş MDA-MB-231 WT hücreler kör olarak kullanılmak üzere boyanarak konfokalde görüntülenmiştir.

MDA-MB-231 WT hücrelerin otoflorasanına göre ayarlanan konfokal mikroskobunda MDA-MB-231 GFP (+) hücrelerin görüntüleri alınmıştır. Tüm DAPI ile boyalı çekirdeklerin çevresinde GFP'nin yeşil ışımı görülmüştür. Ancak homojen bir ışım gözlenmemiş, hücrelerin bir kısmında parlak ışım varken bir kısmı düşük ışım gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hücelere GFP transfeksiyonu sonrası transfekte hücreler ve WT hücrelerin konfokal mikroskop görüntülerinin karşılaştırması (Büyütme: 20 X).

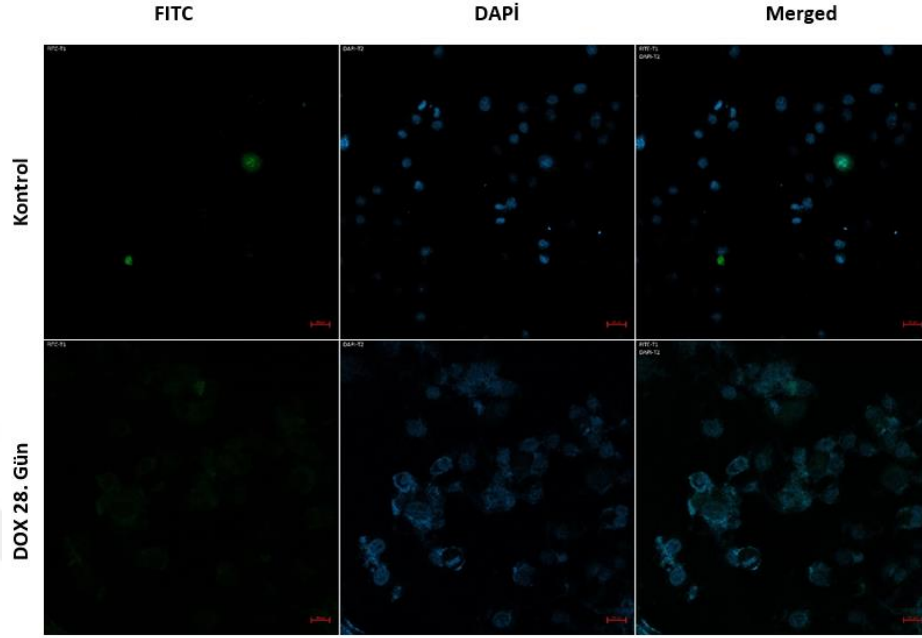
4.3. DOX Sonrası İmmünoflorasan Boyama ve Konfokal Mikroskop Bulguları

MDA-MB-231 kanser popülasyonu DOX'la muamele edildiğinde, ilaç etkisindeyken çoğalmaya devam eden alt grubun olduğu düşünülmektedir. Bu alt grubun pluripotent veya DOX etkisinde pluripotent hücrelerden farklılaşan hücreler olup olmadığını anlayabilmek için; 28 gün boyunca DOX uygulanan MACS sonrası grubun ve kontrol olarak DOX uygulanmamış MACS sonrası grubun DAPI ile boyandıktan sonra konfokalde görüntüleri alınmıştır. Hücelere transfekte edilen GFP gözlemlenmiştir. Görüntülerde hücrenin otoflorasan özelliklerinin yanıltıcı olmaması için de WT hücreler kör olarak kullanılmıştır.

Görüntüler incelendiğinde DOX uygulamasından sonra; GFP (+) hücre miktarının yüksek oranda arttığı, GFP'nin ışımaya yoğunluğunun azaldığı, GFP ve DAPI'nin görüntüsünün daha dağınık hale geldiği görülmüştür (Şekil 4.3).

Hücreler sayılıp oranlandığında başlangıçta %4.6, 28 gün DOX uygulamasının ardından %79.2 oranında GFP (+) hücre olduğu görülmüştür (Tablo 4.1).

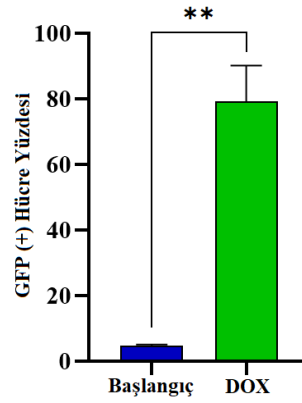
Sonuçlar istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir. [$0.01 \leq p < 0.05$ (*): istatistiksel olarak anlamlı. $0.001 \leq p < 0.01$ (**): Yüksek seviye istatistiksel anlamlılık. $p < 0.001$ (***) : Çok yüksek seviye istatistiksel anlamlılık. $0.05 \leq p < 0.10$ (*): Sınırdan anlamlılık. $p > 0.10$: istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır.] (Şekil 4.4) (Şekil 4.7) (Şekil 4.9).



Şekil 4.3. MACS sonrası kontrol ve DOX 28. gün konfokal mikroskop görüntüleri (Büyütme: 20 X).

Tablo 4.1. MACS Sonrası Grup Konfokal GFP (+) Hücre Yüzdeleri Başlangıç ve DOX 28. Gün

Konfokal GFP (+) Hücre Yüzdeleri		
Gruplar	MACS Sonrası Grup Başlangıç	MACS Sonrası Grup DOX 28. Gün
%GFP (+)	%4.6	%79.2

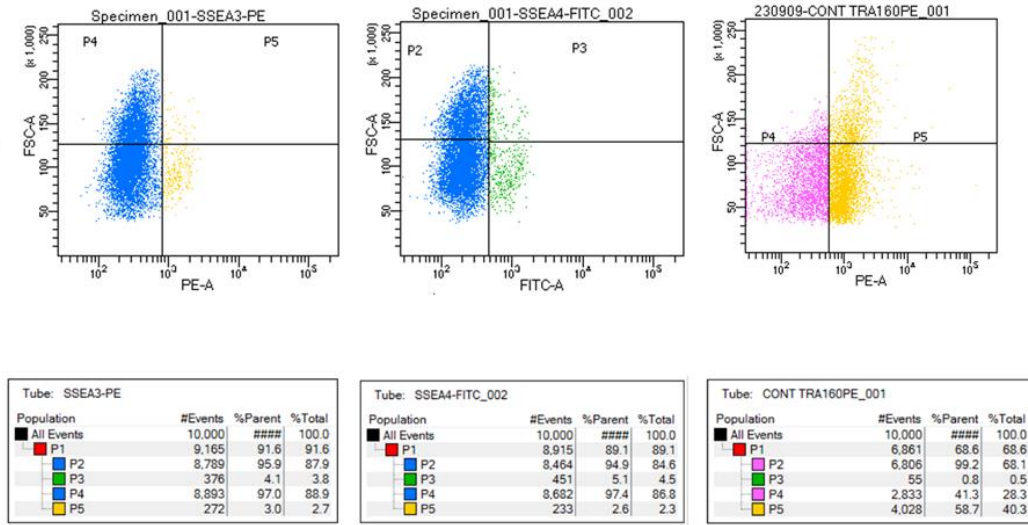


Şekil 4.4. Konfokal sonuçlarına göre MACS sonrası grup GFP (+) hücre yüzdesi başlangıç ve DOX 28. gün

4.4. DOX Sonrası Hücrelerin Akış Sitometrisi Bulguları

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, ilaç uygulamasıyla canlı kalan hücrelerde pluripotent belirteçlerinin oranının ilaç uygulanması öncesine göre değişimini gözlemlemek için WT hücelere uygulama öncesi ve 28 gün DOX uygulanması sonrasında akış sitometri analizleri yapıldı. Hücre gruplarında pluripotent hücrelerin oranını analiz etmek için SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 belirteçlerini kullandık. Kontrol gruba ve DOX uygulanmış gruba analizler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

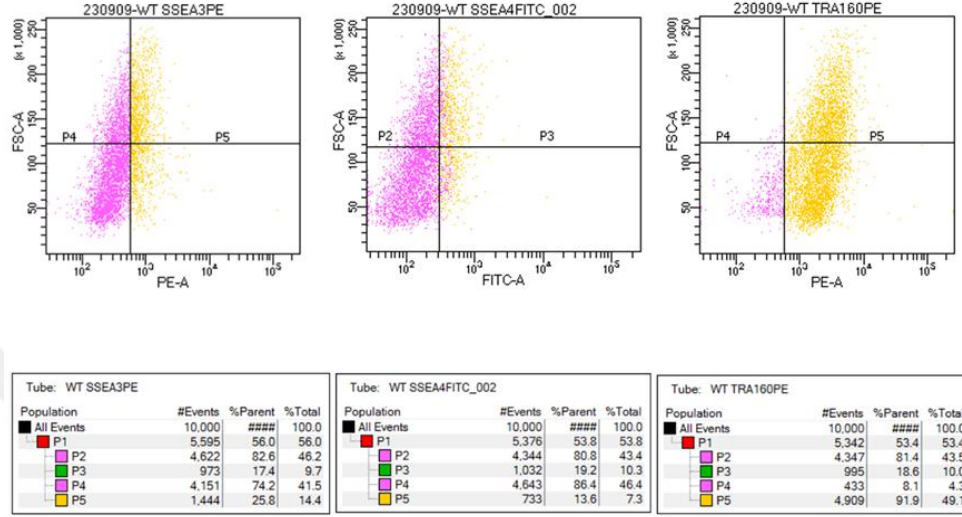
Kontrol grup olarak DOX uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerinin akış sitometri analiz bulgularına göre; MDA-MB-231 hücre popülasyonunda başlangıçta %3 SSEA-3, %2.6 SSEA-4, %58.7 TRA-1-60 pozitif hücre bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.5).



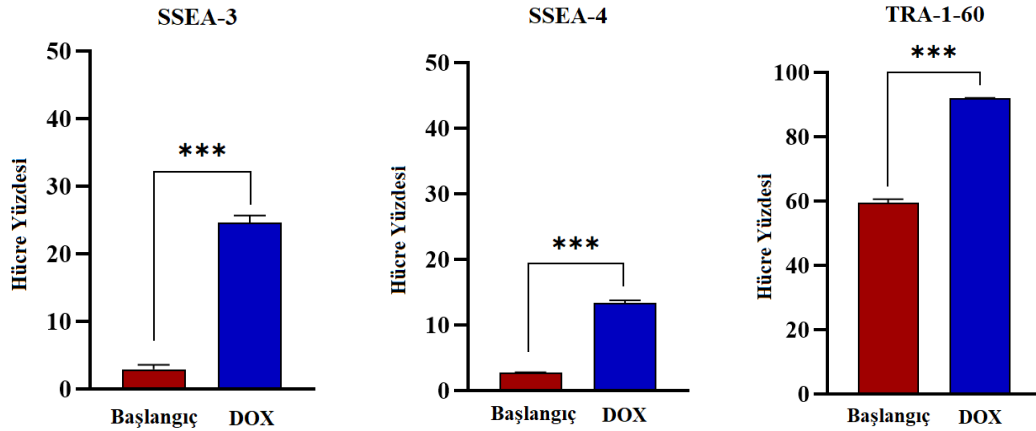
Şekil 4.5. MDA-MB-231 hücre popülasyonunda başlangıçtaki pluripotent belirteçleri SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 pozitif hücre oranları.

MDA-MB-231 hücre popülasyonuna 28 gün DOX uygulandı. Başlangıçta 25 nM DOX ile kültürlendi. 28 gün boyunca hücelere uygulanan DOX miktarı kontrollü şekilde artırıldı. Hücreler DOX'un etkisindeyken büyümeye devam edebildikleri gözlemlendiğinde DOX'un yoğunluğu artırıldı. 28 gün içerisinde DOX yoğunluğu 75 nM'a kadar çıkarıldı. 28. günün sonunda SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 belirteçlerini kullanarak analiz yapıldı. Analiz sonuçlarına göre; %25.8 SSEA-3, %13.6 SSEA-4,

%91.9 TRA-1-60 pozitif hücre bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.6). Sonuçlar istatistiksel analizlerle değerlendirildi.



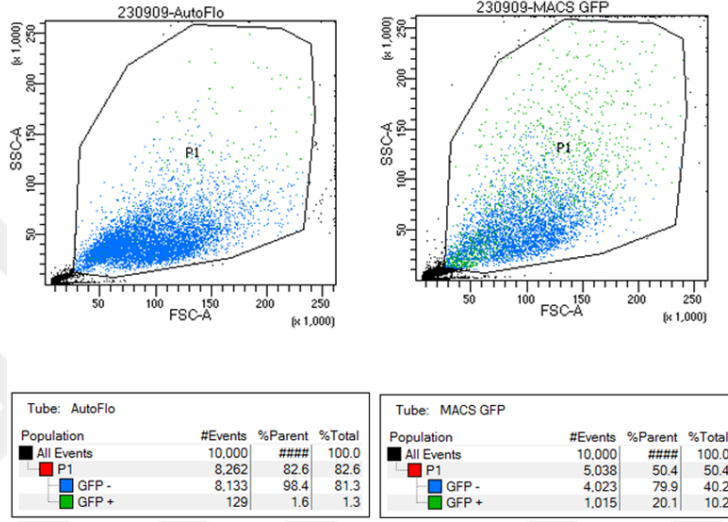
Şekil 4.6. 28 gün DOX uygulanmış MDA-MB-231 hücre popülasyonunda pluripotent belirteçleri SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 pozitif hücre oranları.



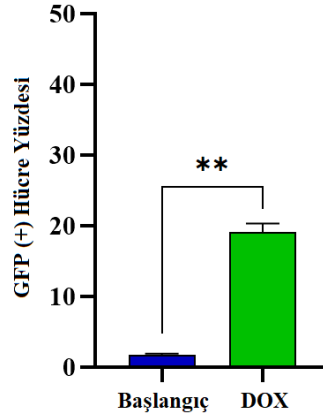
Şekil 4.7. Akış sitometri sonuçlarına göre WT grup pluripotent hücre yüzdesi başlangıç ve DOX 28. gün.

28 gün boyunca DOX uygulanan MACS sonrası grubun kofokalde görüntüleri alınıp hücrelere transfekte edilen GFP gözlemlenmişti. Aynı hücre grubunun ek olarak akış sitometri cihazında analizleri 3 tekrarlı yapılarak GFP oranları belirlendi. Hücrenin otoflorasan özelliklerinin yanıltıcı olmaması için de WT hücreler kör olarak kullanıldı.

Kör olarak kullanılan WT hücrede GFP ışması %1.6 iken, başlangıçta %2 pluripotent (+), GFP (+) olarak kültüre edilip 28 gün boyunca DOX uygulanan MACS sonrası grubun GFP ışmasının %20.1 olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). Sonuçlar istatistiksel analizlerle değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8. WT grup ve 28 gün DOX uygulanmış başlangıçta %2 GFP (+) olan MACS sonrası grup akış sitometri analizleri ve GFP oranları.

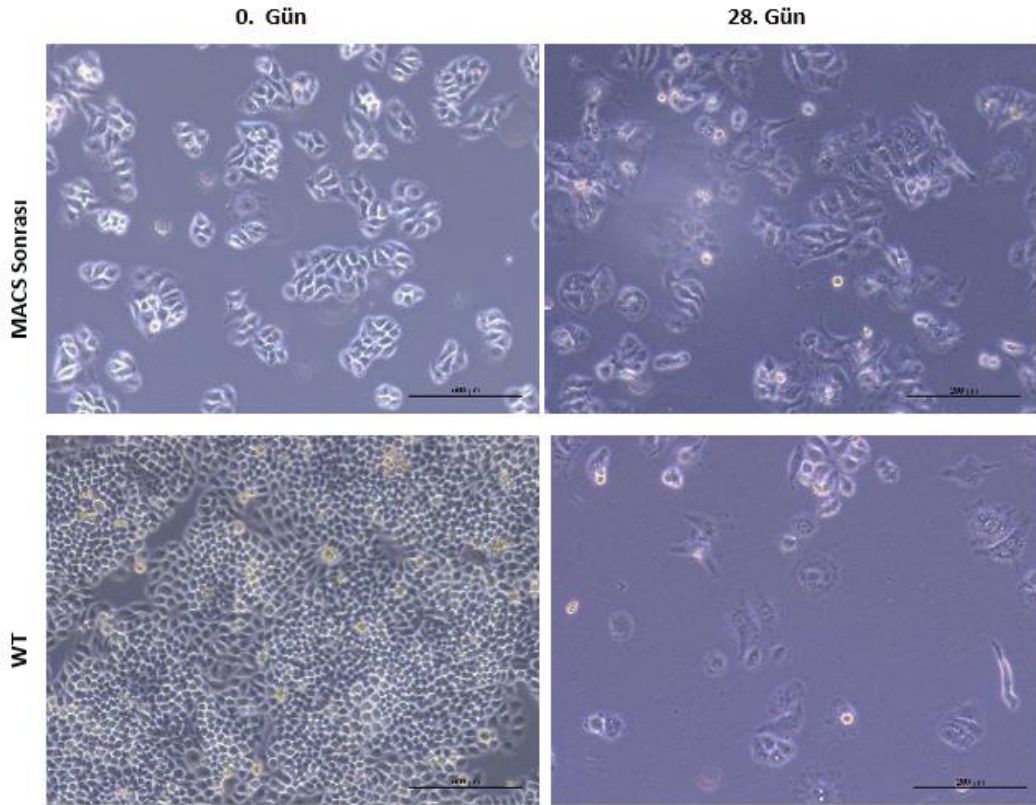


Şekil 4.9. Akış sitometri sonuçlarına göre MACS sonrası grup GFP (+) hücre yüzdesi başlangıç ve DOX 28. gün.

4.5. Dokсорubisin Uygulamasından Sonra Mikroskop Görüntüleri

MDA-MB-231 MACS sonrası grup başlangıç ve 28 gün boyunca DOX uygulandıktan sonraki, WT grubun başlangıç ve 28 gün boyunca DOX uygulandıktan sonraki ışık mikroskobu görüntüleri alınmıştır.

MDA-MB-231 WT ve MACS sonrası grubun başlangıçtaki ışık mikroskobu görüntüleriyle 28 gün boyunca DOX uygulandıktan sonraki ışık mikroskobu görüntüleri karşılaştırılmıştır. DOX'un etkisiyle çekirdek sayısında artma, dallanma gibi morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. MACS sonrası grup başlangıç ve 28 gün DOX uygulandıktan sonraki, WT grup başlangıç ve 28 gün DOX uygulandıktan sonraki ışık mikroskobu görüntüleri

5.TARTIŞMA

Meme kanseri, değişken patolojik özellikler ve terapötik yanıtlar ile karakterize edilen heterojen bir hastalıktır (Rivenbark ve ark.,2013). Meme kanserinin çeşitli alt tiplerinden biri olan TNBC hormon bağımsız olduğundan hormonal veya HER2 hedefli tedaviler kullanılamaz. TNBC'nin birincil tedavisi kemoterapidir. Bu tümörler genel olarak antrasiklin tedavisine daha iyi yanıt verir buna rağmen çok agresiftir ve tekrarlama riski yüksektir. Ayrıca hayatta kalma oranları da düşüktür. Erken nüks ve metastaz yaygın görülür (Irvin ve ark., 2008).

Tümör heterojenliğine katkıda bulunan kanser hücrelerinin tümörojenik alt popülasyonu, kendini ve tümörü yenileme kapasitesine sahiptir. Kemoterapi direncinin ve nüksün sebebi olarak düşünülen, tüm popülasyonda düşük oranda bulunan bu alt grup, kanser kök hücresi (KKH) olarak adlandırılır (Park ve ark., 2019). KKH'leri kemoterapiye dirençliyen, kök içermeyen farklılaşmış tümör hücrelerinin çoğunu kemoterapi öldürülebilir, KKH'ler kemoterapiden sonra popülasyonu ve kendini yenileyebilir (Al-Hajj ve ark., 2004).

Farklı tümör tipleri için farklı yüzey belirteç ekspresyonuna dayalı olarak KKH'lerin izolasyonu rapor edilmiştir. Fizyolojik dokular hiyerarşik olarak farklı kendini yenileme ve çoğalma kapasitelerine sahip hücrelerden oluşur. Nispeten düşük oranda bulunan, farklılaşmamış dokuya özgü kök hücreler bu hücrel hiyerarşilerin tepe noktalarında bulunur. Uzun süreli kendini yenileme kapasitesi ve Farklılaşma yoluyla belirli dokularda uzmanlaşmış hücre nesillerine yol açma potansiyeli ile tanımlanır. Bazı kötü huylu tümörler değişen kendini yenileme, farklılaşma kapasitelerine ve tümörojenik potansiyellere sahip heterojen hücre popülasyonlarından oluşabilir (Frank ve ark., 2010).

Bu gözlemler birlikte ele alındığında; kemoterapi tedavisinden sonra canlı kalan tümör hücreleri hastalığın nüksetmesinden sorumlu hücreler olmalıdır ve bu hücreler kanser kök hücresi olmasının yanında, agresif tümörler için farklılaşma, strese ve kemoterapiye dayanıklılık, onarım kapasitesi gibi özellikleriyle hiyerarşik olarak tepede bulunan kök hücreler olması ihtimal dahilindedir. Bu tanıma uyan hücreler pluripotent hücreler olabilir.

KKH tespitinde kullanılan, Sox2, CD44 gibi belirteçler agresif meme kanseri TNBC de yüksek oranda görülmüştür. Çalışmalarda KKH'lerinin tedaviye direncini, metastazı ve nüksü teşvik ederek tümör agresifliğine sebep olabileceği tartışılmıştır (Park ve ark., 2019).

Kanserde bununla beraber meme kanserinde pluripotensi belirteci çalışmaları oldukça azdır. Bunun sebebi birçok KKH karakterizasyon çalışmasında KKH'lerin multipotent olduğunun gösterilmesinin farklı karakterizasyon çalışmalarını ötelemesi veya pluripotent karakterli yetişkin hücrelerin yakın tarihli keşfi olabilir (Grimshaw ve ark., 2008; Jiang ve ark., 2002; Woodward ve ark., 2008). Bu durum KKH'de pluripotensi çalışmalarını başlangıçta üreme sistemi kanserlerinde yoğunlaştırmıştır (Donovan ve ark., 2001).

Meme kanserinde diğer alt tiplere oranla agresif alt tiplerin, agresifliğinin altında yatan temel sebeplerin KKH'lerin ifade ettikleri kök hücre belirteçleri veya onların popülasyondaki oranlarıyla bağlantılı olup olmadığı halihazırda devam eden bir tartışmadır (Schmit ve ark., 2012; Tsang ve ark., 2012).

KKH direncinin sebebi olarak KKH'lerin nadiren bölünmesi, ilaç taşıyıcılarını eksprese etmesi ve DNA onarım mekanizmalarının gelişmiş olması görülmüştür (Dean ve ark., 2005; Wicha ve ark., 2006).

Bu bilgiler ışığında yaptığımız tez çalışmasında; TNBC hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerinin biyolojik durumları hem normal koşullarda hem de kemoterapi ilacı DOX uygulamasının ardından incelenmiştir. Hücrelere 28 gün boyunca DOX uygulaması

sonrasında canlı kalan hücreler pluripotensi belirteçleri SSEA-3, SSEA-4 ve TRA-1-60 pozitiflik yönünden oranı akış sitometrisi ve konfokal mikroskop kullanarak incelenmiştir.

Bizim çalışmamıza benzer bir çalışma 2015 yılında Aloia ve arkadaşları tarafından meme ve yumurtalık insan tümörlerinin farelere enjekteleriyle oluşturulan hasta farelerle yapılmıştır. Aloia ve arkadaşları bu farelere kemoterapi uygulamasının ardından pluripotensi belirteç analizleri yapmış, SSEA-4'ün tümör agresifliği arttıkça arttığı vurgulamıştır. Tedavinin kesilmesinden sonra pluripotensi belirteç oranlarının eski dengesine döndüğü ve TRA-1-60'ın takibinin yapılamadığı söylenmiştir (Aloia ve ark., 2015).

Benzer çalışmalar ağız ve akciğer kanserinde de yapılmıştır. SSEA-4 hastalığın agresif seyri, ilaç direnci, tümör oluşumu, nüks ve ölüm riski ile ilişkilendirilmiştir (Noto ve ark., 2013; Gottschling ve ark., 2013). Pluripotent kök hücrelerin DNA'ya zarar veren ajanlara yanıt olarak somatik hücrelerden daha verimli DNA onarımı sergilediğini gösteren çalışmalar da vardır (Maynard ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasında SSEA-4 çalışmalarını destekleyici deneysel çalışmaları yapmanın yanı sıra SSEA-3 ve TRA-1-60 pluripotent belirteçlerini de inceledik. Ayrıca GFP plazmid kullanarak pluripotent hücreleri işaretledik ve ilaç uygulaması sırasında pluripotensi belirteci taşıyan hücrelerinin asimetric bölünme sonucu pluripotent karakterlerini kaybetme ve farklılaşma olasılıklarını da dikkate alarak dirençli hücre oluşturma yeteneklerini belirlemeye çalıştık.

Başlangıçta kontrol grup olarak DOX uygulanmamış MDA-MB-231 hücrelerini akış sitometrisinde analiz ettik. Analiz sonuçlarına göre; %3 SSEA-3, %2.6 SSEA-4, %58.7 TRA-1-60 oranında pozitif hücre bulunduğu tespit ettik. 28 gün DOX uygulamasının ardından akış sitometri analizleri tekrar yapıldı. Analiz sonuçları incelendiğinde; %25.8 SSEA-3, %13.6 SSEA-4, %91.9 TRA-1-60 pozitif hücre bulunduğu görüldü.

Akış sitometri sonuçlarımız değerlendirildiğinde; DOX uygulamasından sonra hücrelerin pluripotensi yüzdesinin istatistiksel olarak yüksek anlamlılık düzeyinde arttığı görülmüştür. Literatür incelendiğinde sonuçlarımızın daha önceki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (Aloia ve ark., 2015; Gottschling ve ark., 2013; Noto ve ark., 2013).

Bizim bulgularımızda pluripotent karakterli hücrelerin ilaca daha dirençli olduğu, onların canlı kalarak diğer kanser hücrelerinin öldüğü yorumu yapılabilir. Diğer bir seçenek ise ilaç uygulaması sırasında kanser popülasyonunun bir savunma stratejisi olarak pluripotent hücre sayısını arttırdığı düşünülebilir.

İkinci deney grubumuzda; pluripotent hücrelerin GFP ile işaretlendiği MACS sonrası gruba 28 gün boyunca DOX uygulandıktan sonra GFP oranı akış sitometrisinde analiz edildi. Başlangıçta %2 GFP (+) olan popülasyonun 28 gün DOX uygulandıktan sonra %20.1 GFP (+) olduğu görülmüştür.

Akış sitometri GFP sonuçları değerlendirildiğinde; DOX uygulandıktan sonra GFP oranının %2'den %20.1'e çıktığı görüldü. GFP ile işaretlenen hücrelerin SSEA-3 ve SSEA-4 olduğu göz önünde bulundurulduğunda akış sitometri GFP sonuçlarının başlangıçta %3 olan SSEA-3'ün %25.8'e ve %2.6 olan SSEA-4'ün %13.6'e yükselmesiyle paralellik gösterir. Bu da GFP (+) pluripotent hücrelerin kemoterapi sırasında genel itibariyle GFP (+) pluripotent hücreler oluşturduğunu göstermektedir. Yani kemoterapi sırasında kanser popülasyonu daha dirençli olan kök hücrelerin sayısını arttırmaktadır. Oranların bu kadar yakın olduğu hesaba katıldığında DOX sonrasında GFP (+) çoğu hücrenin pluripotent olduğu düşünülür. Bu da kemoterapi boyunca kök hücrelerin farklılaşmayı çok sınırlı oranda yaptığını gösterebilir.

İstatistiksel olarak yüksek anlamlılıkta olan GFP oranının akış sitometrisinde ölçülenden daha fazla olabileceği yapılan konfokal mikroskop görüntülemelerinde belirlenmiştir. Akış sitometrisinde konfokal sonuçlarına oranla GFP oranının az çıkmasının temel nedeni GFP ışımalarının akış sitometrisi lazer gücü için düşük kalmasıdır. Konfokal görüntülerinde soluk olan GFP ışımaları bunu destekler niteliktedir.

Konfokal mikroskop görüntüleri incelendiğinde; başlangıçta %5 olan GFP (+) hücre oranının 28 gün DOX uygulamasından sonra %79'a çıktığı, GFP'nin ışıma yoğunluğunun azalması ve soluk ışıma yaptığı, GFP ve DAPI'nin görüntüsünün daha dağınık hale geldiği görülmüştür.

Soluk ışımaların sebebi olarak; GFP ekspresyonunu sürekli olarak indükleyen bir ajan kullanmadığımız için GFP plazmitin zamanla ışıma kaybı yaşaması, gerekli proteinlere ihtiyaç durumunda sentezlenmesi veya popülasyonda genel olarak belli bir hücre grubunun yüksek düzey diğerlerinin düşük düzeyde sentezlenmesi düşünülebilir.

GFP ve DAPI'nin görüntüsünün daha dağınık hale gelmesinin sebebi olarak DOX'un DNA'da çift zincir kırığı, kromatin hasarı, oksidatif stres oluşturması sonucunda hücrede morfolojik değişiklikler yapmasıyla ilişkilendirilebilir. Işık mikroskobu görüntüleri dağınık Konfokal görüntüsünü destekler niteliktedir.

Konfokal mikroskop bulgularına göre; başlangıçta %5 olan GFP (+) hücrelerin pluripotent pozitif olduğu bilindiğinden 28 günün sonunda GFP (+) tüm hücrelerin popülasyondaki pluripotent hücrelerin bölünmesi veya farklılaşmasıyla oluştuğu söylenebilir. Akış sitometri sonuçlarında başlangıçta %3 olan SSEA-3'ün %25.8'e ve %2.6 olan SSEA-4'ün %13.6'e yükseldiği görülmüştür. Buna göre son durumda %79 olan GFP (+) hücrelerin bir kısmının SSEA-3 ve SSEA-4 pluripotent belirteçleri yönünden negatif olduğu ve popülasyonun büyük bir kısmını başlangıçta %5 olan GFP (+) hücrelerin oluşturduğu anlaşılmaktadır.

Bulgular değerlendirildiğinde; 28 gün DOX uygulamasının sonunda canlı kalan hücreler çoğunlukla pluripotent hücreler ve onların ilaç uygulanması sonrasında ürettiği hücrelerdir. Pluripotent hücrelerin normal durumda nadiren bölündüğü ve popülasyondaki oranlarını dengede tuttuğu bilinirken, kemoterapi sırasında popülasyondaki oranını büyük bir oranda arttırdığı görülmüştür. İlaç uygulaması sonrası normal hücreler ölürken pluripotent hücreler popülasyondaki oranlarını artıracak şekilde bölünmeye devam etmesi pluripotent karakterli hücrelerin ilaca daha dirençli olduğunu, onların canlı kalarak diğer kanser hücrelerinin öldüğünü gösterebilir. Ayrıca ilaç

uygulamasý sırasında normal hücrelerin pluripotent hücelere oranla daha hızlı senesense ve apoptoza uğrayıp, pluripotent hücrelerin ise daha geç uğradığı o sırada da farklılaşarak popülasyonda baskın hale gelme olasılığı da değerlendirilebilir.

Pluripotent olmayan GFP (-) hücreler ve ilaç uygulaması sırasında farklılaşma ile oluşan pluripotent olmayan GFP (+) hücreler kıyaslandığında ise; ilaç sonrası pluripotent hücrelerin ürettiği hücreler, başlangıçta %95'iken son durumda %21'e kadar düşen GFP (-) hücelere göre daha dirençli olabilir.

Işık mikroskobu görüntüleri incelendiğinde; 28 gün DOX uygulaması sonunda her iki grupta da bölünme hızında yavaşlama ve morfolojik olarak değişiklikler gözlenmiştir. Bu duruma DOX'un DNA'da çift zincir kırığı ve kromatin hasarı oluşturması, sitoplazmada ROS üreterek oksidatif stres oluşturduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Özetle analizlerimiz sonucunda, bu alandaki mevcut verilerle uyumlu olarak agresif meme kanseri TNBC'de KKH sebepli kemoterapi direncini ve dirençli hücrelerin pluripotent özellikte olduğunu destekleyen veriler sunmaktayız. Ek olarak pluripotent hücrelerin dirençli hücreler üretebileceği potansiyelini pluripotensi belirteçlerinin varlığına dayanarak işaret etmekteyiz.

Kanser tedavisinde KKH'lerinin hedeflenmesi, kanserin tekrarını önlemek ve uzun vadeli sağ kalımı iyileştirmek için spesifik bir yaklaşım sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamız kısa takip süresi ve *in vitro* testlerle sınırlı olduğundan daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Daha ileri çalışmalar, bu hücrelerin biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına yol açacak, kanser tedavisi ve önlenmesi açısından önemli sonuçlar doğuracaktır.

İleri araştırmalar için, kanser hedefe yönelik tedavisinde benzer özellikler gösteren KKH'leri normal kök hücrelerden ayırmak farklı stratejiler için önemli görünmektedir. Bu alandaki araştırmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Tümör oluşumunun altında yatan mekanizmaları ortaya çıkarmak ve kanser hastaları için kişiselleştirilmiş tedaviler tasarlamak için de fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Acar MB, Aprile D, Ayaz-Guner S, Guner H, Tez C, Di Bernardo G, Peluso G, Ozcan S, Galderisi U. Why do muse stem cells present an enduring stress capacity? Hints from a comparative proteome analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22:4: 2064-2066.
- Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 2004: 23:43; 7274-7282.
- Alessio, N., Squillaro, T., Özcan, S., Di Bernardo, G., Venditti, M., Melone, M., Peluso G, Galderisi, U. Stress and stem cells: adult Muse cells tolerate extensive genotoxic stimuli better than mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*. 2018: 9:27: 19328-19331.
- Aloia A, Petrova E, Tomiuk S, Bissels U, Déas O, Saini M, Zickgraf FM, Wagner S, Spaich S, Sütterlin M, Schneeweiss A, Reitberger M, Rüberg S, Gerstmayer B, Agorku D, Knöbel S, Terranegra A, Falleni M, Soldati L, Sprick MR, Trumpp A, Judde J-G, Bosio A, Cairo S, Hardt, O. The sialyl-glycolipid stage-specific embryonic antigen 4 marks a subpopulation of chemotherapy-resistant breast cancer cells with mesenchymal features. *Breast Cancer Res*, 2015; 17:1: 1-17.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*, 2023; 73.1: 17-48.
- André F, Zielinski CC. Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Ann Oncol*, 2012; 23: vi46-vi51.
- Augello A, Kurth TB, de Bari C. Mesenchymal stem cells: A perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *Eur Cell Mate*, 2010; 20.121: e33.

- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 2012; 9.3: 193-197.
- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer*, 2007; 109.9: 1721-1728.
- Cailleau R, Olivé M, Cruciger QVJ. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro*, 1978; 14.11: 911-915
- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*, 2007; 13.8: 2329-2334.
- Chavez KJ, Garimella SV., Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis*, 2010; 32.1-2: 35.
- Chu, E., & Sartorelli, AC. *Cancer chemotherapy. Lange's Basic and Clinical Pharmacology*, 2018: 948-976.
- Cox J, Weinman S. Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncol*, 2016; 3.1: 57-59.
- Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping, *Journal of Cancer*, 2017; 8.16: 3131-3135.
- Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*, 2005; 5.4: 275-284.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 2007; 13.15: 4429-4434.
- Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 2001; 414.6859: 92-97.

- Foster CS, Dodson A, Karavana V, Smith PH, Ke Y. An introduction to stem cells. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2002; 197.4: 419-423.
- Franco YL, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer, *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 2018; 131-141.
- Frank NY, Schatton, T, & Frank M H. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *The Journal of clinical investigation*. 2010; 120:1: 41-50.
- Fultang N, Chakraborty M, Peethambaran B. Regulation of cancer stem cells in triple negative breast cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2021; 4.2: 321-325.
- Globocan. International Agency for Research on Cancer in Turkey. *Global Cancer Obs*, 2018; 703.
- Goodwin J, Laslett AL, Rugg-Gunn PJ. The application of cell surface markers to demarcate distinct human pluripotent states. *Experimental Cell Research*, 2020; 387.1: 111749.
- Gottschling S, Jensen K, Warth A, Herth FJ, Thomas M, Schnabel PA, Herpel E. Stage-specific embryonic antigen-4 is expressed in basaloid lung cancer and associated with poor prognosis. *European Respiratory Journal*. 2013; 41:3: 656-663.
- Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Stanke L, Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Research*. 2008; 10: 1-10.
- Gul Amuk N, Kurt G, Karsli E, Ozcan S, Acar MB, Amuk M, Lekesizcan A, Gurgan, CA. Effects of mesenchymal stem cell transfer on orthodontically induced root resorption and orthodontic tooth movement during orthodontic arch expansion protocols: an experimental study in rats. *European journal of orthodontics*. 2020; 42:3: 305-316.

- Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 2006; 24.36: 5652-5657.
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000; 100.1: 57-70.
- Harrell JC, Pfefferle AD, Zalles N, Prat A, Fan C, Khramtsov A, Olopade OI, Troester MA, Dudley AC, Perou CM. Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis. *Clinical & experimental metastasis*, 2014; 31: 33-45
- Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*, 2011; 13: 1-7.
- Hortobágyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs*, 1997; 54: 1-7
- Idowu MO, Kmiecik M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, Manjili MH. CD44 +/CD24-/low cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Human pathology*, 2012; 43.3: 364-373.
- Ilic D, & Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *British medical bulletin*. 2011; 98:1: 117-126.
- Irvin Jr, William J, Carey LA. What is triple-negative breast cancer?. *European journal of cancer*. 2008; 44:18: 2799-2805.
- Isakoff SJ. Triple-negative breast cancer: Role of specific chemotherapy agents. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 2010; 16.1: 53-58.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Todd Lenvik, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, C. Low W, David A. Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418: 6893: 41-49.
- Johnson-Arbor K, Dubey R. Doxorubicin, 2017.
- Kleinsmith LJ, Pierce GB. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer research*, 1964; 24.9: 1544-1551.

- Kmiecik G, Niklińska W, Kuć P, Pancewicz-Wojtkiewicz J, Fil D, Karwowska A, Karczewski J, Mackiewicz Z. Fetal membranes as a source of stem cells. *Advances in medical sciences*. 2013; 58:2: 185-195.
- Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 2012, 85.1: 3-10.
- Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima YI, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010; 107.19: 8639-8643.
- Lage H, Helmbach H, Dietel M, Schadendorf D. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *British journal of cancer*, 2000; 82.2: 488-491.
- Lawson JC, Blatch GL, Edkins AL. Cancer stem cells in breast cancer and metastasis, *Breast cancer research and treatment*, 2009: 118: 241-254.
- Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, Chung IY, Kim IA, Kim EJ, Choi Y, Ryu HS, Park SY. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *British journal of cancer*, 2011: 104.11: 1730-1738.
- Lefrak EA, Pişha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, 1973;32.2: 302-314.
- Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. *Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications*, *Stem cell reviews and reports*, 2020, 16: 3-32.
- De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, Fujiwara Y, Benvenisty N, Deng H, Hochedlinger K, Jaenisch R, Lee S, Leitch HG, Lensch MW, Lujan E, Pei D, Rossant J, Wernig M, Park PJ, Daley GQ. Hallmarks of pluripotency, *Nature*, 2015; 525.7570: 469-478.

- Ma F, Li H, Wang H, Shi X, Fan Y, Ding X, Lin C, Zhan Q, Qian H, Xu B. Enriched CD44+/CD24- population drives the aggressive phenotypes presented in triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer letters*, 2014; 353.2: 153-159.
- Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1995; 87.22: 1681-1685.
- Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2017; 7.3: 339.
- Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12:3: 730-742
- Marinello P. C., Panis C, Silva T. N. X., Binato R, Abdelhay E, Rodrigues J. A., Mencialha A. L., Lopes N. M. D., Luiz R. C., Cecchini R, Cecchini, A. L. Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell adaptation genes. *Scientific reports*.2019; 9:1: 5864-5869.
- Martí M, Mulero L, Pardo C, Morera C, Carrió M, Laricchia-Robbio L, Esteban CR, Belmonte JCI. Characterization of pluripotent stem cells *Nature protocols*, 2013; 8.2: 223-253.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981; 78.12: 7634-7638.
- Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, Valero V, Lehmann BD, Pietenpol JA, Hortobagyi GN, Symmans WF, Ueno NT. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clinical cancer research*, 2013; 19.19: 5533-5540.
- Maynard S, Swistowska AM, Lee JW, Liu Y, Liu ST, Da Cruz AB, Rao M, de Souza-Pinto NC, Zeng X, Bohr VA. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem cells*. 2008; 26:9: 2266-2274.

- McKenna MT, Weis JA, Barnes SL, Tyson DR, Miga MI, Quaranta V, Yankeelov TE. A Predictive Mathematical Modeling Approach for the Study of Doxorubicin Treatment in Triple Negative Breast Cancer. *Scientific reports*, 2017; 7.1: 5725-5727.
- Milosevic M, Jankovic D, Milenkovic A, Stojanov D. Early diagnosis and detection of breast cancer. *Technology and Health Care*, 2018; 26.4: 729-759.
- Moiseeva, A. Anthracycline derivatives and their anticancer activity. *Apoptosis*. 2019;25- 26.
- Nakada H, Nakagomi H, Hirotsu Y, Amemiya K, Mochizuki H, Inoue M, Oyama T, Omata M. A study of tumor heterogeneity in a case with breast cancer. *Breast Cancer*, 2017; 24: 483-489.
- Noto Z, Yoshida T, Okabe M, Koike C, Fathy M, Tsuno H, Kei Tomihara K, Arai N, Noguchi M, Nikaido T. CD44 and SSEA-4 positive cells in an oral cancer cell line HSC-4 possess cancer stem-like cell characteristics. *Oral oncology*. 2013; 49:8: 787-795.
- Pang B, Qiao X, Janssen L, Velds A, Groothuis T, Kerkhoven R, Nieuwland M, Ovaa H, Rottenberg S, Van Tellingen O, Janssen J, Huijgens P, Zwart W, Neefjes J. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nature communications*, 2013: 4.1: 1908-1911.
- Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2010; 16.3: 876-887
- Park SY, Choi JH, Nam JS. Targeting cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Cancers*. 2019; 11:7: 965-968.
- Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 2015: 93: 52-79.

- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti M. A, Daidone, M. G. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer research*. 2005; 65:13: 5506-5511.
- PubChem. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 68617, Sertraline. Retrieved April 23, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sertraline>.
- Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M., & Coleman, W. B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *The American journal of pathology*. 2013;183:4: 1113-1124.
- Rocha, C. R. R., Lerner, L. K., Okamoto, O. K., Marchetto, M. C., & Menck, C. F. M. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2013; 752:1: 25-35.
- Rossant J. Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. *Stem cells*, 2001; 19.6: 477-482.
- Schmitt F, Ricardo S, Vieira AF, Dionísio MR, Paredes J. Cancer stem cell markers in breast neoplasias: their relevance and distribution in distinct molecular subtypes. *Virchows Archiv*. 2012; 460: 545-553.
- Seabra R, Malhão F, Correia A, Costa C, Kijjoa A, Rocha E. Effects and Mechanisms of Action of Preussin, a Marine Fungal Metabolite, against the Triple-Negative Breast Cancer Cell Line, MDA-MB-231, in 2D and 3D Cultures. *Marine Drugs*. 2023; 21:3:166-170.
- Shervington A, Lu C. Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells. *Cancer investigation*, 2008; 26.5: 535-542.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*, 2021; 71: 7-33.
- Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A. Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell*, 2009; 138.4: 722-737.
- Society AC. American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 4th Edition*, 2018; 68.6: 394-424.

- Stevens LC. Studies on transplantable testicular teratomas of strain 129 mice. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1958; 20.6: 1257-1275.
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome, *Nature*, 2009; 458.7239: 719-724.
- Tang C, Ang BT, Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti- cancer therapy. *The FASEB Journal*, 2007; 21.14: 3777-3785.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995; 92.17: 7844-7848.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015; 65.2: 87-108.
- Tsang JY, Huang YH, Luo MH, Ni YB, Chan SK, Lui PC, MCYu A, Tan PH, Tse GM. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012; 136: 407-417
- Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2005; 100.1: 12-27.
- Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer, *Cancer biology & medicine*, 2015; 12.2: 106-111.
- Wang EY, Biala AK, Gordon JW, Kirshenbaum LA. Autophagy in the heart: Too much of a good thing?, *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2012; 60.2: 110-117.
- Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective, *Nature reviews Molecular cell biology*, 2002; 3.6: 430-440.
- Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 2012; 10.4: 440-454.
- Weiss RB. The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? In: *Seminars in oncology*. 1992. p. 670-686.

WHO 2022. Absolute numbers, Incidence, Females, Türkiye. World Health Organization.

<https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&types=0&sexes=2&populations=792> . 2022.

Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: An old idea- A paradigm shift. *Cancer research*, 2006; 66.4: 1883-1890.

Woodward WA, Sulman EP. Cancer stem cells: markers or biomarkers?. *Cancer and metastasis reviews*. 2008; 27: 459-470.

Xu Q, Yuan X, Tunici P, Liu G, Fan X, Xu M, Hu J, Hwang JY, Farkas DL, Black KL, Yu JS. Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours. *British journal of cancer*, 2009; 101.2: 303-311.

EKLER

MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA İLAÇ DİRENCİ VE PLURİPOTENSİ İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 5	% 5	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	abis-files.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Sevinç, Sevgi Koçyiğit. "Kanser Hücre Hatlarında Etodolak ve Türevlerinin Siklooksijenaz (COX-2) Sentezi Üzerine Etkilerinin Araştırılması", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2022 Yayın	<% 1
5	dergi.fabad.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	dspace.kocaeli.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	Muratoğlu, Beril. "Dentin Remineralizasyonunda Riboflavin'in Etkisinin	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı: Başak Bilge SÜER

Uyruğu: TC

EĞİTİM

Yüksek Lisans: Erciyes Üniversitesi Kök Hücre Bilimleri Kayseri

Lisans: İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik İstanbul/2017

BİLDİRİLER

B. B. Süer, M. B. Acar, S. Özcan, The Evaluation Of The Relationship Between Drug Resistance And Pluripotency In Breast Cancer Cell Line, Sözlü Sunum, 12. International Gevher Nesibe Medical Sciences Conference, Ankara, Turkey, 19-20 Şubat 2024