



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜLTÜR ORTAMINDA KANSER HÜCRELERİNİN
VARLIĞINDA FİBROBLAST HÜCRELERİNİN OLASI
DAVRANIŞ DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN: MELİKE ÖZGÜL ÖNAL
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER

MANİSA-2020



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜLTÜR ORTAMINDA KANSER HÜCRELERİNİN
VARLIĞINDA FİBROBLAST HÜCRELERİNİN OLASI
DAVRANIŞ DEĞİŞİKLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN: MELİKE ÖZGÜL ÖNAL
DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ ÜYELERİ

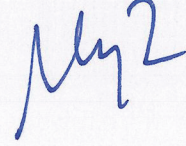
PROF. DR. H. SEDA VATANSEVER	(Tez Danışmanı)
PROF. DR. KEMAL ÖZBİLGİN	(Üye)
PROF. DR. HASAN AYDEDE	(Üye)
PROF. DR. FERAL ÖZTÜRK	(Üye)
PROF. DR. MEHMET YÜNCÜ	(Üye)

MANİSA-2020

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışım olmadığını beyan ederim.

Melike ÖZGÜL ÖNAL



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden doktora tezimin gerçekleşmesine kadar süren eğitim hayatım boyunca sabır ve anlayışla bana tecrübe ve deneyimlerini aktaran çok değerli danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız **Prof Dr. H. Seda VATANSEVER**'e, lisansüstü eğitimim boyunca benden bilgilerini ve desteklerinin esirgemeyen değerli hocalarım **Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN**, **Prof. Dr. Sevinç İNAN**, **Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU** ve **Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER**'e, lisansüstü eğitimim boyunca birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, akademik sürecimin her anında desteklerini benden esirgemeyen Muğla Sıtkı Koçman Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki ailem olan Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Feral ÖZTÜRK**, **Doç. Dr. Hülya ELBE** ve **Arş. Gör. Dr. Gürkan YİĞİTTÜRK**'e teşekkürü bir borç bilirim.

Doğduğum günden bugüne kadar sonsuz anlayış, sabır ve sevgilerini esirgemeyen **Annem** ve **Babam**'a ve her umutsuzluğa düştüğümde tekrar ayağa kalkmam için gerekli gücü veren, hayatımın her aşamasında sorgusuz yanımda olan ve sevginin kıymetini bana öğreten en değerli varlığım, yol arkadaşım, sevgili eşim **Arş. Gör. Dr. Tuna ÖNAL**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Melike ÖZGÜL ÖNAL

KISALTMA VE SİMGELER

ABC	: ATP bağlayıcı kaset
APC	: adenomatous polposis coli
ATP	: adenzintrifosfat
BMP	: kemik morfogolik protein
CAF	: kanser-ilifkili fibroblastlar
CD	: cluster of differentiation
CK	: sitokeratin
CK19	: sitokeratin 19
CO₂	: karbondioksit
CSC	: kanser kök hücre
CXCL	: kemokin (C-X-C motif) ligand
DAB	: diaminobenzidine
DCC	: deleted in colon carcinoma
DMSO	: dimetil sülfoksit
DNA	: deoksiribonükleik asit
E-kaderin	: epitelyal kaderin
ECM	: ekstrasellüler matriks
EDTA	: etilen diamin tetra asetik asit
ELN	: elastin
EMT	: epitelyal-mezenkimal ge�if
EndMT	: endotel hücrelerinin mezenkimal ge�ifi
FAK	: src-fokal adezyon kinaz
FAP	: fibroblast aktivasyon proteini
FBS	: f�tal sığır serumu
FGF	: fibroblast büyüme faktörü
FN1	: fibronektin-1

FSP-1 (S100A4)	: fibroblast spesifik protein-1
H₂O₂	: hidrojen peroksit
HGF	: hepatosit büyüme faktörü
HNPCC	: hereditör nonpolipozis kolorektal kanser sendromu
IGF	: insülin benzeri büyüme faktörü
IL	: interleukin
LKB	: karaciğer kinaz B
LPS	: lipopolisakkarit
MAPK	: mitojen aktive edici protein kinaz
MET	: mezenkimal-epitelyal geçiş
MMP	: matriks metaloproteinazlar
MUC	: müsin
N-kaderin	: nöronal kaderin
NADPH	: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NG2	: nöron glial antijen-2
NSCLC	: küçük olmayan hücreli akciğer kanseri
p53 (TP53)	: tümör protein 53
PBS	: fosfat tampon solüsyonu
PDGF	: trombosit türevli büyüme faktörü
PDGFR	: trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü
PECAM-1 (CD31)	: trombosit/endotelyal hücre adezyon molekülü-1
pERK	: fosforillenmiş ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz
PTEN	: fosfataz ve tensin homologu lipid fosfataz
RhoK	: rodopsin kinaz
SDF-1	: stromal hücre türevli faktör-1
STAT	: sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TAM	: kanser ilişkili makrofajlar
TGF-β	: transforme edici büyüme faktörü-beta
TNC	: tenascin
TNF	: tümör nekrosiz faktör
VEGF	: vasküler endotelyal büyüme faktörü
α-SMA (ACTA2)	: alfa düz kas aktinin

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMA VE SİMGELER	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
TABLO DİZİNİ	ix
RESİM DİZİNİ	xi
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. KOLOREKTAL KARSİNOM	6
4.2. KANSER KÖK HÜCRELERİ	13
4.3. KOLON KANSERİ KÖK HÜCRELERİ.....	24
4.4. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ.....	26
4.5. KANSER İLİŞKİLİ FİBROBLASTLAR	29
4.5.1. Çalışmada İncelenecek Olan Kanser İlişkili Fibroblastlara Özgü Pozitif ve Negatif Biyobelirteçler	36
4.5.1.1. Alfa düz kas aktin (α -SMA).....	36
4.5.1.2. Vimentin	37
4.5.1.3. Fibroblast spesifik protein (FSP-1)	39
4.5.1.4. Sitokeratin 19 (CK19)	40
4.5.1.5. CD31.....	40
4.5.2. Çalışmada İncelenecek Olan Kanser İlişkili Fibroblastların Salgıladığı Faktörler	42
4.5.2.1. Transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF- β 1).....	42
4.5.2.2. Fibroblast aktivasyon proteini (FAP)	43
4.5.2.3. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF).....	45

4.5.2.4. İnterlökin-6 (IL-6)	45
5. GEREÇ VE YÖNTEM	48
5.1. KOLON KANSER HÜCRELERİNİN VE VERO HÜCRELERİNİN KÜLTÜRÜ	48
5.2. KOLON KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN ELDESİ	49
5.3. KOLON KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU	49
5.4. DENEY GRUPLARININ BELİRLENMESİ VE İNDİREKT KO-KÜLTÜR SİSTEMİNİN KURULMASI.....	51
5.5. İMMUNOSİTOKİMYA ANALİZİ.....	52
5.6. ELISA ANALİZİ.....	53
5.7. IN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ MODELİ.....	55
5.8. BULGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	55
6. BULGULAR.....	57
6.1. KOLON KANSER HÜCRELERİNİN VE VERO HÜCRELERİNİN KÜLTÜRÜ	57
6.2. KOLON KANSERİ KÖK (CD133+) HÜCRELERİNİN ELDESİ	58
6.3. KOLON KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU	59
6.4. VERO HÜCRELERİNİN İMMUNOSİTOKİMYASAL BULGULARI .60	
6.4.1. α -SMA immunoreaktivitesi	60
6.4.2. Vimentin immunoreaktivitesi	65
6.4.3. FSP-1 immunoreaktivitesi	70
6.4.4. CK19 immunoreaktivitesi.....	75
6.4.5. CD31 immunoreaktivitesi.....	80
6.5. VERO HÜCRELERİNİN ELISA ANALİZİ BULGULARI	87
6.5.1. TGF- β 1	87
6.5.2. FAP- α	89
6.5.3. VEGF.....	91
6.5.4. IL-6.....	94
6.6. IN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ MODELİ BULGULARI.....	96
7. TARTIŞMA.....	99
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	114
9. KAYNAKLAR	115
10. EKLER.....	129
11. ÖZGEÇMİŞ	131

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. 2018 yılında “Global Cancer Statistics (GLOBOCAN)” tarafından 185 ülkede belirlenen insidans ve mortalite istatistikleri	7
Şekil 2. Kolorektal kanserlerin gelişimi ve aşamaları	8
Şekil 3. 2018 yılında “Global Cancer Statistics (GLOBOCAN)” tarafından 185 ülkede belirlenen kolon ve rektum kanserleri cinsiyete bağlı görülme insidansları.	10
Şekil 4. Kolorektal kanser hastalarından alınan dokuların histolojik olarak sınıflandırılması (A) İyi diferansiye adenokarsinom, uzamış hiperkromatik nükleus ile karakterize ve bez lümeninde nekrotik kalıntılar gözlenmektedir. (B) Kötü diferansiye adenokarsinom, tümör hücreleri ile kaplanmış ve az sayıda bez yapısı mevcuttur. (C) Müsinöz adenokarsinom (kötü diferansiye adenokarsinomlar sınıfındadır), hücre dışı müsin birikimi ve taşlı yüzük yapısında hücreler görülmektedir	11
Şekil 5. Kanser kök hücre araştırmalarında dönüm noktalarını temsil eden zaman çizelgesi.....	14
Şekil 6. Kanser kök hücrelerin oluşmasını tanımlayan 3 hipotezin şematik gösterimi. Bu hipotezlere göre (1) Mutasyona uğramış kök hücreden, (2) bir ya da iki farklı mutasyona uğramış öncü (progenitör) hücreden ya da (3) meydana gelen birden fazla mutasyon ile kök hücre karakteristiğine geri dönmüş (dediferansiasyon) farklılaşmış bir hücreden kanser kök hücre oluşabilir	16
Şekil 7. Kanser kök hücre bağımlı tümöröenez modelleri. (A) Stokastik model (B) Kanser kök hücre modeli (C) Kanser plastisite modeli	18
Şekil 8. Bir tümör içerisindeki kanser hücrelerinin heterojenitesi	20
Şekil 9. Tümör heterojenite modelleri (A) Klonal evrim modeli (B) Kanser kök hücre modeli	21
Şekil 10. Kanser kök hücrelerinin tedaviden kaçabilme ve nüklere sebep olabilme yetenekleri altında yatan mekanizmalar.....	23
Şekil 11. CD133 tarafından düzenlenen EMT, kanser hücre göçü ve metastazı ile ilişkili hücre sinyal yolları	26
Şekil 12. Tümör mikroçevresinin temel hücresel komponentleri ve tümör içerisindeki ana rolleri	27
Şekil 13. Normal ve kanser ilişkili fibroblastlar ile ilgili araştırmaların dönüm noktalarını temsil eden zaman çizelgesi	30
Şekil 14. Kanser ilişkili fibroblastların köken aldıkları hücreler ile ilgili çeşitli hipotezler bulunmaktadır	33

Şekil 15. Kanser ilişkili fibroblastların kanser mikroçevresi içerisinde düzenlediği mekanizmaların şematik gösterimi.....	35
Şekil 16. α -SMA ve kanser ilişkili fibroblastlar ilişkisi	37
Şekil 17. Normal fibroblastların aktifleşmesi sonrasında kanser ilişkili fibroblastlarda ifadesi artan moleküller.....	38
Şekil 18. CK19 ve CD31 proteinleri kanser ilişkili fibroblastları için negatif biyobelirteç olarak kabul edilmektedir	41
Şekil 19. Neoplazi ve desmoplaziye neden olan önemli büyüme faktörleri. Kanser ilişkili fibroblast kökenli TGF- β ve kanser türevli TGF- β tümör mikroçevresinde hücre-hücre etkileşim için önemli bir faktördür.....	43
Şekil 20. FAP ve kanser ilişkili fibroblast ilişkisi.....	44
Şekil 21. Kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan TGF- β ve VEGF'in fonksiyonları	45
Şekil 22. Kanser ilişkili fibroblast ve kanser kök hücresi ilişkisi	47
Şekil 23. Deney gruplarının şematik gösterimi.....	52
Şekil 24. Kanser hücreleri ile fibroblast hücrelerinin steril insertler kullanılarak oluşturulan ko-kültür işleminin şematik gösterimi.....	52
Şekil 25. Kanser hücrelerine ait CD133 H-SCORE değerleri	60
Şekil 26. Tüm gruplara ait α -SMA H-SCORE grafiği	65
Şekil 27. Tüm gruplara ait vimentin H-SCORE grafiği	70
Şekil 28. Tüm gruplara ait FSP-1 H-SCORE grafiği	75
Şekil 29. Tüm gruplara ait CK19 H-SCORE grafiği.....	80
Şekil 30. Tüm gruplara ait CD31 H-SCORE grafiği.....	85
Şekil 31. TGF- β 1 standart eğrisi	88
Şekil 32. TGF- β 1 konsantrasyonunun deney gruplarındaki toplam değerleri.....	89
Şekil 33. FAP- α standart eğrisi	90
Şekil 34. FAP- α konsantrasyonunun deney gruplarındaki toplam değerleri.....	91
Şekil 35. VEGF standart eğrisi.....	92
Şekil 36. VEGF konsantrasyonunun deney gruplarındaki toplam değerleri.	93
Şekil 37. IL-6 standart eğrisi.....	94
Şekil 38. IL-6 konsantrasyonunun deney gruplarındaki toplam değerleri	95
Şekil 39. Günlere göre VERO hücrelerinin yüzde kapanma oranları	98
Şekil 40. Kanser ilişkili fibroblast belirteçlerinin çalışma sonuçları.....	107
Şekil 41. Kanser ilişkili fibroblastların salgıladıkları faktörlerin çalışma sonuçları.....	112

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Kolorektal tümörler	7
Tablo 2. Sporadik ve ailesel kolorektal neoplazilerin genel özellikleri	9
Tablo 3. Kansere kök hücreleri ve normal kök hücreler arasındaki benzerlikler ve farklılıklar	15
Tablo 4. Farklı tümörlere ait kanser kök hücre belirteçleri	24
Tablo 5. Sıklıkla kullanılan kanser ilişkili fibroblastların belirteçleri, ekspresyon ve biyolojik fonksiyon özellikleri	31
Tablo 6. Kansere ilişkili fibroblast belirteçleri	32
Tablo 7. İndirekt immunositokimya yöntemi	51
Tablo 8. İmmünohistokimya analizi ile incelenen kanser ilişkili fibroblast biyobelirteçleri	53
Tablo 9. ELISA yöntemi	54
Tablo 10. CD133 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	60
Tablo 11. Birinci gün α -SMA immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	62
Tablo 12. Üçüncü gün α -SMA immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	63
Tablo 13. Yedinci gün α -SMA immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	64
Tablo 14. Birinci gün vimentin immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	66
Tablo 15. Üçüncü gün vimentin immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	68
Tablo 16. Yedinci gün vimentin immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	69
Tablo 17. Birinci gün FSP-1 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	71
Tablo 18. Üçüncü gün FSP-1 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	73
Tablo 19. Yedinci gün FSP-1 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	74
Tablo 20. Birinci gün CK19 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	76
Tablo 21. Üçüncü gün CK19 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	78
Tablo 22. Yedinci gün CK19 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	79
Tablo 23. Birinci gün CD31 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	81
Tablo 24. Üçüncü gün CD31 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	83
Tablo 25. Yedinci gün CD31 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri	84

Tablo 26. TGF- β 1 proteinine ait bilinen konsantrasyonlardaki standartların OD ₄₅₀ değerleri	87
Tablo 27. TGF- β 1 konsantrasyonları (pg/mL).....	88
Tablo 28. FAP- α proteinine ait bilinen konsantrasyonlardaki standartların OD ₄₅₀ değerleri	89
Tablo 29. FAP- α konsantrasyonları (ng/mL)	90
Tablo 30. VEGF proteinine ait bilinen konsantrasyonlardaki standartların OD ₄₅₀ değerleri	91
Tablo 31. VEGF konsantrasyonları (pg/mL).....	92
Tablo 32. IL-6 proteinine ait bilinen konsantrasyonlardaki standartların OD ₄₅₀ değerleri	94
Tablo 33. IL-6 konsantrasyonları (pg/mL).....	95
Tablo 34. Yara alanı kapanma oranları	97

RESİM DİZİNİ

Resim 1. DMEM hücre vasatında kültüre edilen VERO hücrelerinin genel görüntüsü (A), RPMI-1640 hücre vasatında kültüre edilen VERO hücrelerinin genel görüntüsü (B). Ölçek: 100 µm.....	57
Resim 2. COLO-741 hücrelerin genel görüntüsü. Ölçek: 100 µm.	58
Resim 3. COLO-741 (A), COLO-741 CD133+ (B) ve COLO-741 CD133- (C) kolon kanseri hücrelerinin kültür işleminin 24. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri. Ölçek: 100 µm.....	58
Resim 4. COLO-741 (A), COLO-741 CD133+ (B) ve COLO-741 CD133- (C) hücrelerine ait CD133 immunoreaktivitelerinin görüntüleri. COLO-741 (D), COLO-741 CD133+ (E) ve COLO-741 CD133- (F) hücrelerine ait negatif kontrol boyamaları.....	59
Resim 5. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün α -SMA immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.....	61
Resim 6. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün α -SMA immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.....	63
Resim 7. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün α -SMA immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.....	64
Resim 8. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün vimentin immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.....	66
Resim 9. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün vimentin immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.....	67
Resim 10. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün vimentin immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.....	69
Resim 11. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün FSP-1 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.....	71
Resim 12. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün FSP-1 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.....	72

Resim 13. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün FSP-1 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.....	74
Resim 14. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün CK19 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.....	76
Resim 15. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün CK19 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.....	77
Resim 16. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün CK19 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.....	79
Resim 17. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün CD31 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.....	81
Resim 18. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün CD31 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.....	82
Resim 19. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün CD31 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.....	84
Resim 20. Birinci gün deney gruplarına ait VERO hücrelerinin negatif kontrol boyamaları. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.	86
Resim 21. Üçüncü gün deney gruplarına ait VERO hücrelerinin negatif kontrol boyamaları. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.	86
Resim 22. Yedinci gün deney gruplarına ait VERO hücrelerinin negatif kontrol boyamaları. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.	87
Resim 23. Gruplara ve günlere göre VERO hücrelerinin yara iyileşmesi analizi inverted mikroskop fotoğrafları. Ölçek: 100 μ m. *: Yara alanları.....	97

Tezin Başlığı: Kültür Ortamında Kanser Hücrelerinin Varlığında Fibroblast Hücrelerinin Olası Davranış Değişikliklerinin Araştırılması

Öğrencinin Adı: Melike ÖZGÜL  NAL

Danışmanı: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Anabilim Dalı: Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Çalışmada metastatik kolon kanseri hücre hattı içerisinde bulunan kanser kök hücrelerinin ve kök hücre olmayan kanser hücrelerinin fibroblast hücreleri ile indirekt olarak ko-kültüre edilmeleri sonucunda fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması ve kanser ilişkili fibroblast gelişimindeki rollerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Deneyler; kontrol grubu VERO hücreleri (Grup 1), COLO-741 kanser hücreleri ile ko-kültüre edilen VERO hücreleri (Grup 2), CD133+ hücreleri ile ko-kültüre edilen VERO hücreleri (Grup 3) ve CD133- kanser hücreleri ile ko-kültüre edilen VERO hücreleri (Grup 4) olacak şekilde dört grupta gerçekleştirildi. Ko-kültürün birinci, üçüncü ve yedinci günlerinde α -SMA, vimentin, FSP-1, CK19 ve CD31 proteinlerinin dağılımları indirekt immunositokimya yöntemiyle ve TGF- β 1, FAP- α , VEGF ve IL-6 proteinlerinin kültür vasatları içerisindeki konsantrasyonları ELISA analizi ile incelendi. Ek olarak *in vitro* yara iyileşmesi modeli oluşturularak değerlendirildi.

Bulgular: İmmunohistokimya analizi sonuçlarına göre Grup 2 ve Grup 4 VERO hücrelerinde α -SMA'ın arttığı, vimentinin değişmediği ve FSP-1, CK19 ve CD31'in ise azaldığı belirlendi. Grup 3'te α -SMA, vimentin ve FSP-1'in arttığı gözlenirken, CK19 ve CD31'in azaldığı tespit edildi. ELISA analizi sonuçlarına göre VEGF ve IL-6 konsantrasyonlarında anlamlı bir değişim belirlenmez iken, sadece Grup 3'te TGF- β 1 ve FAP- α konsantrasyonlarının anlamlı olduğu tespit edildi.

Sonuçlar: Kanser kök hücreleri ile birlikte kültüre edilen fibroblast hücrelerinde α -SMA, vimentin ve FSP-1 dağılımlarının arttığının, CK19 ve CD31 dağılımlarının ise azaldığının ve aynı grupta TGF- β 1 ve FAP- α salgılamasının gerçekleştiğinin tespit edilmesi sonucunca, kanser kök hücrelerin kanser ilişkili fibroblastlara dönüştürebilme kapasitelerinin olduğu d ş n ld .

Anahtar Kelimeler: Kolon kanseri, kanser ilişkili fibroblastlar, kanser kök hücreleri.

Title: Investigation of Possible Behavior Changes of Fibroblast Cells in the Presence of Cancer Cells in the Culture Environment

Student Name: Melike ÖZGÜL ÖNAL

Supervisor: Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Department: Department of Histology and Embryology

2. ABSTRACT

Aim: In this study, it was aimed to investigate the effects of cancer stem cells and non-cancer stem cells of the metastatic colon cancer cell line on fibroblast cells under indirect co-culture and examine their roles in cancer associated fibroblast development.

Material and Method: Assays were performed in four groups: Control group VERO cells (Group 1), VERO cells co-cultured with COLO-741 cancer cells (Group 2), VERO cells co-cultured with CD133+ cancer cells (Group 3) and VERO cells co-cultured with CD133- cancer cells (Group 4). In the first, third and seventh days of co-culture, distributions of α -SMA, vimentin, FSP-1, CK19 and CD31 proteins were analyzed by indirect immunocytochemistry method and the concentrations of TGF- β 1, FAP- α , VEGF and IL-6 proteins in culture media were detected by ELISA analysis. In addition, *in vitro* wound healing model was evaluated.

Results: According to results of immunohistochemistry analysis, it was determined that α -SMA increased, vimentin remained unchanged and FSP-1, CK19 and CD31 decreased in Group 2 and Group 4 VERO cells. In Group 3, it was observed that α -SMA, vimentin and FSP-1 increased, while CK19 and CD31 decreased. According to the results of ELISA, while no significant change in VEGF and IL-6 concentrations was determined, TGF- β 1 and FAP- α concentrations were found significant in only Group 3.

Conclusions: It was thought that cancer stem cells have the capacity to transform fibroblasts into cancer associated fibroblasts as a result of determination increased α -SMA, vimentin and FSP-1, and decreased CK19 and CD31 distributions in fibroblast cells co-cultured with cancer stem cells, and also detection of TGF- β 1 and FAP- α secretion in the same group.

Key Words: Colon cancer, cancer associated fibroblasts, cancer stem cells.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kolorektal kanserler dünya genelinde morbidite ve mortalite oranı en yüksek epitelyal kanser tiplerindendir. Ülkemizde de 2010-2014 yılları arasında Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun en son yayınladığı istatistiksel verilere göre kolon kanseri bütün kanserler arasında görülme sıklığı olarak hem kadınlarda hem de erkeklerde üçüncü sırada yer almıştır.

Bir tümör mikroçevresi hem kanser hücrelerinden ve hem de malign olmayan stromal hücrelerden oluşmaktadır. Stromal hücreler; fibroblastlar, makrofajlar, vasküler endotel hücreleri ve immün sisteme ait hücrelerdir. Literatürde bulunan çoğu kanser çalışması kanser hücrelerinin genetik ve epigenetik değişimlerine odaklanmış iken kanser stromasını araştıran daha az sayıda çalışma mevcuttur. Son yıllarda arttığı gözlenen stromal hücreler ve kanser hücreleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar, tümör-stroma etkileşimlerinin birçok yönünü açıklığa kavuşturmuş ve tümör mikroçevresindeki stromal hücrelerin kanser hücrelerinin devamlılığı açısından destekleyici olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, kanseri kontrol altına almak ve yok etmek için sadece malign kanser hücrelerine değil aynı zamanda benign stromal hücrelere de odaklanması gerekmektedir.

Kanser kök hücreleri; normal kök hücrelere benzer şekilde kendi kendini yenileyebilen, diğer kanser hücrelerine farklılaşabilen, özelliklerini bir yaşam boyu kaybetmeyen, iyonize radyasyon ve kimyasal ilaçlara dirençli ve metastaz ile kanseri sekonder alanlarda başlatabilen hücrelerdir. Ayrıca kanser kök hücreleri tedaviye direnç geliştirmekte ve kanserin tedavi edilememesi veya nüksünden sorumlu tutulmaktadır. Özellikle epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) gösterme potansiyellerinden dolayı da metastatik hücrelerin oluşumunda da rol oynadıkları bilinmektedir. Son yıllarda kanser tedavilerinde başarı sağlayabilecek kanser kök hücrelerini hedefleyen stratejiler üzerine yapılan çalışmalar hızla artmaktadır. Kolon kanseri dokularında da kanser kök hücrelerinin varlığı belirlenmiştir. Kolon kanseri kök hücreleri için spesifik olan çeşitli hücre yüzey belirteçleri de tanımlanmıştır. Bunlardan en temel olanları; CD133, CD44, CD166, CD29 ve ALDH-1 olarak

sayılabilir. Ayrıca kanser kitlelerinin hücresel olarak homojen değil, heterojen oldukları ortaya konulmuş ve kanser dokusu içerisinde kanser kök hücrelerinin ve diğer farklılaşmış, mitotik özelliklerini kaybetmiş kanser hücrelerinin birlikte bulunduğu belirlenmiştir.

Kanser stromasının ana bileşenleri olan fibroblastlara, kanser ilişkili fibroblastlar adı verilmektedir. Kanser ilişkili fibroblastlar tümör-stroma ilişkisinde çok önemli bir yere sahiptir. Kanser dokusundaki fibroblastların, yara iyileşmesi sürecinde aktive olan büyük iğ şeklindeki miyofibroblastlara benzer şekilde oldukları belirtilmektedir. Yara iyileşmesi sırasında, işlem tamamlandığında miyofibroblastlar azalmaktadır fakat kanser mikroçevresindeki kanser ilişkili fibroblastlar sürekli olarak aktive olmakta, normal fenotipe geri dönmekte veya normal fibroblastlar gibi apoptoz ile eliminasyona uğramamaktadırlar. Kanser mikroçevresindeki kanser ilişkili fibroblastların; fibroblastlar, kanser hücreleri, epitel hücreleri, endotel hücreleri, adipositler ve kök hücreler gibi birçok kökeni olabileceğine dair teoriler ortaya atılmıştır. Fakat en güçlü teori kanserin olduğu dokuda halihazırda bulunan fibroblastların, kanser hücrelerinin etkisi ile kanser ilişkili fibroblastlara dönüştüğü şeklinde olanıdır.

Kanser ilişkili fibroblastların, kanser gelişimi ve ilerlemesini destekleyen rolleri ile ilgili çok fazla araştırma yapılmıştır. Ayrıca kanser hücreleri ve kanser ilişkili fibroblastların karşılıklı etkileşiminin kanser progresyonunda önemli yolların aktivasyonunu sağladığı da bilinmektedir. Literatürdeki çoğu çalışmanın verdiği ortak mesaj, kanser ilişkili fibroblastların kanser gelişimi için kritik önem taşıdığı, salgıladıkları pro-tümörojenik sinyaller ile kanser gelişimini ve metastazını ilerlettikleri ve kanser tedavisi için bir seçenek olarak kanser ilişkili fibroblastların da hedeflenmesi gerektiğidir. Fakat literatürde kanser ilişkili fibroblastların tümör mikroçevresi içerisinde oluşumları ile ilgili yeterli araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, metastatik kolon kanseri hücre hattı (COLO-741) içerisinde bulunan kanser kök hücreleri (CD133+ COLO-741) ve kanser kök hücre olmayan (CD133- COLO-741) hücreler ayrılarak fibroblast hücreleri ile indirekt ko-kültür sistemi kurulmuştur. İmmunositokimya analizi ile kanser ilişki fibroblast pozitif belirteçler olan α -SMA, Vimentin ve FSP-1 ile negatif belirteçler olan CK19 ve CD31'in incelenmesi gerçekleştirilmiştir. ELISA analizi ile de kültür vasatlarında TGF- β 1, VEGF, FAP- α ve IL-6 proteinleri incelenmiştir.

Heterojen kolon kanser hücre popölasyonu içerisindeki farklı kanser hücreleri tarafından meydana getirilen etkilerin birbirleri ile karşılaştırılmasının yapılması ve fibroblast hücreleri üzerinde kanser ilişkili fibroblastlara dönüştürme kapasitelerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.



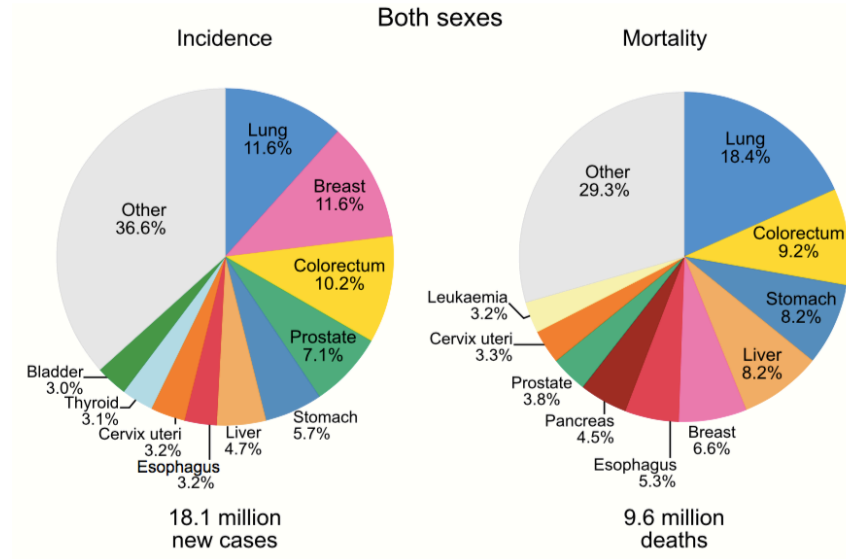
4. GENEL BİLGİLER

4.1. KOLOREKTAL KARSİNOM

Barsak tümörleri dünya genelinde morbidite ve mortalite oranı en yüksek epitelyal kanser tiplerindendir. İnce ve kalın barsak tümörlerine bakıldığında rektum da dahil olmak üzere kolon kanserleri primer neoplazm için diğer organlardan daha fazla kaynak oluşturmaktadır. Rektum ve kolon kanserlerini kapsayan çalışmalar genellikle tek bir başlık altında toplanmış olup kolorektal kanserler olarak adlandırılırlar (Kumar ve ark. 2018).

Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun en son yayınladığı istatistiksel verilere göre 2010 - 2014 yılları arasında Türkiye'de kolon kanserlerinin bütün kanserler arasında görülme sıklığı olarak hem kadınlarda (kanserin % 13,8'i) hem de erkeklerde (kanserin % 22,8'i) üçüncü sırada yer almaktadır (<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/495-2014-yılı-turkiye-kanser-istatistikleri.html> Erişim Tarihi: 03.01.2020).

Dünya genelinde 2018 yılında 18,1 milyon yeni kanser vakasının ortaya çıktığı ve kansere bağlı ölümlerin 9,6 milyon olduğu bildirilmiştir. Teşhis edilen yeni kanser vakalarının % 10,2'sini kolorektal kanserler oluşturmuş ve toplam kanser sebepli ölümlerin % 9,2'sine sebep olmuştur. 2018 yılı istatistiklerinde kolorektal kanserler her iki cinsiyet için de hem insidans hem de mortalite oranları açısından üçüncü sırada yer almıştır (Şekil 1) (Bray ve ark. 2018).



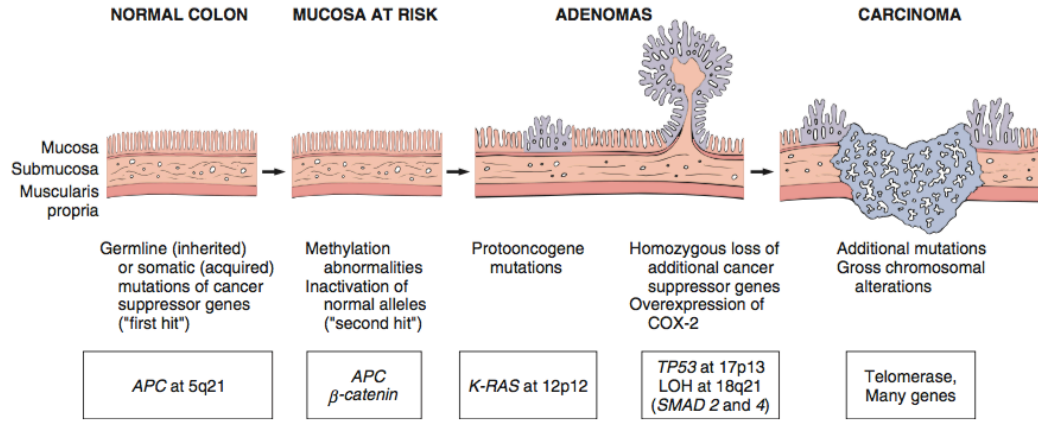
Şekil 1. 2018 yılında “Global Cancer Statistics (GLOBOCAN)” tarafından 185 ülkede belirlenen insidans ve mortalite istatistikleri (Bray ve ark. 2018).

Barsak tümörleri ile ilgili çalışmalar açısından bazı terminolojilerin açıklanması önemlidir. **Polip**, ince ya da kalın barsak lümenine doğru çıkıntı yapmış tümöral kitlelere verilen isimdir. Polipler, epitel ve mukoza tabakasının anormal proliferasyonunun ve maturasyonunun bir sonucudur. **Non-neoplastik polipler** malignite göstermezken, **adenomatöz polipler (adenom)** neoplastik lezyonlar olup karsinom öncülleridir (Tablo 1) (Kumar ve ark. 2018).

Tablo 1. Kolorektal tümörler

Non-Neoplastik Polipler	Hiperplastik polipler Hematomatöz polipler Jüvenil polipler Peutz-Jeghers polipleri İltihabi polipler Lenfoid polipler
Neoplastik Epitelyal Polipler	Bening polipler - Adenomlar Malign polipler - Adenokarsinomlar - Anüsün skuamöz hücreli karsinomu
Diğer Tümörler	Gastrointestinal stromal tümörler Karsinoid tümör Lenfoma

Kalın barsak kanserlerinin en büyük grubu olan kolorektal adenokarsinomlar (% 98) genellikle adenomatöz bir neoplastik polipten köken alarak ortaya çıkarlar (Şekil 2).



Şekil 2. Kolorektal kanserlerin gelişimi ve aşamaları (Kumar ve ark. 2018).

Kolorektal karsinomların epidemiyolojisine bakıldığında hastalığın insidansının en yüksek olduğu yaş grubunun her iki cinsiyet için de 60-70 olduğu görülmekte ve bu yaş grubu hastalığa sahip bireylerin % 80'ini oluşturmaktadır. Kolorektal kanserler erkeklerde kadınlara oranla % 20 oranla daha sık görülmektedir.

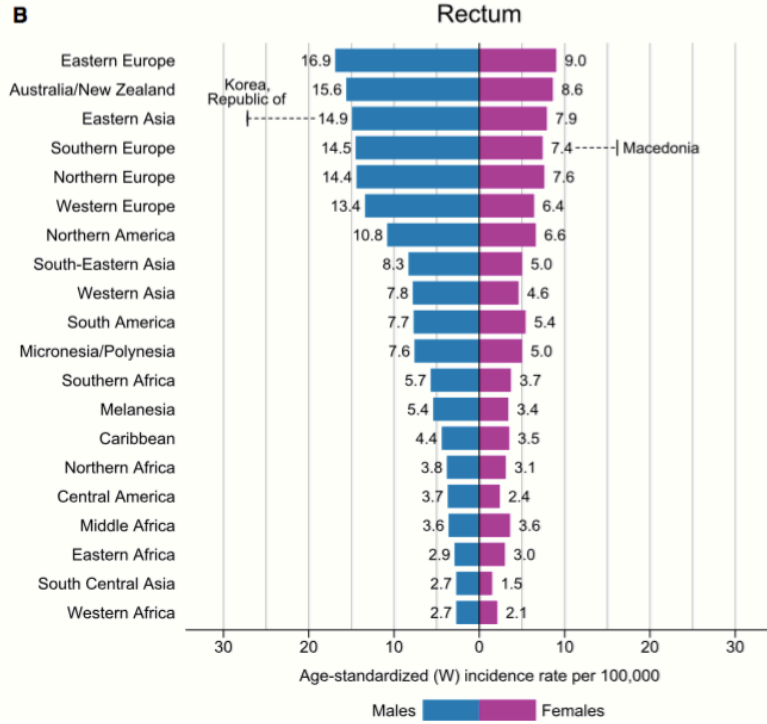
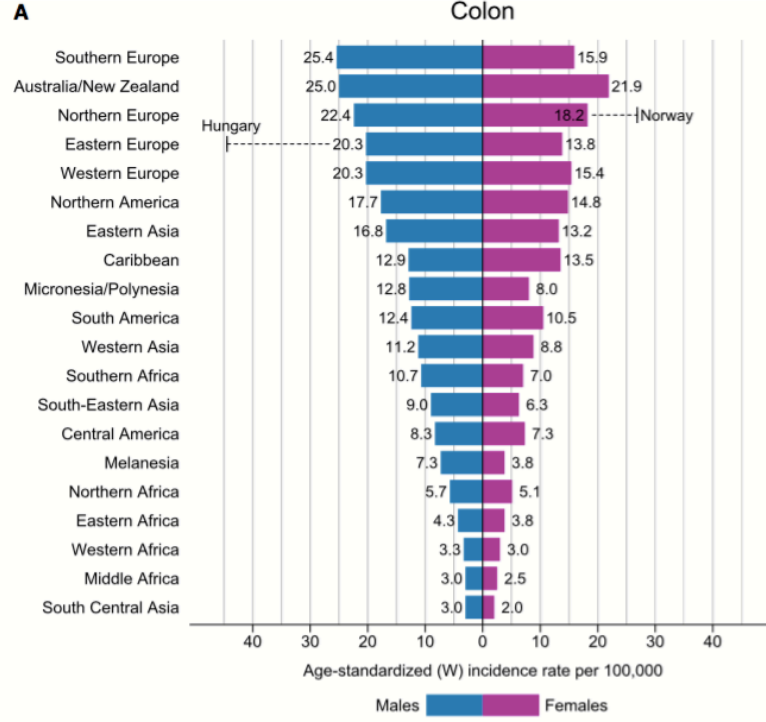
Kolorektal karsinom gelişimini etkileyen faktörler hem genetik hem de çevresel olabilmektedir. Bireylerde kolorektal karsinom teşhisi konulduğunda hastanın tıbbi geçmişinde ülseratif kolit veya polipozis sendromlarının varlığı araştırılmalıdır. Genetik olarak bakıldığında ise *herediter nonpoliposis kolorektal kanser sendromu* (HNPCC – Lynch sendromu) olan bireylerde DNA mutasyonları olması sebebi ile kolon kanseri meydana gelme riski yüksektir (Kumar ve ark. 2018). Kolon kanserini etkileyen diğer genetik sendromlar ise; otozomal dominant olan Muir-Torre sendromu, APC (adenomatous poliposis coli) tümör baskılayıcı geninde mutasyon barındıran ailesel polipozis koli sendromu, otozomal dominant Gardner sendromu, otozomal dominant Turcot sendromu, LKB1 geninde mutasyonlar sonucu meydana gelen otozomal dominant Peutz-Jeghers sendromu ve PTEN (fosfataz ve tensin homoloğu) tümör baskılayıcı geninde mutasyonlar sonucu oluşan otozomal dominant Cowden sendromlarıdır (Tablo 2) (Rosai 2004).

Tablo 2. Sporadik ve ailesel kolorektal neoplazilerin genel özellikleri (Kumar ve ark. 2018).

Etiology	Molecular Defect	Target Gene(s)	Transmission	Predominant Site(s)	Histology
Familial adenomatous polyposis (70% of FAP)	APC/WNT pathway	APC	Autosomal dominant	None	Tubular, villous; typical adenocarcinoma
Hereditary nonpolyposis colorectal cancer	DNA mismatch repair	MSH2, MLH1	Autosomal dominant	Right side	Sessile serrated adenoma; mucinous adenocarcinoma
Sporadic colon cancer (80%)	APC/WNT pathway	APC	None	Left side	Tubular, villous; typical adenocarcinoma
Sporadic colon cancer (10%–15%)	DNA mismatch repair	MSH2, MLH1	None	Right side	Sessile serrated adenoma; mucinous adenocarcinoma

FAP, Familial adenomatous polyposis.

Kolon kanserinin gelişmiş ülkelerde görülme insidansı az gelişmiş ülkelere göre % 30 fazladır (Şekil 3). Bu coğrafi insidans farklılığının en önemli sebebinin beslenme alışkanlıkları olduğu düşünülmektedir. Bitkisel ürünlerin az tüketimi, işlenmiş hayvansal yağ ve karbonhidrat tüketiminin fazla olması ve düşük vitamin içeren diyetlerin barsak florasını değiştirdiği bilinmektedir. Bahsedilen besinlerin bakteriyal parçalanması sonucunda ortaya çıkan zararlı oksidatif yan ürünlerinin, düşük lif içeriği sebebi ile dışkıının hacimsel olarak az olmasına bağlı olarak barsak içerisinde daha uzun süreler kalması ve özellikle rafine diyetlerin oksijen radikallerini yok eden A, C ve E vitaminlerinden zayıf olmasının beslenme alışkanlıklarının kolon kanserlerinin çevresel faktörleri arasında önemli yer aldığı düşünülmektedir (Kumar ve ark. 2018). Diyetle ilgili faktörlere ek olarak; obezite, sigara içimi, divertikülozis, idiyopatik inflamatuvar barsak hastalıkları, radyasyon ve şistomiyazis de kolon kanseri gelişimini etkileyen çevresel faktörler arasında sayılmaktadır (Fenoglio-Preiser ve ark. 1999).



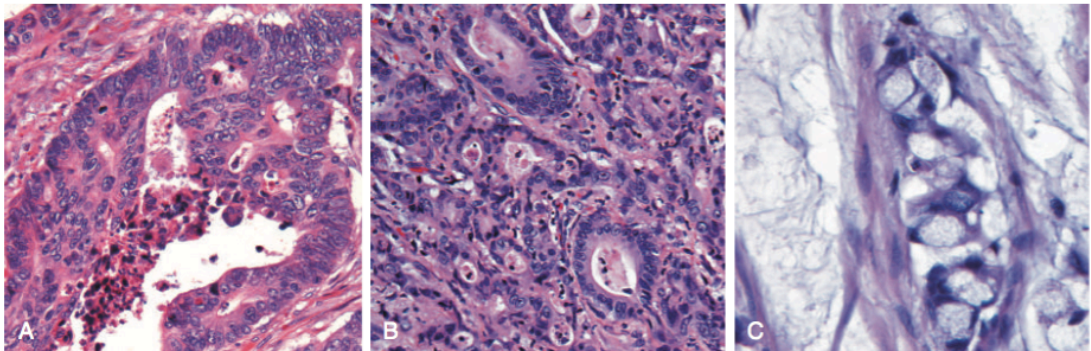
Şekil 3. 2018 yılında “Global Cancer Statistics (GLOBOCAN)” tarafından 185 ülkede belirlenen kolon ve rektum kanserleri cinsiyetle ilişkili görülme insidansları. (Bray ve ark. 2018).

Kolorektal karsinomların % 25’i çekum ve çıkan kolonda, % 25’i rektum ve distal sigmoidde, % 25’i inen kolon ve proksimal sigmoidde yerleşim

göstermektedir. Kalan % 25'lik oran ise çeşitli bölgelere dağılmıştır. Karsinomlar genellikle tek oluşum gösterir ve köken aldıkları adenomatöz lezyonu yok ederler. Birden fazla karsinom oluşumu mevcut ise bunlar genellikle birbirlerinden farklı alanlarda lokalize olmuş şekildedir. Kökenleri aynı olmasına rağmen kolorektal karsinomlar lokalizasyonlarına göre farklı morfolojiler sergilerler. Örneğin proksimal kolon yerleşimli tümörler polipoid, mantar şekilli kitleler halinde büyür ve obstrüksiyona neden olmaz iken, distal kolondaki tümörler lümende daralmaya neden olan anüler lezyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Kumar ve ark. 2018).

Makroskobik görünümünün aksine kolon kanserlerinin mikroskobik özellikleri benzer yapıdadır. Farklı gradeler sergilemelerine rağmen tüm kolon tümör hücreleri müsin üretmekte ve salgılamaktadır. Bu salgılar kanserin ilerlemesini hızlandırarak prognozu kötüleştirir. Tümör hücreleri prizmatik hücreler ile goblet hücrelerinin bir kombinasyonu şeklinde gözlenir. Nadiren endokrin hücreler ve paneth hücreleri ile ilişkilidir. Klasik adenokarsinomlar histolojik grade olarak değişik seviyelerde müsin salgılayan bez yapılarının varlığına göre iyi diferansiye, orta derece diferansiye ve kötü diferansiye adenokarsinomlar olarak sınıflandırılırlar (Şekil 4).

- **İyi diferansiye tümörler (Grade I):** Tümör içerisinde % 75 oranından fazla bez benzeri yapı bulunmaktadır.
- **Orta derece diferansiye tümörler (Grade II):** Tümör içerisinde % 25-75 oranında bez benzeri yapı bulunmaktadır.
- **Kötü diferansiye tümörler (Grade III):** Tümör içerisinde % 25 oranından az bez benzeri yapı bulunmaktadır.



Şekil 4. Kolorektal kanser hastalarından alınan dokuların histolojik olarak sınıflandırılması (A) İyi diferansiye adenokarsinom, uzamış hiperkromatik nükleus ile karakterize ve bez lümeninde nekrotik kalıntılar gözlenmektedir. (B) Kötü diferansiye adenokarsinom, tümör hücreleri ile kaplanmış ve az sayıda bez yapısı

mevcuttur. (C) Müsinöz adeneokarsinom (kötü diferansiye adenokarsinomlar sınıfındadır), hücre dışı müsin birikimi ve taşlı yüzük yapısında hücreler görülmektedir (Kumar ve ark. 2018).

Histolojik olarak kolorektal karsinomlar müsin pozitif boyanmaktadır. Ayrıca immunohistokimyasal olarak MUC1, MUC3 ve CK20 pozitif, CK7 negatif boyanırlar (Rosai 2004).

Kolorektal kanserler moleküler genetik açısından iyi anlaşılmış ve moleküler temelleri üzerinde en çok araştırma yapılmış kanserlerdendir. Kolon karsinogenezine çeşitli spesifik mutasyonların sebep olduğu bilinmektedir (Kumar ve ark. 2018).

- Kolon kanserlerinde sıklıkla adenom-karsinom sekansı olarak da isimlendirilen APC/ β -katenin yolağında görev alan tümör baskılayıcı genlerde ve onkogenlerde mutasyonlar gözlenir. Öncelikle küçük adenomların oluşumuna sebep olan epitel proliferasyonları ile gözlenen kolon polipleri daha sonra displastik hale gelerek invaziv kanserlere dönüşürler. Kolorektal kanserlerin çok büyük bir kısmında APC tümör baskılayıcı gen mutasyonu görülmektedir. Adenomların oluşması için APC genine ait her iki kopyasında kaybı meydana gelmelidir. Ailesel polipozis koli ve Gardner sendromlarında da görülen APC kaybı sonunda yüzlerce adenom meydana gelmekte ve kansere kadar ilerlemektedir. APC'nin fonksiyon kaybı sonucunda aşırı β -katenin ekspresyonu meydana gelir ve bu durum hücre proliferasyonu istenmeyen bir şekilde hızlandırır. Sporadik kanserler içerisinde APC mutasyonlarının oranı % 60-80'dir (Kumar ve ark. 2018).

- K-RAS mutasyonu 1 cm'den büyük adenomların % 50'sinde mevcut olan patolojik bir durumdur. Mutant RAS apoptozu inhibe ederken, mitotik sinyallerin aktivasyonuna ve hücre çoğalmasının kontrolsüz olarak artışına neden olmaktadır (Kumar ve ark. 2018).

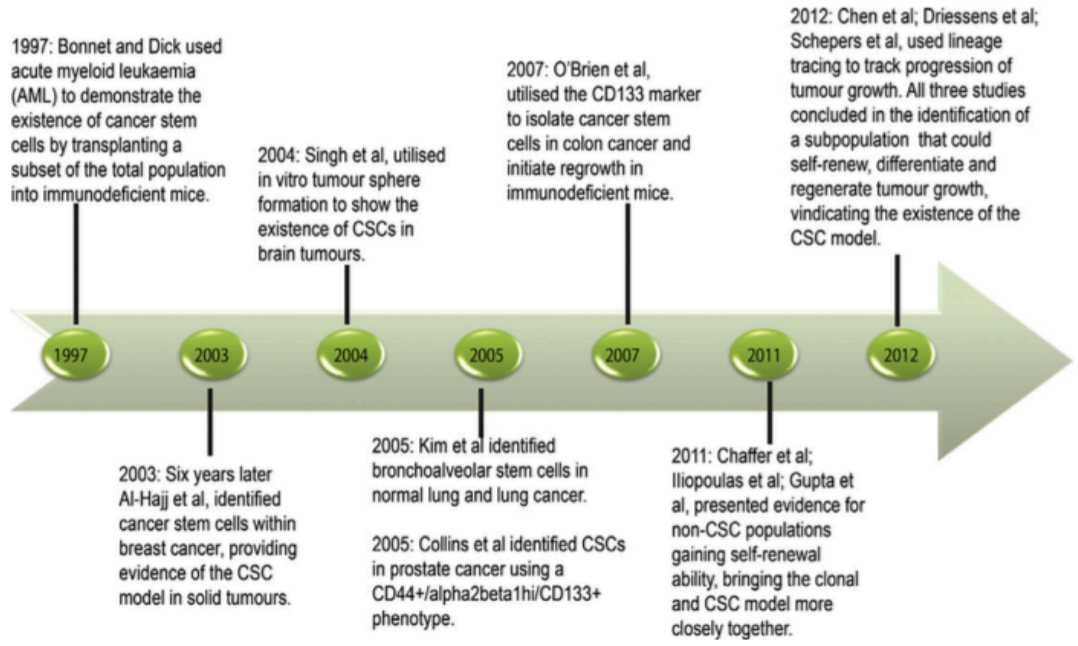
- 18q21 delesyonu kolon kanserlerinin % 60-70'inde saptanmıştır. Bu kromozom bölgesinde 3 adet gen bulunmaktadır. Bunlar; DCC (deleted in colon carcinoma), SMAD2 ve SMAD4'tür. SMAD genleri hücre siklusu inhibitörü olan TGF- β (transforme edici büyüme faktörü beta) ailesi üyelerinin aktivasyonunda rol almaktadır. SMAD ve TGF- β sinyal yollarına ait komponentlerin inaktif olması kontrolsüz hücre büyümesi ile sonuçlanmaktadır (Kumar ve ark. 2018).

- p53 geninin kaybı da kolon kanserlerinin % 70-80'inde rastlanan bir tümör baskılayıcı gen mutasyonu çeşididir. Adenomlarda kanserlere göre daha az görülüyor olması karsinogenezin geç basamaklarında meydana geldiğini düşündürmektedir (Kumar ve ark. 2018).

Karsinogenezde ilk adım, kolon mukozasında spesifik neoplastik polip tiplerinin oluşmasıdır. Polip histolojisi, malign potansiyel tespitinde kritik öneme sahiptir. Hastalığın tespitinde yaygın olarak kullanılan iki histolojik tip **hiperplastik** ve **adenomatoz**dur. Histolojik olarak hiperplastik polipler; sitoplazmik mukusun azaldığı ve sayıca artmış glandular hücre içermesi karakterizedir, fakat bu hücreler hiperkromatik çekirdeğe sahip değildirler ve tabakalaşma göstermezler. Adenomatöz poliplerde ise genellikle hücrelerde hiperkromatik ve genişlemiş, çekirdekler gözlenir. Adenomlar tübüler veya villöz olarak sınıflandırılır. Histolojik olarak, tübüler adenomlar dallı tübüllerden oluşur, villöz adenomlar ise bir dalda düzenlenmiş dijit şeklinde bir villus içerir. Tübülovilloz adenomlar ise her iki elementi de içerir (Cappell 2008).

4.2. KANSER KÖK HÜCRELERİ

Kanser kök hücre kavramı 19. yüzyıldan beri bilimsel literatürde tartışılmaktadır. İlk defa 1874'te Durante tarafından tümörlerin kök hücre özelliklerine sahip nadir bir hücre popülasyonundan kaynaklandığını varsayı yapılmış ve eşzamanlı olarak Conheim tarafından bu hücrelerin yetişkin organizmada kalan embriyonal hücreler olabileceği ve pluripotensi özelliklerini koruduklarını belirtilmiştir (Oliveira 2011). Bu kavrama “embriyonal dinlenme teorisi” adı verilmiştir (Sell 2009; Oliveira 2011). Daha sonra 19. yüzyılın sonlarında bu hipotezin yerini kademeli olarak karsinogenezin farklılaşması teorisi almıştır. Yetişkin farklılaşmış hücrelerin, dedifferensiasyon sonrasında kanser kök hücrelerinin kaynağı olduğu varsayılmıştır (Sell 2009). Son yıllarda kök hücrelerin farklı kanser tiplerinde olmaları, oluşma mekanizmalarına ait verilerin gelmesi ile kanser gelişme ve kök hücre ilişkisi üzerine çalışmalar artmıştır (Şekil 5).



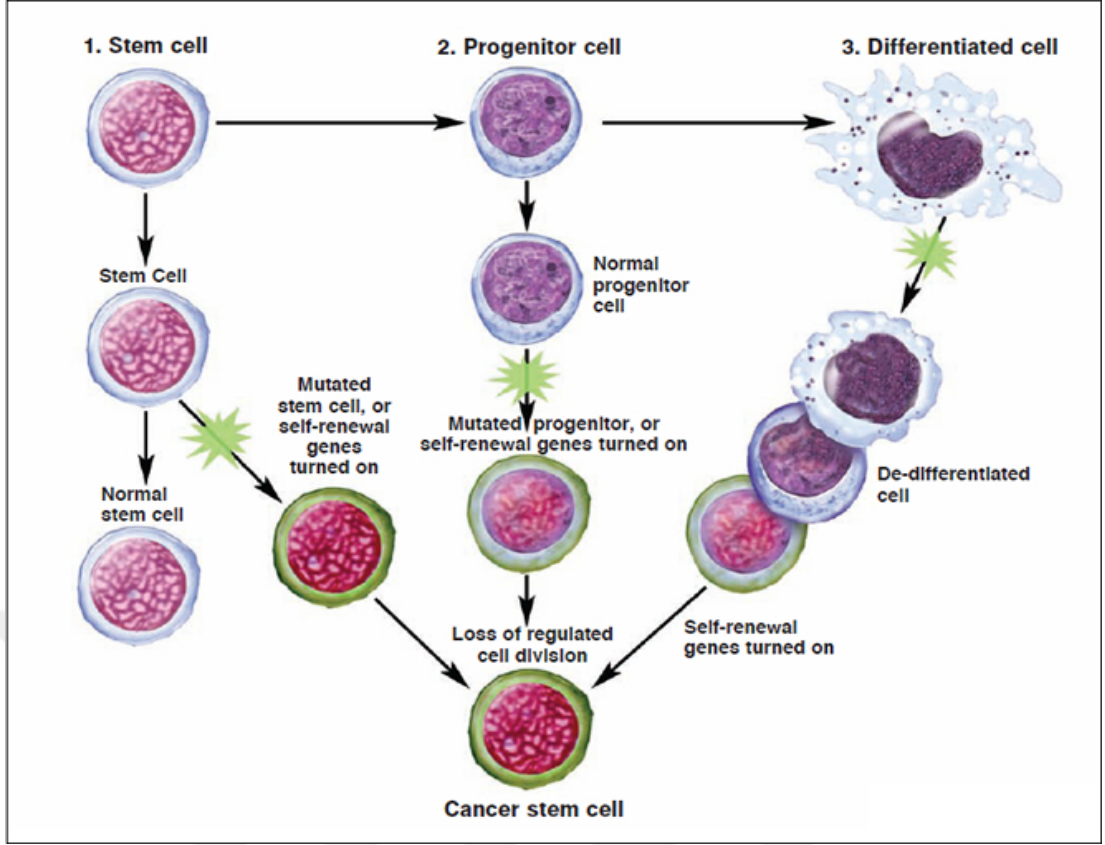
Şekil 5. Kanser kök hücre araştırmalarında dönüm noktalarını temsil eden zaman çizelgesi (O'Conner ve ark. 2014).

Bazı çalışmalar kanser kök hücreleri yerine “tümör başlatan hücreler” terimini kullanmayı tercih etmektedir (Shiozawa ve ark. 2013). Doku içindeki varlığını tanımlamak için de “kanserli kök hücre” terimi kullanılabilir (Nguyen ve ark. 2012). Araştırmacılar arasında kanser kök hücrelerin kaynağı konusunda tutarsızlıklar vardır. Aralarındaki benzerlikler göz önüne alındığında ise normal kök hücrelerin kanser kök hücreleri oluşumuna yol açan onkojenik başlangıç olması muhtemeldir (Tablo 3) (Nguyen ve ark. 2012).

Tablo 3. Kanser kök hücreleri ve normal kök hücreler arasındaki benzerlikler ve farklılıklar (Rahman ve ark. 2016).

A. Common features found in normal and cancer stem cells (Bapat et al., 2010)	
01	Capacity for asymmetric divisions (self-renewal) that produces a quiescent stem cell and a dedicated progenitor and plays important role toward emerging a dangerous cell mass.
02	Regulation of self-renewability by similar signaling pathways (Wnt, Sonic Hedgehog, MAPK and Notch) and at the epigenetic level by BMI-1.
03	Capacity to arrange a hierarchy of cellular derivatives that includes progenitors and differentiating cells.
04	Extended telomeres and telomerase activity that increases the cellular life span.
05	Predilection for growth factor independence through secretion of growth factors and cytokines.
06	Stimulation of angiogenesis through secretion of angiopoietic factors.
07	Expression of similar surface receptors (e.g., CXCR4, CD133, α6 integrin, c-kit, c-met, LIF-R) those are either identified as stem cell markers or are associated with homing and metastases.
B. Normal stem cell properties versus CSC properties (Topcul et al., 2013)	
Normal stem cell	Cancer Stem Cell
Extensive but limited self-renewal capacity	Extensive and indefinite self-renewal capacity
Organogenic capacity	Tumorigenic capacity
Highly regulated self-renewal and differentiation	Highly dysregulated self-renewal and differentiation
Rare in normal adult tissues	Infrequent or rare within tumors
Can be identified based on surface markers	Similar types of surface markers as ordinary stem cells in the same tissue
Normal karyotype	Abnormal karyotype
Quiescent most of the time	Less mitotically active than other cancer cells
Capacity to generate normal progeny with limited proliferative potential	Phenotypically diverse progeny

Kanser kök hücrelerinin kök hücrelere benzer özellikleri kök hücrelerden köken almaları varsayımı ile açıklanabildiği gibi klonal evrim modeli ile de öncü ya da farklılaşmış hücrelerden meydana gelen kanser hücrelerinin ilerleyen zamanlarda genetik ve epigenetik mutasyonlar nedeni ile kanser kök hücreleri özelliklerini kazanabilecekleri de düşünülmektedir (Can 2013) (Şekil 6).



Şekil 6. Kanser kök hücrelerin oluşmasını tanımlayan 3 hipotezin şematik gösterimi. Bu hipotezlere göre (1) Mutasyona uğramış kök hücreden, (2) bir ya da iki farklı mutasyona uğramış öncü (progenitör) hücreden ya da (3) meydana gelen birden fazla mutasyon ile kök hücre karakteristiğine geri dönmüş (dediferansiasyon) farklılaşmış bir hücreden kanser kök hücre oluşabilir (<http://stemcells.nih.gov> Erişim tarihi: 03.01.2020).

Normal dokuya benzer şekilde kanser kök hücreleri yoğun şekilde çoğalan bir hücre popülasyonu olan progenitör hücreleri verir. Normal progenitörler belirli sayıda bölümden sonra farklılaşır ve bölünme yeteneklerini kaybeder (terminal farklılaşma). Bununla birlikte, kanser öncü hücrelerinin çoğalma yeteneği çok daha yüksektir. Böylece, yavru hücre sayısı çok daha fazladır ve bu da tümör kitlesinde bir artışa yol açar (Sell 2009; Fulawka ve ark. 2014).

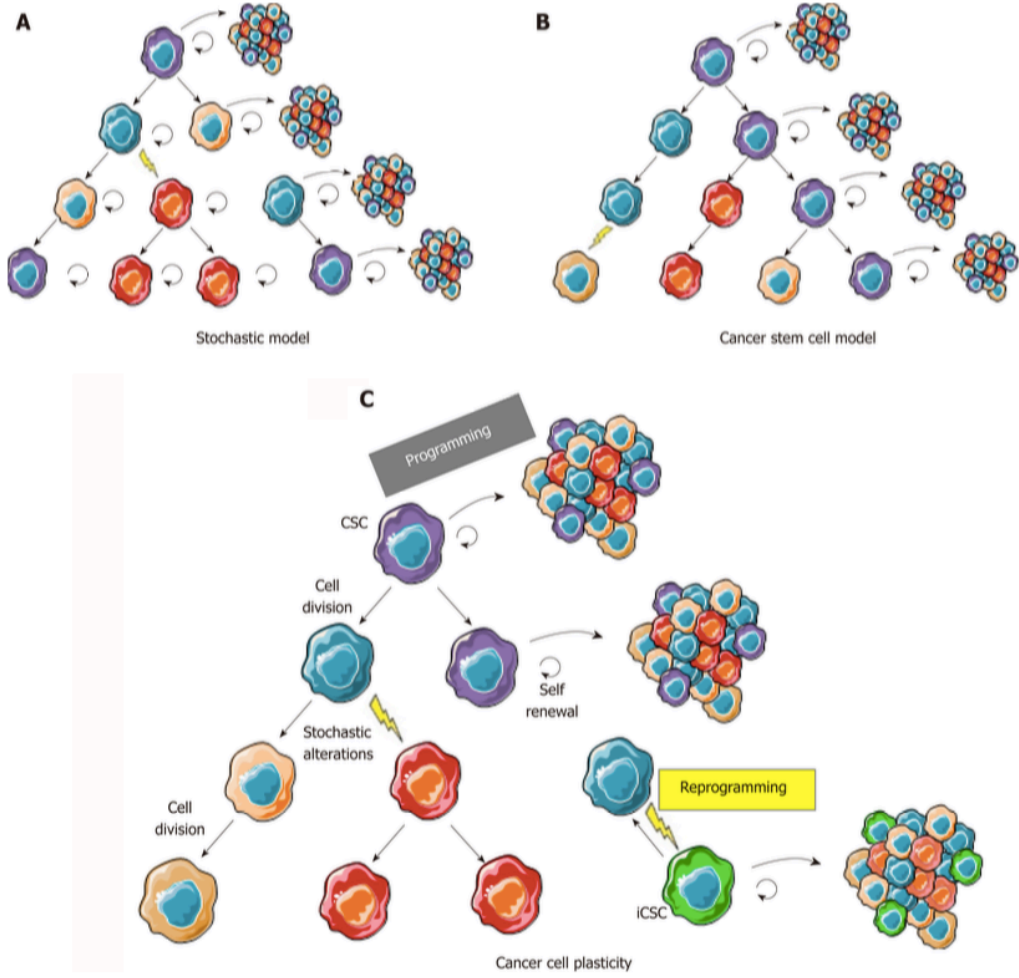
“Klonal evrim teorisi” kanser gelişimi ve yayılımını tanımlamak için 1970’lerde ortaya atılmıştır. Klonal evrim teorisine göre birkaç hücrede ya da tek bir hücrede meydana gelen gen düzeyindeki değişiklikler kontrolsüz proliferasyona neden olarak büyük kanser hücre toplulukları meydana getirmekte ve hastalık ortaya çıkmaktadır. Klonal evrim teorisi üzerine oturtulan çeşitli kanser kök hücre modelleri ile tümör

gelişimi ve ilerlemesi açıklanmaya çalışılmaktadır (Haydaroğlu ve ark. 2011) (Şekil 7).

- Stokastik (rastlantıya bağlı) modelde her bir kanser hücresi kanser kök hücresi özellikleri kazanmaya adaydır. Rastlantısal olarak meydana gelen mutasyonların birikmesi ile meydana gelen kanser kök hücresi asimetrik bölünerek kendi kendini yenileyebilir ve farklılaşmış yavru hücreleri meydana getirebilir (Gottschling ve ark. 2012).

- Hiyerarşik ya da deterministik olarak da tanımlanan kanser kök hücre modelinde kanser kök hücrelerinin tümör oluşturma kapasitesine sahip bir alt grup olduğu ve tümörün geri kalan hücrelerinin ise tümör oluşturma yeteneği olmayan hücrelerden oluştuğu varsayılmaktadır (Haydaroğlu ve ark. 2011).

- Kanser plastisite modelinde ise kanser hücrelerinin köklülük özellikleri hızlı bir şekilde değişmektedir. Kanser kök hücreleri, epigenetik değişiklikler ve kanser kök hücre/pluripotensi belirteçlerinin kapatılması ile kanser kök hücre olmayan hücrelere değişebilmektedir (Vincent ve ark. 2019)



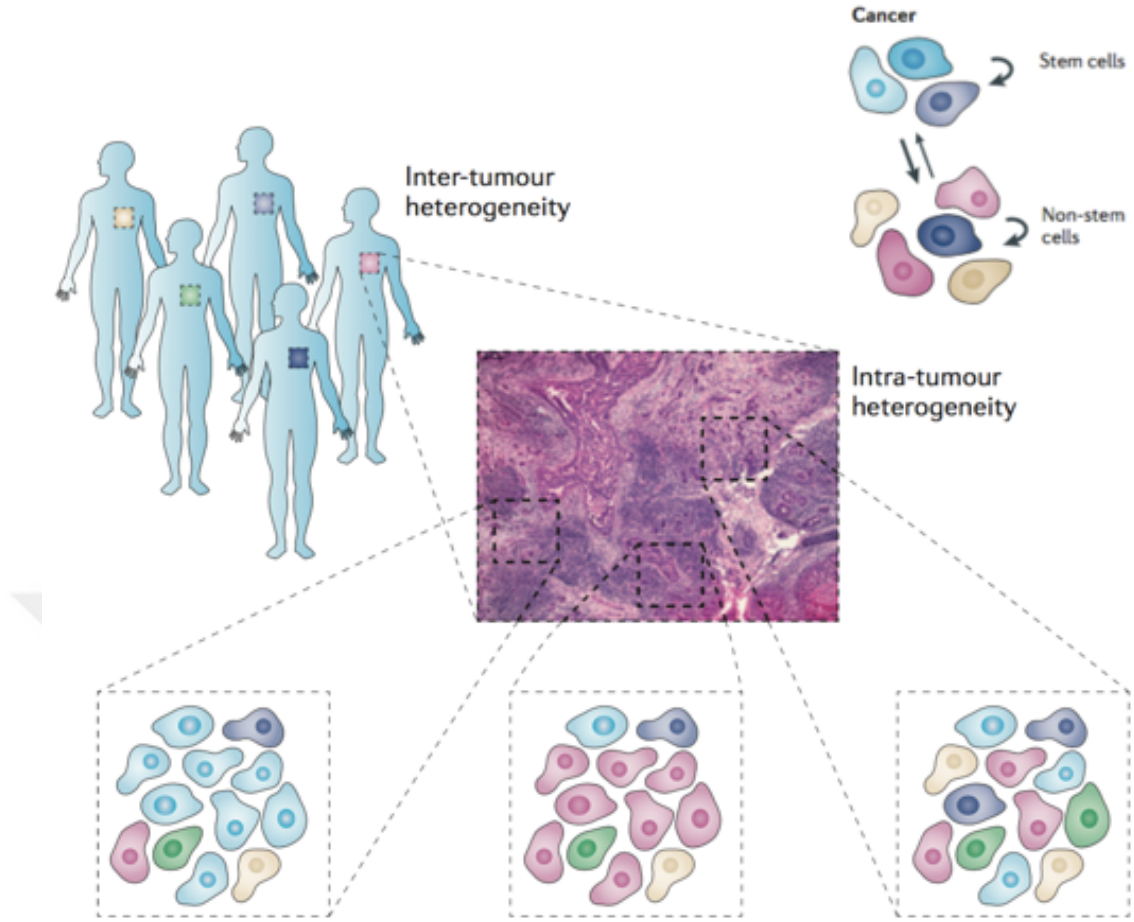
Şekil 7. Kanser kök hücre bağımlı tümörögenез modelleri. (A) Stokastik model (B) Kanser kök hücre modeli (C) Kanser plastisite modeli (Vincent ve ark. 2019).

Çoğu malign tümörün, neoplastik hücrelerin fenotipik olarak farklı birçok alt popülasyondan oluştuğu uzun yıllardır süren araştırmalarla kanıtlanmıştır (Shibue ve Weinberg 2017). Günümüzde, bir tümör içindeki neoplastik hücrelerin fenotipik çeşitliliği, tedaviye direnç geliştirilmesinde önemli bir etken olarak görülmektedir. Hem genetik hem de genetik olmayan (epigenetik) mekanizmaların yol açtığı biyolojik heterojenite, bağımsız tümörlerde bulunan kanser hücrelerinin farklı alt popülasyonları arasındaki fenotipik farklılıklara katkıda bulunur (Easwaran ve ark. 2014). Genom dizilim teknolojilerindeki gelişmeler, fenotipik değişim ve kanser hücrelerinin farklılaşması altında yatan genetik değişikliklerin tanımlanmasını sağlamaktadır (Garraway ve Lander 2013). Buna paralel olarak, çeşitli mutasyonların etkisinde kalmadan kanser hücrelerinin çoklu alternatif fenotipik durumlar arasında sık sık geçiş yapabilme kabiliyetleri ile ilgili kanıtlar da zaman geçtikçe artmaktadır.

Kanser hücrelerinin ve oluşturdıkları tümörlerin davranışlarına büyük ölçüde katkıda bulunan ve henüz büyük ölçüde keşfedilmemiş olan epigenetik düzenleyici mekanizmaların ortaya çıkarılması, kanser kök hücre gelişimini kontrol eden mekanizmaların tanımlanabilmesini ve hedef olarak kanser kök hücrelerin seçilimini sağlayacaktır (Shibue ve Weinberg 2017).

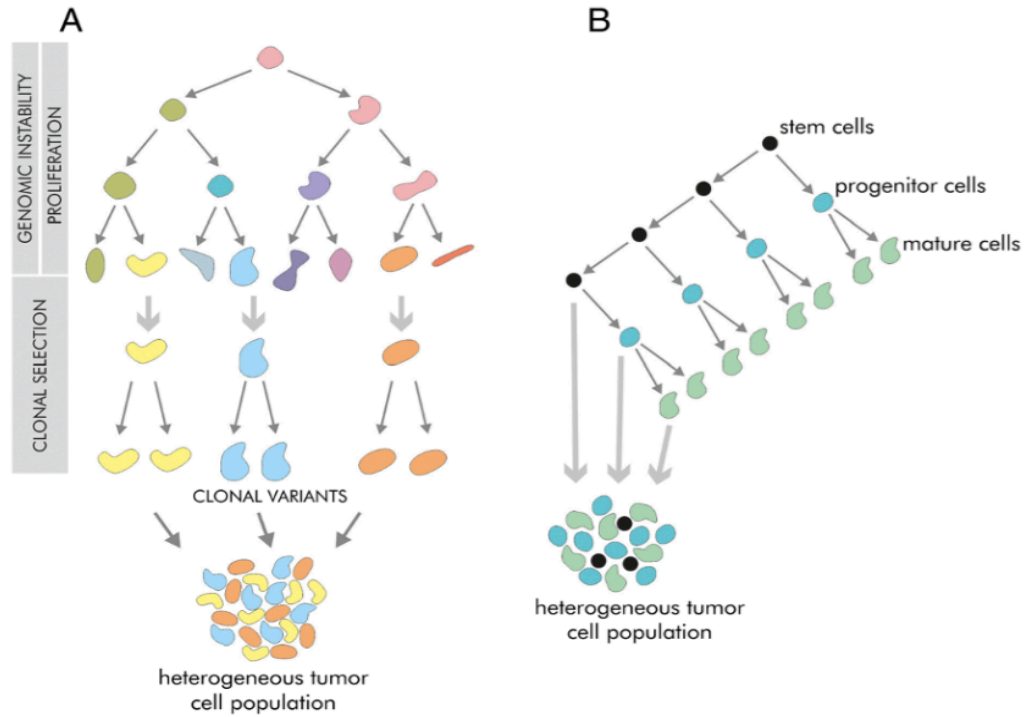
Histopatolojide maligniteyi tanımlamak için kullanılan terim olan **atipi** bir hücrenin fiziksel özelliklerinin normalin dışında olması durumunu tanımlamaktadır. Belli bir fenotipteki tümör hücreleri arasında da işlevsellik (örneğin: yüzey antijenlerinin ve sitoplazmik proteinlerin ekspresyonu, biyokimyasal süreçlerin aktivitesi, proliferasyon oranı, metastaz oluşumu, neo-anjiyogenezin aktivasyonu, sistemik tedaviye direnç) açısından da farklılıklar bulunabilir (Marusyk ve Polyak 2010). Tümör heterojenliğinden sorumlu anahtar faktörler genomik heterojenite, tümör dokusunun hiyerarşik organizasyonu, çevresel etkiler ve rastgele süreçlerdir (Marusyk ve ark. 2012; Saunders ve ark. 2012).

Genomik heterojenite; genomik instabilite ve artan proliferasyon oranından kaynaklanmaktadır (Marusyk ve Polyak 2010; Marusyk ve ark. 2012). Mutasyona uğramış hücreler, daha iyi hücreleri tercih eden Darwin'in evrim mekanizmalarına göre doğal seçimden geçer. Bu hücreler daha uzun yaşar ve soyundan gelen hücrelerin oluşumunu sağlamaktadır. Yeni klonlar tümör büyüdükçe üretilir ve bu nedenle tümör kitlesi klonal varyantlardan oluştuğu için heterojendir (Saunders ve ark. 2012). Kanser kök hücre modeli, tümör dokusunun hiyerarşik olarak organize olduğunu varsaymaktadır. Kanser kök hücre popülasyonu tümör büyümesinden ve ilerlemesinden sorumludur (Şekil 8). Bu açıdan heterojenlik, olgunlaşmanın farklı aşamalarında bulunan hücrelerin varlığı anlamında açıklanabilmektedir (Marusyk ve ark. 2012).



Şekil 8. Bir tümör içerisindeki kanser hücrelerinin heterojenitesi (Marusyk ve ark. 2012).

Yukarıda bahsedilen kanser kök hücre modelleri tümör gelişimi ve ilerlemesinin yanı sıra, tümör heterojenliğine yol açan temel mekanizmaları da tanımlamaktadır (Şekil 9). Normal doku gibi, tümör hücreleri de mikroçevreden (stromal hücreler, hücre dışı matriks gibi) etkilenmeye eğilimlidir. Normal doku ve tümör doku arasındaki temel farklılık, tümör dokusuna ait mikroçevrenin kanser hücresi tarafından kontrol ediliyor olmasıdır. Çok çeşitli mikroçevresel etkiler tümör hücresi heterojenliğine katkıda bulunur (Marusyk ve ark. 2012).



Şekil 9. Tümör heterojenite modelleri (A) Klonal evrim modeli (B) Kanser kök hücre modeli (Fulawka ve ark. 2014).

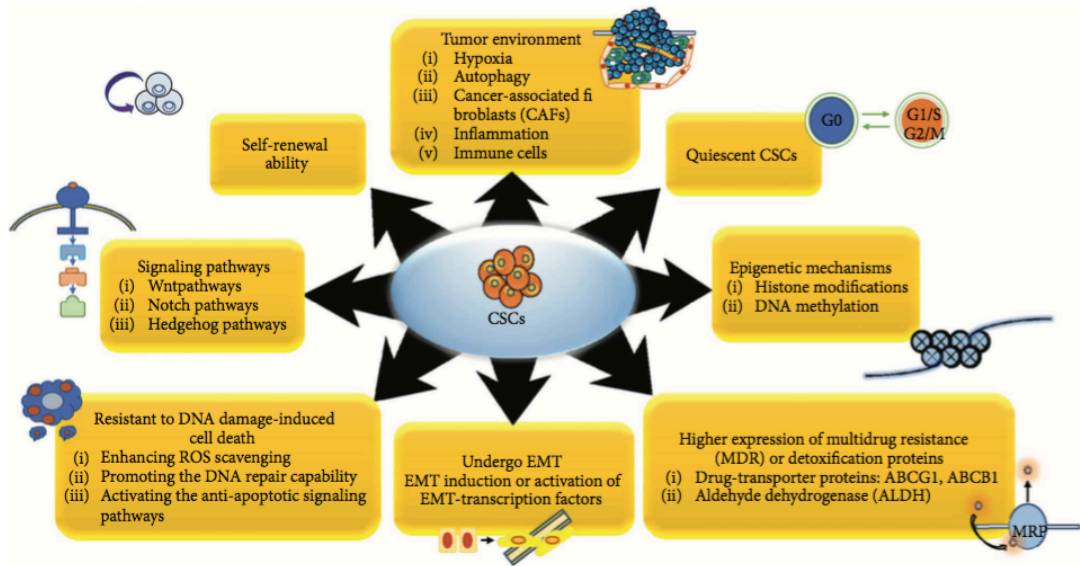
Dedifferansiasyon göstermiş ve tümörleri oluşturabilen küçük bir grup kanser hücresi popülasyonunun varlığını ortaya koyan “kanser kök hücreleri kavramı”nın ortaya atılması ile epigenetik düzenleyici mekanizmaların, farklı kanser hücrelerinin farklı alt popülasyonlarının fenotipik çeşitliliğine nasıl katkıda bulunabileceği hakkında yeni bilgiler sağlamıştır (Shibue ve Weinberg 2017). Bu kavram, aynı tümör kitlesinde bulunan ve fenotipik açıdan farklı kanser hücrelerinin kök hücre hiyerarşisine benzeyen bir hiyerarşide organize olduğu fikrine dayanmaktadır (Avgustinova ve Benitah 2016). Buna göre bir tümör kitlesinde tanımlanmış kanser kök hücrelerinin; yeni kanser kök hücreleri üretmek için kendi kendilerini yenilemeleri ve tümörün büyük kısmını oluşturduğu düşünülen, kanser kök hücreleri olmayan, daha az tümörojenik ve kendi kendini yenileyemeyen soyları ortaya çıkarmaları gerekmektedir. Bu paradigmada tümör büyümesini sürdüren, tedaviden sonra metastaz oluşumunu ve nüksü sağlayan hücreler kanserlerin nadir bir alt grubu olarak belirtilebilir ve kanser kök hücreleri olarak tanımlanabilir (Shibue ve Weinberg 2017). Kanser kök hücreleri kavramının geniş uygulanabilirliğini gösteren birçok insan kanser türünü kapsayan çalışmalar ile de kanser kök hücrelerinde kendi içerisinde çeşitli alt popülasyonları tanımlanmıştır (Kreso ve Dick 2014).

Kanser kök hücresi kavramının, kanser kök hücrelerinin oluşturdukları mikroçevre ile tedaviden kaçışı sağladıkları ve bu nedenle geleneksel anti-kanser tedavilerinin etkinliğinin neden sınırlı kaldığını açıkladığı düşünülmektedir (Diehn ve ark. 2009). Özellikle bu kaçış mekanizmaları ile kanserin nüksünde esas görev aldıkları söylenebilir. Bu veriler doğrultusunda kanser kök hücrelerini diğer hücrelerden (normal ve kanser kök hücresi olmayan) ayıran genetik ve epigenetik mekanizmaların anlaşılması çok önemlidir. Özellikle hücreye odaklı tedavi seçeneklerinin olduğu, kanser tipi, yapısı, kişiye özel faktörler göz önüne alındığında bu mekanizmaların açıklanması etkin tedaviyi belirlemede önemli olacaktır (Shibue ve Weinberg 2017).

Kanser kök hücreleri sahip oldukları bazı spesifik özellikleri ve bu özellikleri ortaya çıkaran sinyal yolları ile kendi kendilerini yenileyebilmekte, ilaç direnci sağlayabilmekte, kanser nükslerine ve metastazlarına neden olabilmektedirler. Bu özelliklerin en başında epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) gelmektedir (Şekil 10). EMT, epitel hücrelerin özelliklerini değiştiren ve embriyonik gelişim sırasında onları mezenkimal hücre benzeri fenotiplere dönüştüren bir süreçtir (Nieto ve ark. 2016). Embriyonik gelişime ek olarak, EMT aktivasyonu kök hücre oluşumu, yara iyileşmesi ve kanser ilerlemesini içeren süreçler için de çok önemlidir, çünkü hücreler EMT sonrasında hareketlilik ve invazivlik kazanırlar (Nieto ve ark. 2016; Shibue ve Weinberg 2017). EMT ilerlemesi sırasında epitelyal hücreler, sıkı bağlantı kompleksleri, desmozomlar ve hemidesmozomlar gibi adezyon moleküllerini kaybederek apikal bazal polarite kaybına yol açmaktadırlar (Grigore ve ark. 2016; Shibue ve Weinberg 2017). Bununla birlikte EMT esnasında, E-kaderin gibi epitelyal hücre belirteçlerinin azaldığı, N-kaderin, vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin arttığı gösterilmiştir (Shibue ve Weinberg 2017). EMT'nin en yaygın indükleyicisi, yeterli besin ve oksijen elde etmek için yeni vasküler ağların oluşturulması anlamına gelen anjiyogenezi indükleyen TGF- β olarak kabul edilmektedir (Papageorgis 2015; Banyard ve Bielenberg 2016). Diğer kritik EMT indükleyicileri VEGF, IGF, Wnt ve Notch olarak sayılabilir (Jiang ve ark. 2011). Çalışmalar ayrıca TGF ile aktive olan EMT'nin SMAD ve kemik morfogenezik protein (BMP) gibi transkripsiyon faktörlerinin salgılanması ile desteklendiğini göstermiştir (Mitra ve ark. 2015).

Kanser kök hücrelerinin kemoterapi sırasında sessiz kalma özelliği göstererek tedavi sonrasında kanser dokusunu yeniden ortaya çıkardıkları düşünülmektedir (Clevers, 2011). Dinlenme/sessiz kalma (dormansi), tümör hücrelerinin tümör

ilerlemesi sırasında veya tedavi sonrasında gizli ve tespit edilemediği bir saklanma durumu olarak kanser kök hücrelerinin en önemli özelliklerinden biridir (Tabassum ve Polyak, 2015). Kanser kök hücreleri tarafından elde edilen direnç genellikle DNA onarım mekanizması için yüksek kapasite ve aktif oksijen türlerine karşı artan koruma ile düzenlenmektedir. Çalışmalar, TGF- β 'nın kemoterapi sırasında korunması ve tedaviden sonra tümörün başlamasına katkıda bulunmak için meme kanseri kök hücrelerinin proliferasyon oranını azaltmada hayati bir rol oynadığını göstermiştir (Bragado ve ark. 2013; Batlle ve Clevers, 2017). Geleneksel tedavilerin hızla çoğalan dokularda, daha sonra kaybedilen kök hücrelerin yerini alabilecek ve kanser nüksetmesine neden olabilecek dormansi durumunda olan kanser kök hücreleri yerine yüksek proliferatif farklılaşmış hücreleri hedeflediği gösterilmiştir. Ayrıca, tedaviye dirençli kanser kök hücrelerinin, transmembran proteinleri ABC ailesinin artması ile elde edilen anti-mitotik ilaçlara karşı yüksek direnç ile karakterize olduğu da ortaya konulmuştur (Shibue ve Weinberg, 2017). Bazı çalışmalar ile de radyoterapinin çeşitli kanser türlerinde TGF- β sinyalini aktive ederek EMT'yi indükleyebileceği ve metastazı tetikleyebileceği de vurgulamaktadır (Mitra ve ark. 2015; Chi ve ark. 2017; Kuşoğlu ve Avcı 2019).



Şekil 10. Kanser kök hücrelerinin tedaviden kaçabilme ve nükslere sebep olabilme yetenekleri altında yatan mekanizmalar (Phi ve ark. 2018).

Günümüzde klinik tedavi yaklaşımları, malign kanser hücrelerinin eşit varlığı hastalığın seyrinin kötü olma potansiyeli varsayımı altında çalışmaktadır (Kozovska

ve ark. 2014). Bununla birlikte, kanser kök hücreleri anti-neoplastik tedaviye daha dirençli ve metastaza meyilli olma potansiyellerinden dolayı kanser kök hücrelerini ortadan kaldıramayan terapötik yaklaşımların başarısız olması beklenen bir sonuçtur. Bu nedenle, tedavi seçiminde kişiye özel, dokuya özel, moleküler mekanizmalara özel ve de özellikle kanser kök hücreleri alt popülasyonunu hedef alacak yeni ve daha etkili anti-tümör tedavileri tercih etmek gerekmektedir (Zeimet ve ark. 2012; Kozovska ve ark. 2014).

4.3. KOLON KANSERİ KÖK HÜCRELERİ

Kanser kök hücrelerinin farklı dokularda farklı belirteçleri vardır. Bu nedenle kanser kök hücrelerinin karakterizasyonu ve izolasyonunda kaynak olan dokuya ait kanser kök hücrelerine özgü yüzey belirteçlerinin bilinmesi gerekmektedir. Kolon kanseri ile ilgili yapılan çalışmalar CD133, CD44, CD29, CD166 ve Lgr5 gibi hücre yüzey belirteçlerinin kolon kanser kök hücreleri için spesifik olduğunu göstermiştir (Tablo 4) (Phi ve ark. 2018).

Tablo 4. Farklı tümörlere ait kanser kök hücre belirteçleri (Phi ve ark. 2018).

Tumor type	Cancer stem cell markers
Lung cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , ABCG2, ALDH, CD87 ⁺ , SP, CD90 ⁺
Colon cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , CD166 ⁺ , EpCAM ⁺ , ALDH, ESA
Liver cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD49f ⁺ , CD90 ⁺ , ALDH, ABCG2, CD24 ⁺ , ESA
Breast cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁻ , EpCAM ⁺ , ALDH-1
Gastric cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁺
Leukemia (AML)	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD123 ⁺
Prostate cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , $\alpha 2\beta 1$, ABCG2, ALDH
Pancreatic cancer	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ABCG2, ALDH, EpCAM ⁺ , ESA
Melanoma	ABCB5 ⁺ , CD20 ⁺
Head and neck cancer	SSEA-1 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺

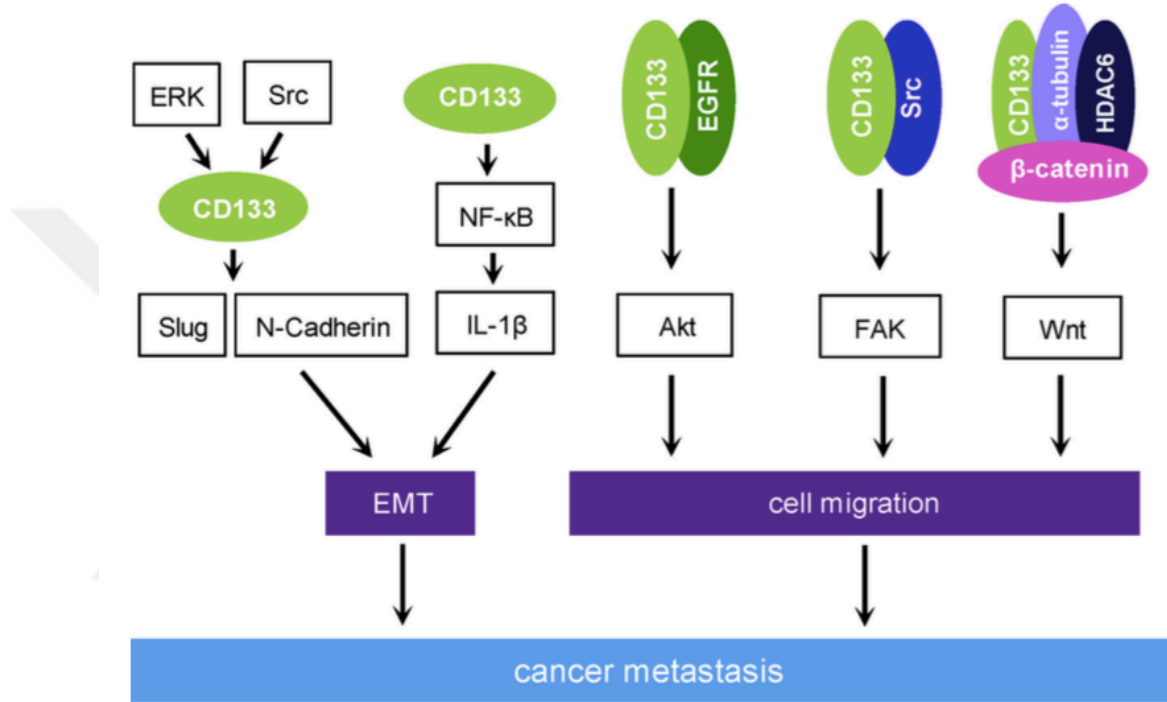
Yapılan çalışmalar ile insan kolorektal kanserlerinde, kolorektal kanser kök hücrelerinin varlığına dair kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. CD133 yüzey belirteci kullanılarak, insan kolon kanserlerinden elde edilen CD133⁺ kanser hücrelerinin çoğalabildikleri, kendi kendilerini yenileyebildikleri ve tümör oluşumunu indükleyebildikleri gösterilmiştir. CD133⁺ hücrelerin, bir yıldan fazla bir süre farklılaşmadan kaldıkları ve orijinal tümöre fenotipik olarak benzer olan *in vivo*

tümörleri başlatabildikleri bildirilmektedir. Literatürdeki çeşitli çalışmalar CD133+ hücrelerin tümör oluşturabilme kapasitelerinin olduğunu gösterirken aynı zamanda CD133- hücrelerin tümör başlatamadıklarını göstermektedir. Ayrıca CD133^{yüksek} hücre popülasyonlarının, CD133^{-düşük} hücrelerden çok daha agresif fenotip sergilemesi, CD133 artışlarının tümörleşme yeteneğinin ve metastazın bir işareti olarak kabul edilmesine neden olmaktadır. Ek olarak, CD133+ tek hücreli klinik tümör kaynaklı kültürlerin çoklu farklılaşma potansiyeline sahip olduğu ve *in vivo* olarak tümör başlatma yeteneğine sahip oldukları da gösterilmiştir. CD133'ü aşırı eksprese eden tümörler 5-FU temelli kemoterapiye daha dirençli olmakta ve CD133 ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Kozovska 2014).

CD133 ilk olarak insan hematopoietik ve progenitor hücrelerinde bulunmuştur (Miraglia ve ark. 1997; Yin ve ark. 1997). Birçok çalışma birçok kanser türünde CD133'ün yüksek protein seviyelerinin varlığına işaret etmektedir. Yüksek oranda ifade edilen CD133; over kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri, rektal kanser, akciğer kanseri ve glioblastoma hastalarının kötü prognozlarına işaret etmektedir (Alamgeer ve ark. 2013; Wu ve ark. 2014; Huang ve ark. 2015). Bunun nedeni, yüksek seviyelerde CD133 eksprese eden kanser hücrelerinin daha metastatik olması ve kemoterapi ya da radyasyon terapilerine karşı dirençli olmasıdır. CD133+ hücrelerin kök hücre özellikleri olarak bilinen kendi kendini yenileme, çoğalma ve farklı hücre tiplerine farklılaşabildiği göz önüne alındığında CD133+ kanser hücrelerinin kanser kök hücreleri olduğu anlaşılmaktadır (Liou 2019).

Hastalardan izole edilmiş CD133+ kanser hücrelerinin, bağışıklık içeren ksenograft farelerinde kanser oluşturabildiği gösterilmiştir. İnsan kolon kanseri başlatan hücreleri tanımlamak için immün yetersiz farelerde renal kapsül transplantasyonu kullanıldığında, sadece CD133+ kolon kanseri hücreleri *in vivo* tümör büyümesini başlatabilmiş, ancak CD133- kolon kanseri hücreleri başlatamamıştır (O'Brien ve ark. 2007). Bu çalışma ile CD133+ kolon kanseri hücrelerinin kolon kanseri başlatan hücreler olduğu ileri sürülmüştür. Bahsedilen ksenograft NOD/SCID fare modelinden saflaştırılan tüm kolon kanseri başlatan hücrelerin CD133'ü eksprese ettiği de gösterilmiştir (O'Brien ve ark. 2007). Ayrıca, kolon kanseri metastazı gelişimi sırasında transgenik bir fare modelinde endojen CD133+ hücrelerini izlemek için soy izleme tekniği kullanıldığında, CD133'ün kolon kanseri epitelinde eksprese edildiği de bulunan sonuçlar arasındadır (Shmelkov ve ark. 2008).

Yapılan bütün çalışmalar sonucunda kolon kanseri oluşumunda ve metastazının başlangıcında CD133'ün önemli rolü ortaya çıkarılmıştır. SW620 insan kolon kanseri hücrelerinde, CD133'ün degradasyonu ile, Src-fokal yapışma kinazın (FAK) fosforilasyonunun azaldığı ve hücre göçünün bozulduğu da gösterilmiştir. Ayrıca, CD133 ve Src arasındaki etkileşim, Src'nin gerçekleştirdiği FAK aktivasyonu ile indüklenen hücre motilitesi için gereklidir (Şekil 11) (Liu ve ark. 2016; Liou 2019).



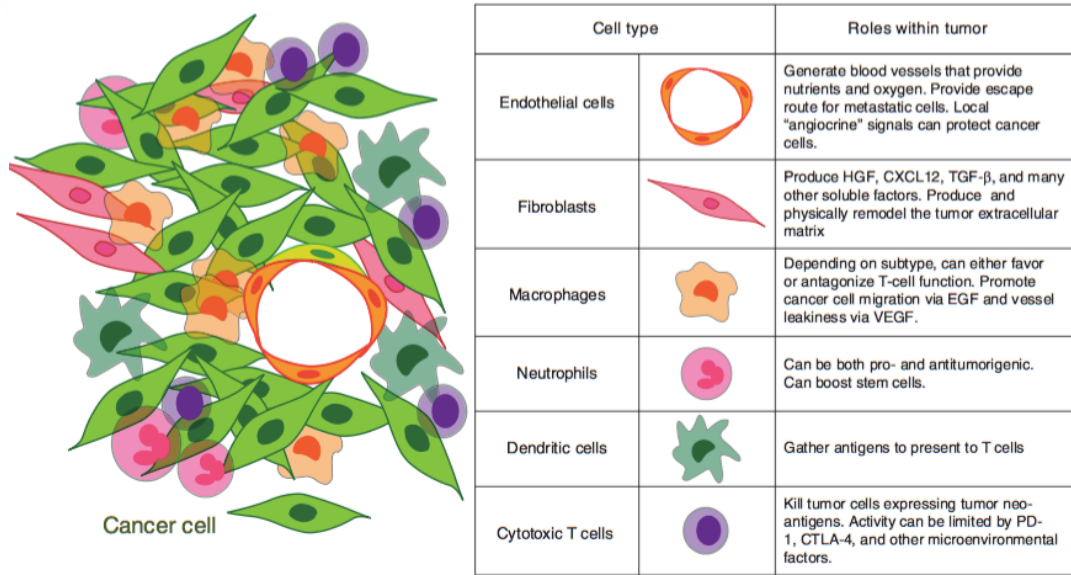
Şekil 11. CD133 tarafından düzenlenen EMT, kanser hücre göçü ve metastazı ile ilişkili hücre sinyal yolları (Liou 2019).

4.4. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ

Kanser hücreleri çevrelerinde bulunan mikroçevre ya da niş adı verilen doku ile sarılıdır. Bu doku kanser hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücresel elemandan ve hücre dışı komponentlerden oluşmaktadır. Tümör mikroçevresi ya da kanser nişi olarak adlandırılan bu dokunun; kanser gelişimi, metastazı ve ilaç direnci ile doğrudan ilişkili olduğuna dair kanıtlar her geçen gün artmaktadır. Tümör mikroçevresi; kanser hücrelerinin büyümesini, farklılaşmasını ve metastatik özellik kazanmasını sağlayan stroma olarak da tanımlanmaktadır. Bu mikroçevre kanser gelişimi ve metastazı için kritik olan, kendine özgü ekstrasellüler matriksi, çeşitli

salgılanan faktörleri, kanser-ilişkili fibroblastları ve kanser-ilişkili makrofajları içermektedir. Kanser mikroçevresini anlamak için kanser mikroçevresini oluşturan spesifik bileşenlerin bilinmesi, bu bileşenlerin hangi mekanizmaları kullanarak iletişim kurduklarının anlaşılması önemlidir (Hirata ve Sahai 2017).

Tümörler; fibroblastlar, vasküler endotelial hücreler, T hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller gibi somatik hücreleri içermektedir (Şekil 12). Birçok durumda, organa spesifik örneğin kemik dokusunda osteoblastlar, merkezi sinir sisteminde astrositler gibi interstisyel hücreler de mevcuttur. Bu hücreler ile birlikte hücre dışı matris, oksijen seviyeleri ve pH gibi faktörler tümör mikroçevresinin bileşenlerini oluştururlar (Hanahan ve Coussens 2012).



Şekil 12. Tümör mikroçevresinin temel hücresel komponentleri ve tümör içerisindeki ana rolleri (Hirata ve Sahai 2017).

Endotel hücreleri tümörün kan damarlarını oluşturur ve oksijenin, besin maddelerinin ve ilaçların tümöre ulaşması için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, metabolik atık ürünler ve metastatik kanser hücreleri için bir çıkış yolu sağlarlar (Reymond ve ark. 2013). Normal vaskülaritenin aksine, tümör damarları genellikle tümör oksijenizasyonunda ve diğer çevresel faktörlerde lokal değişikliklere yol açarlar (Harney ve ark. 2015; Eales ve ark. 2016). Oksidatif fosforilasyondan glikolize geçişin, kanser hücrelerinin hipoksik koşullarda hayatta kalabilmeleri için kullandıkları stratejilerinden biri olduğu düşünülmekte (Gatenby ve Gillies 2004) ve

hücre proliferasyonun sağlanması için nükleik asitler ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) üretmek için de avantajlı olarak çalışmaktadır (Vander Heiden ve ark. 2009). Bu mekanizmanın bir yan ürünü olan laktat seviyelerinin artması ve düşük hücre dışı pH, bir tümör özelliği olarak karşımıza çıkmaktadır (Damaghi ve ark. 2015).

Rezidüel doku fibroblastları, perisitler ve mezenkimal kök hücreleri içeren fibroblastik hücreler de tümörlerde aktive olmaktadır. Kanseri ilişkili fibroblastlar olarak adlandırılan aktive fibroblastlar, tümör içindeki hücre dışı matriksin çoğunu üretir ve yeniden şekillendirir (Hanahan ve Coussens 2012; Hirata ve Sahai 2017).

Hücrelerin yanı sıra ekstrasellüler matriks elemanları da tümör mikroçevresini organize eden önemli moleküllerdir ve hücre davranışı ile gelişimsel süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, ekstrasellüler matriks kompozisyonu ve organizasyonunun değişikliklerinin kanser hücrelerini ve stromal hücreleri nasıl etkileyebileceğini belirlemek önemlidir. Tümör mikroçevresinde bulunan ekstrasellüler matriks kanser olmayan dokulardaki ekstrasellüler matriks ile karşılaştırıldığında, kanser ya da kanser ilişkili hücreler tarafından salgılanan proteazlar ile değiştirildiği, kollajen miktarının azaldığı ve kanser hücrelerinin hücrelerin polarizasyonu ile stabilitesi açısından avantajlı hale gelecek şekilde düzenlendiği görülmektedir (Lu ve ark. 2012).

Kanseri olmayan hücrelerin yanı sıra kanser hücreleri de tümör mikroçevresinin önemli komponentlerindendir. Intra-tümör dokusunun heterojenliğinden kaynaklı olarak bir tümör mikroçevresindeki kanser hücreleri farklılaşmış kanser hücreleri, progenitör kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri olarak ayrı ayrı ele alınmalıdır (Fulawka ve ark. 2014).

Kök hücrelerin normal organlarda lokalizasyonu tanımlanmıştır ve mikroçevrenin kök hücrelerin köklülük özelliği bakımından kritik olduğu öne sürülmektedir. Normal organlarda gözlemlendiği gibi, kanser kök hücreleri de belirli odaklarda lokalize olabilir ve hücre hayatta kalma sinyalleri tümör mikroçevresi tarafından sağlanabilmektedir. Kanseri tedavi etmek için kanser kök hücrelerinin hedeflenmesi, dolayısı ile de kanser kök hücreleri mikroçevresinin düzenlenmesi bu hücrelerin hayatta kalmasını önlemek için önemli bir tedavi stratejisi olarak tanımlanmaktadır (Kise ve ark. 2016).

Barsak kök hücreleri, lokalizasyonu iyi karakterize edilmiş hücrelerdir (Barker ve ark. 2010) İnce ve kalın barsağın fonksiyonel birimine **kript** denir. Bağırsak kök

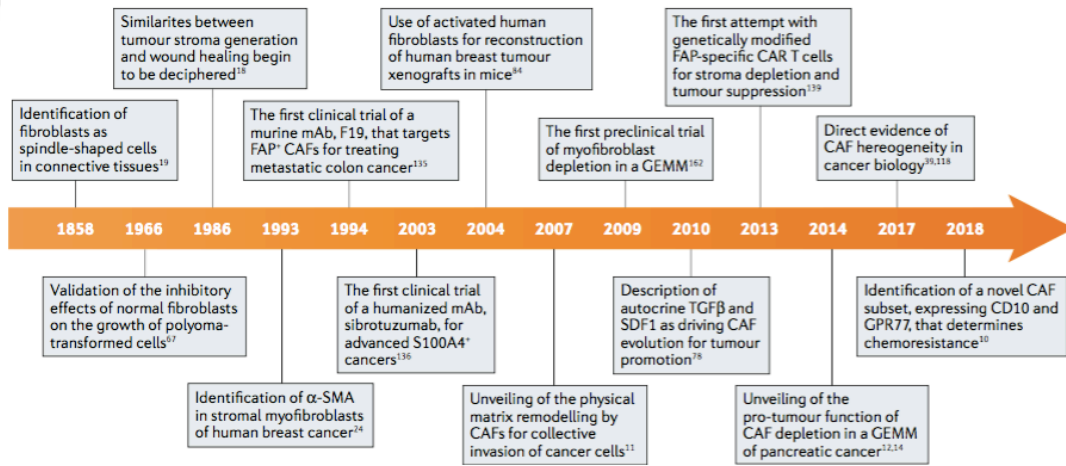
hücreleri kriptin alt kısmında lokalize olur ve epitelyal hücrelerin ve miyofibroblastların yakınında Wnt sinyal yollarının aracılık ettiği bir mekanizma ile kendini yeniler (Brabletz 2001). Kanseri kök hücrelerinin barsak kanserlerinde lokalizasyonu tam bilinmemesine rağmen, miyofibroblastların ve mezenkimal kök hücrelerin bu kanserde nişin bileşenleri olduğu belirtilmektedir. Miyofibroblastlardan salgılanan hepatosit büyüme faktörünün (HGF) kanser kök hücrelerinde Wnt sinyalini arttırdığı (Vermeulen ve ark. 2010), ayrıca, kemik iliğinden tümör mikroçevresine alınan fibrositlerden farklılaşan miyofibrositlerin de matriks metaloproteinaz (MMP) -2 ve -9'u eksprese ederek kanser kök hücrelerinin metastazını desteklediği ileri sürülmüştür (Quente ve ark. 2011; Kise ve ark. 2016).

Sonuç olarak yapılan çalışmalar, tümör hücreleri, stromal hücreler ve ekstrasellüler matriks arasında birbirlerini kontrol eden, özellikle de kanser hücresi için bir mikroçevre hazırlayan bir etkileşim ortaya koymaktadır. Son on yılda, kanser hücrelerinin, inflamatuvar hücrelerin, endotel hücrelerinin ve fibroblastik hücrelerin etkileşime girdiği mekanizmalar hakkındaki bilgiler artmıştır. Tümör hücresi-stromal hücre etkileşimlerinin ve tümör hücresi-ekstrasellüler matriks ilişkisinin, bu düzeni sağlayan ve koruyan faktörlerin karmaşıklığı nedeni ile etkin kanser tedavilerinin etkinliğinin sağlanabilmesi için iyi anlaşılması gerekmektedir. Klasik kemoterapi ve radyoterapinin, tümör mikroçevresini hedef alan anti-inflamatuvar ve anti-anjiyogenik stratejilerle kombinasyonu, uzun süreli başarıya ulaşmak için gerekli görülmektedir. Yeni tedavi seçenekleri geliştirilmesinde kanser hücrelerinin davranışlarını etkileyen stromal hücreler ile ekstrasellüler matriks komponentlerinin de dikkate alınması önemlidir (Sounni ve Noel 2013).

4.5. KANSER İLİŞKİLİ FİBROBLASTLAR

Normal fizyolojik koşullar altında, kontraktil olmayan fibroblastlar genellikle yassı, iğ şeklindedir ve ekstrasellüler matrikste inert hücreler olarak bulunur (Valkenburg ve ark. 2018). Kontraktil olan miyofibroblastlar ise ilk olarak dokularda yara onarım süreçlerinde tanımlanmışlardır ve fibroblastlardan ya da düz kas hücrelerinden farklılaşarak sitoplazmasında aktin ve miyozin birikimi ile fibroblastlardan ayrılır. Miyofibroblastların yara iyileşmesindeki ana rolleri kasılarak yara yerinin kapanmasını desteklemek ve ekstrasellüler matriks moleküllerini üreterek yeniden organize etmektir (Darby ve ark. 2014). Miyofibroblastlar, oldukça

aktif endoplazmik retikulum varlığı ve alfa düz kas aktinin (α -SMA) ile vimentinin artmış seviyeleri ile karakterize edilirler (Tablo 5). Miyofibroblastlardaki mikrofilament demetleri, ekstrasellüler matriks proteinleriyle adezyon kompleksleri vasıtasıyla etkileşime girerek, miyofibroblastların mikroçevredeki gerilimi algılamasına ve hücre iskeleti proteinleri ağı boyunca hücresel kasılma kuvvetini sürdürmesine izin verir. Geri bildirim tepkisi olarak miyofibroblastlar; kollajen, elastin (ELN), fibronektin (FN1), tenascin (TNC) ve MMP'ler dahil olmak üzere remodeling enzimleri ve çeşitli ekstrasellüler matriks proteinlerini üreterek matriks fibroplazisini arttırırlar (Liu ve ark. 2019) (Şekil 13). Yara kapanıp iyileştikçe myofibroblastlar apoptotik süreç ile birlikte kaybolur (Darby ve ark. 2014).



Şekil 13. Normal ve kanser ilişkili fibroblastlar ile ilgili araştırmaların dönüm noktalarını temsil eden zaman çizelgesi (Chen ve Song 2019).

Tablo 5. Sıklıkla kullanılan kanser ilişkili fibroblastların belirteçleri, ekspresyon ve biyolojik fonksiyon özellikleri (Chen ve Song 2019).

Marker	Examples of other cells that express the marker	Expression level in CAFs	Biological functions	Cancer models with marker expression in CAFs	Refs
Cytoskeleton components and other cytoplasmic proteins					
α -SMA	Normal fibroblasts, pericytes, smooth muscle cells, visceral smooth muscle cells and cardiomyocytes	Upregulated (downregulated in prostate cancer)	Cell contractility, motility, structure and integrity	Pancreatic, liver and breast cancer	30,41,59
S100A4	Normal fibroblasts, epithelial cells undergoing EMT and macrophages	Upregulated	Cell motility, collagen induction and tissue fibrosis	Breast cancer and carcinogen-mediated malignancies	48,60,73,179
Vimentin	Endothelial cells, epithelial cells undergoing EMT and neurons	Upregulated	Cell motility, structure and integrity	Breast and prostate cancer	16,180
Desmin	Skin fibroblasts, pericytes and muscle cells	Downregulated	Cell contractility, motility, structure and integrity	None	129,181
Receptors and other membrane-bound proteins					
FAP	Reactive stromal fibroblasts, quiescent mesodermal cells and CD45 ⁺ immune cells	Upregulated	ECM remodelling and fibrogenesis	Over 90% of human cancers	61,130,182
PDGFR β	Normal fibroblasts, pericytes, vascular smooth muscle cells, skeletal muscles and myocardium	Upregulated	Receptor tyrosine kinase activity	Cervical and colorectal cancer	62,97,129
CAV1	Adipocytes, endothelial cells, normal fibroblasts and type I pneumocytes	Upregulated or downregulated	Scaffolding protein	Breast, gastrointestinal and prostate cancer	63,54,183
CD10	BMSCs, especially pre-B lymphocytes	Upregulated	Metalloendoprotease	Breast cancer	10,184
GPR77	Polymorphonuclear neutrophils	Upregulated	Complement activation and pro-inflammatory signalling	Breast cancer	10,66
ECM components					
Tenascin C	Cancer cells	Upregulated	Cell adhesion	Breast cancer and malignant glioma	108,160

α -SMA, α -smooth muscle actin; BMSCs, bone marrow stromal cells; CAFs, cancer-associated fibroblasts; CAV1, caveolin 1; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; FAP, fibroblast activation protein; GPR77, G protein-coupled receptor 77; PDGFR β , platelet-derived growth factor receptor- β .

Kanser ilişkili fibroblastlar kanser stromasında bulunan fibroblastlardır ancak farklı ekstrasellüler matriks protein üretmeleri ve pro-tümörojenik faktörleri salgılanmaları ile normal fibroblastlardan farklıdırlar (Pidsley ve ark. 2018). Gelişimlerinin açıklanması için; yerleşik fibroblastların aktivasyonu, yerleşik epitel hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT), yerleşik endotel hücrelerinin mezenkimal geçişi (EndMT), kanser hücrelerinin farklılaşması ve kemik iliği mezenkimal hücrelerinin farklılaşması gibi çeşitli hipotezler bulunmaktadır (Şekil 14) (Liu ve ark. 2019).

Başka bir deyişle, kanser ilişkili fibroblastlar tümör mikroçevresinde kronik yara iyileşme sürecine benzer şekilde gelişen bir tür miyofibroblastlardır. Kanser ilişkili fibroblastların büyük bir kısmı α -SMA pozitifdir (Shiga ve ark. 2015).

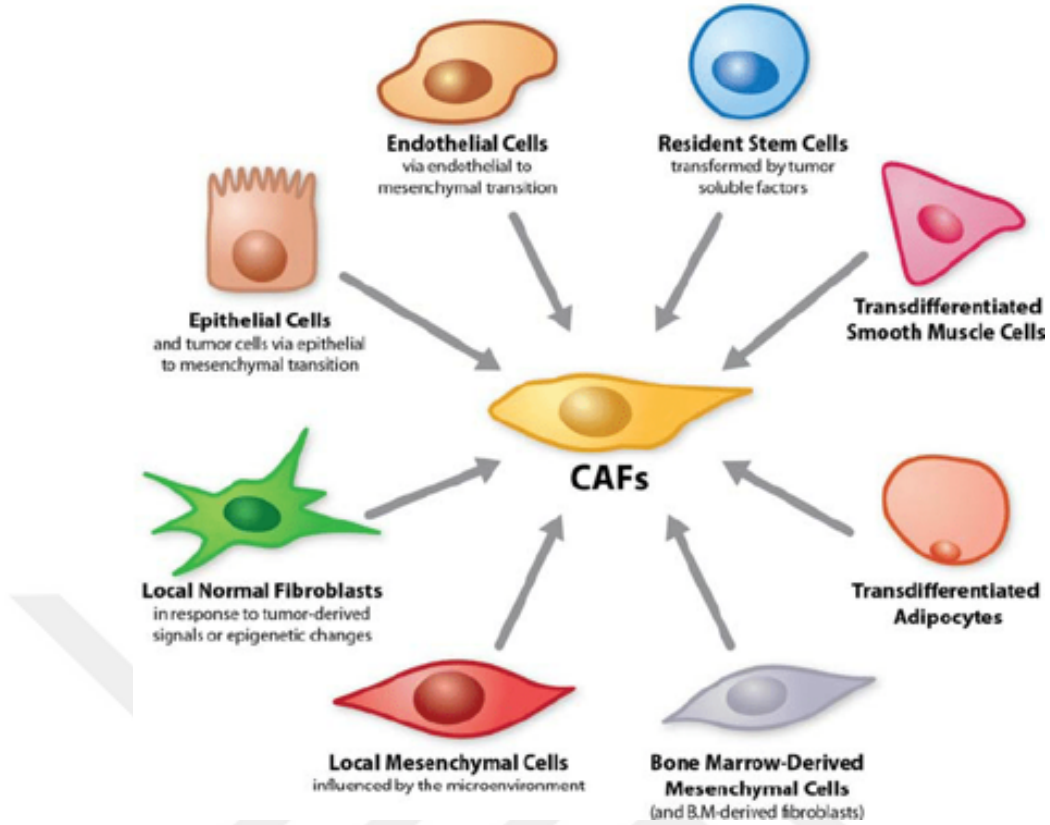
Tümör dokularında bulunan kanser ilişkili fibroblastları tespit etmek için en yaygın kullanılan belirteç α -SMA'dır, ama tek başına yeterli değildir (Orimo ve Weinberg 2007). Ayrıca fibroblast aktivasyon proteini (FAP) de belirteç olarak kullanılabilir (Kraman ve ark. 2010). Yüksek intra-tümöral FAP ekspresyonunun kolorektal kanserlerde kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wikberg ve ark.

2013). Bununla birlikte, FAP ekspresyonu epitelyal malign hücrelerde de saptanabilir (Wikberg ve ark. 2013). Yapılan çalışmalar ile α -SMA ve FAP'a ek olarak tenaskin-C (Yoshida ve ark. 2015), periostin (Kikouchi ve ark 2008), nöron glial antijen-2 (NG2) (Sugimoto ve ark. 2006), vimentin, desmin, trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve fibroblast spesifik protein-1 (FSP-1) belirteçlerinin çeşitli seviyelerdeki artmış ekspresyonları da tümör dokusunda kanser ilişkili fibroblastların karakterizasyonu için önerilmektedir (Shiga ve ark. 2015). Kanser ilişkili fibroblastlar epitelyal ve endotelyal özelliklere sahip olmadıklarından, sitokeratin ve CD31 negatif belirteç olarak kabul edilir (Sukowati ve ark. 2015; Shiga ve ark. 2015) (Tablo 6).

Tablo 6. Kanser ilişkili fibroblast belirteçleri (Shiga ve ark. 2015).

Positive Marker	Negative Marker
α -SMA Fibroblast activation protein tenascin-C periostin Neuron glial antigen-2 Vimentin Desmin Platelet derived growth factor receptor Fibroblast specific protein-1	Cytokeratin CD31

Kanser ilişkili fibroblastlar; meme, prostat, pankreas, akciğer, mide, kolanjyokarsinom ve kolorektal kanser gibi çeşitli kanser türlerinden izole edilebilir. Bununla birlikte, kanser ilişkili fibroblastlar beyin, böbrek ve ovaryum kanserlerinde nispeten nadirdir (Shiga ve ark. 2015).



Şekil 14. Kanser ilişkili fibroblastların köken aldıkları hücreler ile ilgili çeşitli hipotezler bulunmaktadır (Takebe ve ark. 2013).

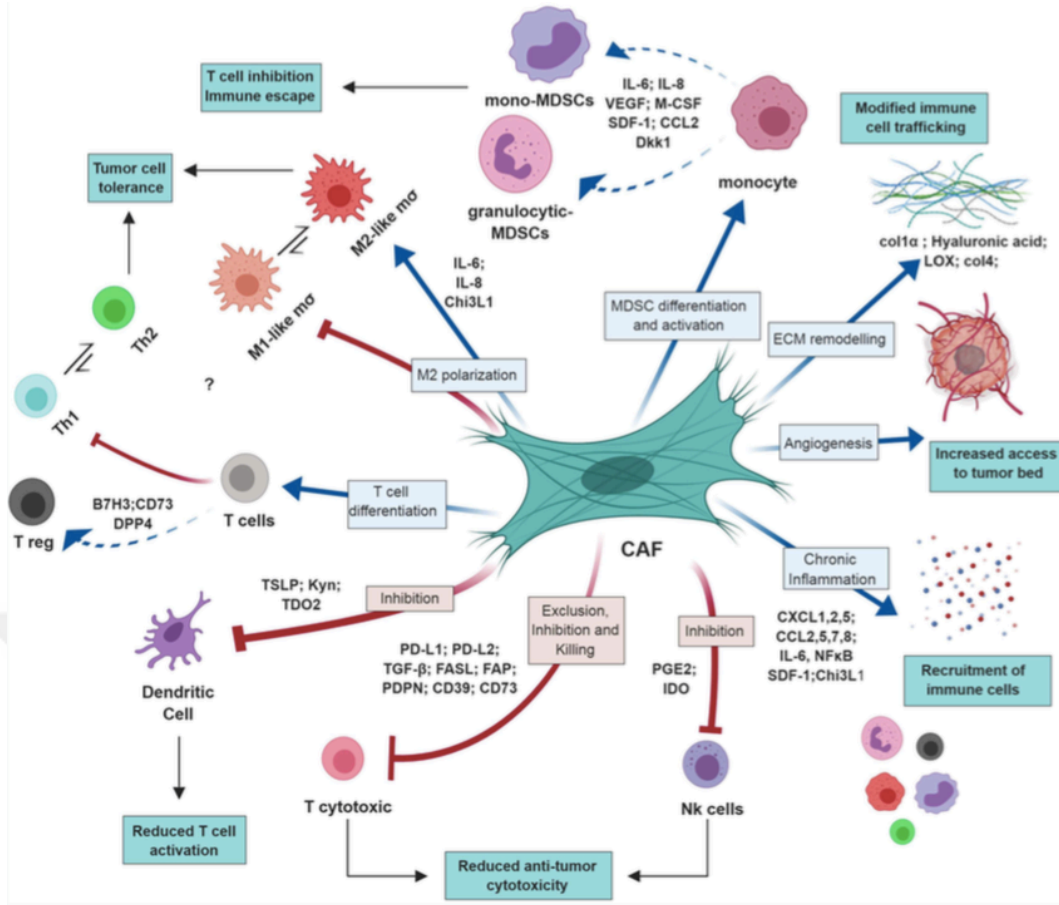
Yapılmış çalışmalar, kanser ilişkili fibroblastların tümör büyümesini desteklediklerini ve kanser hücrelerinin apoptozunun baskıladıklarını göstermektedir (Şekil 12) (Pietras ve Ostman 2010). Kanser ilişkili fibroblastlar, salgılandıkları dokularda parakrin etki gösteren IGF-1 ve IGF-2 gibi sağkalım faktörleri salgırlar. Ayrıca, normal doku stromasından farklı olan neoplastik ekstrasellüler matriks oluşumunu sağlayan moleküllerin ve proteazların sentezini de gerçekleştirerek kanser hücrelerinin sağkalımını düzenledikleri düşünülmektedir (Lu ve ark. 2011).

Literatürde, kanser ilişkili fibroblastların farklı tümör tiplerinde tümör anjiyogenezinin düzenlenmesine önemli ölçüde katkı sağladığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Farklı tümör mikroçevrelerinde bulunan kanser ilişkili fibroblastların; VEGF, FGF2, IL-8/CXCL8 ve PDGF-C dahil olmak üzere çeşitli pro-anjiyogenik sinyal proteinlerinin üretimini sağladığı ve bu sayede anjiyogenezi desteklediği bildirilmiştir (Pietras ve Ostman 2010). Ek olarak, normal bağ dokusu fibroblastlarının yanı sıra kanser ilişkili fibroblastlar, anjiyogenik büyüme faktörlerinin etki ettiği ekstrasellüler matriks proteinlerinin de ana sentez

kaynaklarıdır. Tipik normal fibroblastların aksine, kanser ilişkili fibroblastlar bahsedilen latent anjiyogenik faktörleri (bFGF, VEGF, TGF- β) serbest bırakan ve bunları endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanmasını sağlayan çeşitli ekstrasellüler matriksi eriten enzimleri de üretmektedirler (Pietras ve Ostman 2010; Rasaenen ve Vaheri 2010). Bunlara ek olarak kanser ilişkili fibroblastlar pro-anjiyogenik makrofajlar, nötrofiller ve diğer miyeloid hücreler için kemoatraktan maddeler üretebilir, böylece dolaylı olarak da tümör anjiyogenezi düzenlerler (Raenen ve Vaheri 2010; Vong ve Kalluri 2011).

Kanser ilişkili fibroblastların kanser hücrelerinin birincil tümör alanlarında invazyon sağlama ve uzak metastatik bölgelerde ikincil tümörler oluşturma yeteneklerini modüle ettiği gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu fonksiyonu sağlayan kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan hem invazyon hem de proliferasyona desteklik eden hepatosit büyüme faktörü (HGF)'dür. Diğer bir faktörde TGF- β olup, EMT programlarını aktive ederek tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz kabiliyetlerini desteklemektedir (Chaffer ve Weinberg 2011).

Kanser ilişkili fibroblastlar ekstrasellüler matriks proteinlerini normal fibroblastlardan farklı şekilde organize eder ve tümör mikroçevresine daha uygun olması için gereken ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi için gerekli enzimleri de üreterek, ortamı kanser hücresi invazyonuna daha uygun hale getirirler (Chaffer ve Weinberg 2011). Ayrıca birçok sitokin ve kemokinleri de salgılayarak bağışıklık hücrelerinin fonksiyonel farklılaşmasına aracılık eden karşılıklı etkileşimlere de dahil olarak tümörlerin bağışıklık hücrelerinden kaçmasına da katkıda bulunurlar. Kanser ilişkili fibroblastlar sitotoksik lenfositlerin işlevini doğrudan ortadan kaldırmakta ve böylece tümör hücrelerinin öldürülmesinin de engellenmesini sağlamaktadır (Şekil 15) (Monteran ve Erez 2019).



Şekil 15. Kanser ilişkili fibroblastların kanser mikroçevresi içerisinde düzenlediği mekanizmaların şematik gösterimi (Monteran ve Erez 2019).

Kanser hücreleri genetik olarak kararsızdır ve sıklıkla mutasyona uğrarlar. Bunun aksine, kanser mikroçevresinde bulunan ve genetik olarak daha kararlı kanser ilişkili fibroblastların varlığı kanser tedavileri için uygun hedef olmalarını sağlamaktadır. Literatürde kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan FAP'ı hedefleyen çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte klinik açıdan kanser ilişkili fibroblastları hedefleyen tedavilerin etkinliği konusunda yapılmış olan çalışma sayısı azdır. Bu nedenle kanser ilişkili fibroblastların özelliklerinin ve kinetiklerinin analiz edilebileceği ve kanser ilişkili fibroblastların hedeflendiği *in vitro* ve/veya *in vivo* deneysel modeller ile çalışmaların yapılması önemlidir (Ishii ve ark. 2015).

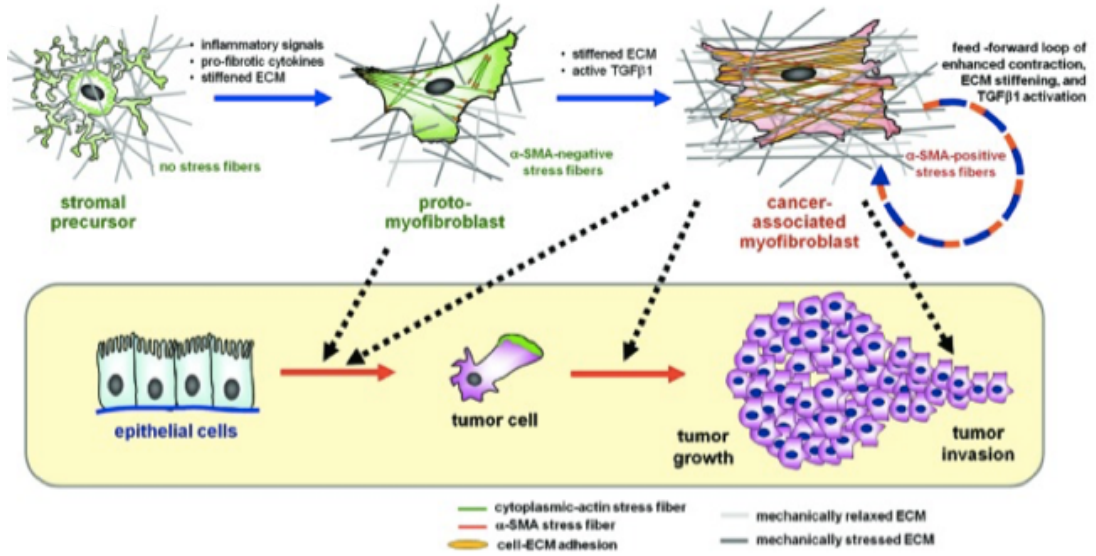
4.5.1. Çalışmada İncelenecek Olan Kanser İlişkili Fibroblastlara Özgü Pozitif ve Negatif Biyobelirteçler

4.5.1.1. Alfa düz kas aktin (α -SMA)

Alfa düz kas aktin (α -SMA ya da ACTA2), yara bölgelerinde bulunan düz kas hücrelerine ve miyofibroblastlara özgü bir aktin izoformudur. İfadesi, doku kasılması ile doğrudan ilişkilidir ve mekanik gerilim ile tetiklenebilir. α -SMA, perinükleer bölgede monomerik aktin veya stres liflerinde filamentli aktin şeklinde bulunarak kontraktilite, adezyon ve migrasyonda yer almaktadır (Attieh ve Vignjevic 2016).

α -SMA hücre motilitesi, yapısı ve bütünlüğünde önemli rol oynayan yüksek düzeyde korunmuş bir protein grubu olan aktin ailesinin bir üyesidir. α -SMA mikrofilaman demeti ve stres lifi regülasyonu yoluyla miyofibroblast kasılmasının başlıca nedenlerinden biri olan yara iyileşmesindeki rolü ile bilinmektedir. α -SMA'nın neden olduğu bu mekanik stres, yara iyileşmesi sürecinde yara yüzeyinde oluşan yeni bağ dokusu olan granülasyon dokusunun kasılması ve olgunlaşmasını sağlamaktadır. Miyofibroblastların sayısı tümör mikroçevresinde çok fazla olduğundan α -SMA, kanser ilişkili fibroblast popülasyonlarını tanımlamak için kullanılan belirteçlerden ilki haline gelmiştir (Şekil 16) (Mezawa ve Orimo 2016; Gascard ve Tlsty 2016).

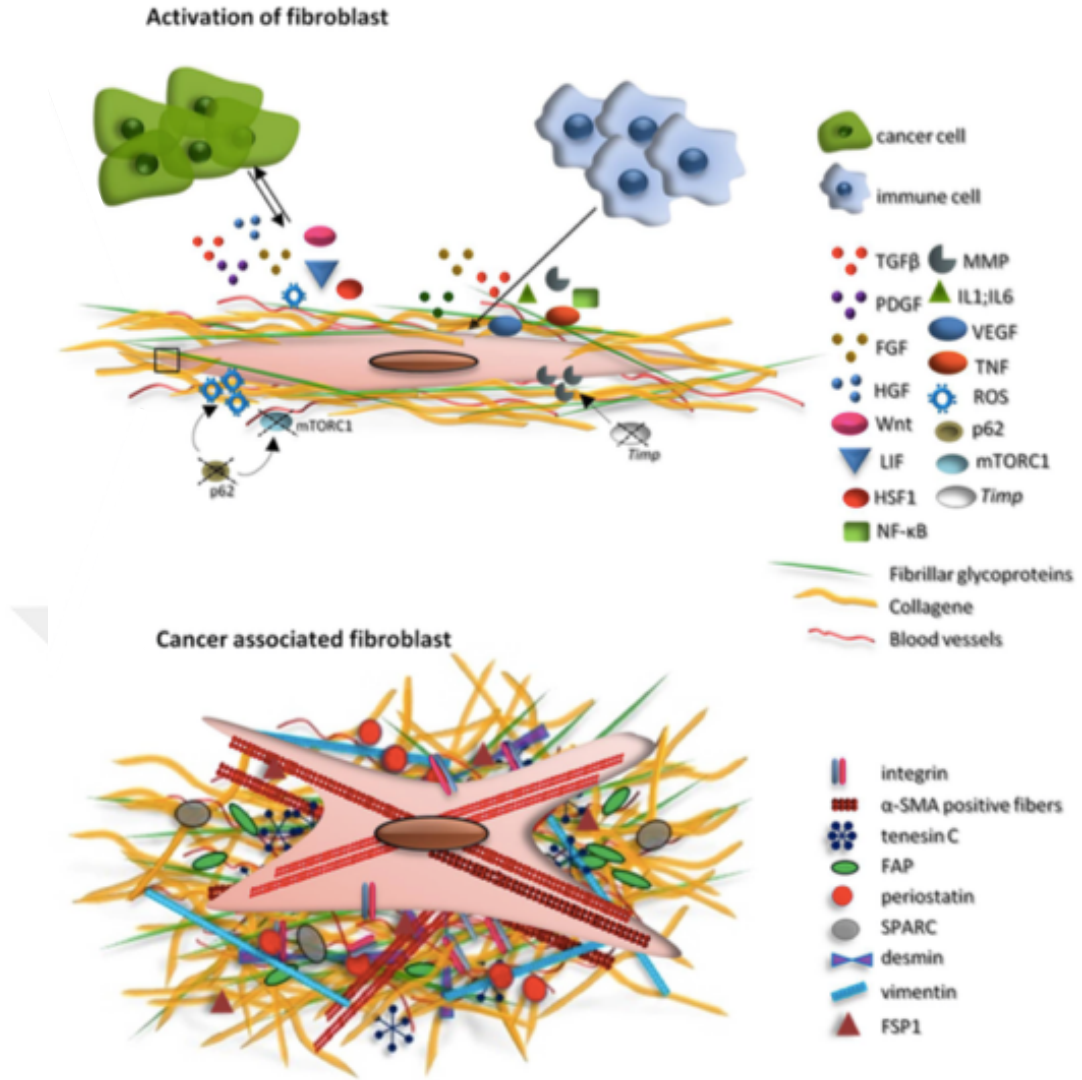
Bununla beraber α -SMA, kanser hastalarında da belirgin bir prognostik faktör olarak tanımlanmıştır ve α -SMA ekspresyonu, kolon kanseri hastalarında yüksek nüks riski ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. α -SMA pozitif fibroblastlardaki yüksek ekspresyon, meme ve kolon kanserinde düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Nurmik ve ark. 2020). α -SMA pozitif miyofibroblastlar, CXCL12 ve interlökin 6 (IL-6) gibi sitokinlerin salgılanmasının yanı sıra özofagus, kolorektal ve baş-boyun kanserlerinde hasta sağkalım oranlarını önemli ölçüde değiştirdiği gösterilen hücre dışı matriksin fiziksel olarak yeniden modellenmesinde görev almaktadırlar (Hanley ve ark. 2015).



Şekil 16. α -SMA ve kanser ilişkili fibroblastlar ilişkisi (Otranto ve ark. 2012).

4.5.1.2. Vimentin

Vimentin, özellikle mezenkimal kökenli hücrelerde hücre iskeleti ağının oluşumunda önemli rol oynayan bir tip III ara filaman proteinidir. Hücre iskeletinin organizasyonu, organel yerleşimi, hücresel göç ve adezyon için anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca vimentin, pERK ve rhodopsin kinaza (RhoK) bağlanmakta ve aktin organizasyonunun değişmesini ile MAPK sinyal yollarının başlatılmasını sağlamaktadır (Perez-Sala ve ark. 2015). Fibroblastlar mezenkimal fenotipleri ile güçlü bir şekilde karakterize edildiğinden, vimentin bütün fibroblast çeşitlerinde yüksek oranda eksprese edilebilir (Nurmik ve ark. 2020). Vimentinin, kanser ilişkili fibroblastlarda artmış ekspresyonu oluşum fenotipinin bir biyobelirtici olarak değerlendirilmektedir (Kuzet ve Gaggioli 2016) (Şekil 17).



Şekil 17. Normal fibroblastların aktifleşmesi sonrasında kanser ilişkili fibroblastlarda ifadesi artan moleküller (Kuzet ve Gaggioli 2016).

Vimentin ekspresyonu çok sayıda solid tümör tipinde artan metastatik potansiyel ile korelasyon göstermektedir. Bununla birlikte, kanser ilerlemesinde vimentin için fonksiyonel bir rol henüz aydınlatılamamıştır (Richardson ve ark. 2018). Çeşitli çalışmalar vimentinin metastaz ve progresyon için gerekli olduğunu, ancak primer tümör oluşumu için gerekli olmadığını belirtmektedir. Bu nedenle vimentinin bir EMT biyobelirteçinden daha fazlası olduğu ve kanser invazyonu ile metastazında fonksiyonel bir rol oynadığı düşünülmektedir. *In vitro* homotipik (sadece kanser ilişkili fibroblastlar) ve heterotipik (kanser ilişkili fibroblastlar ve kanser hücreleri) kültürlerde vimentini inceleyen çalışmalar, vimentinin sadece homotipik kanser ilişkili fibroblastların invazyonunu değil, aynı zamanda heterotipik kolektif invazyon

zincirlerinin oluşumunu ve korunmasını da sağladığını göstermektedir. Vimentin fonksiyonu bozulduğunda, kanser ilişkili fibroblastların fonksiyonlarında azalma nedeniyle heterotipik etkileşimler önemli ölçüde azalmaktadır. Bu veriler, primer tümörden hücresel kaçmayı yönlendiren vimentin pozitif kanser ilişkili fibroblastların metastaz için gerekli olduğunu göstermekte ve vimentinin erken evre kanser tedavileri için bir hedef olabileceğini düşündürmektedir (Richardson ve ark. 2018).

4.5.1.3. Fibroblast spesifik protein (FSP-1)

Fibroblast spesifik protein-1 (FSP-1, S100A4), adına rağmen; kanser ilişkili fibroblastlar, makrofajlar ve malign hücreler de dahil olmak üzere tümör mikroçevresi içinde çeşitli hücre tiplerinde ifade edilmektedir (Cabezón ve ark. 2007). Bu nedenle, FSP-1 fonksiyonlarının belirli bir hücre alt kümesine atfedilmesi zordur, ancak FSP-1 eksik farelerde gelişen tümörlerin ilerlemesinin azaldığı açıkça gözlenmiştir (Grum-Schwensen ve ark. 2005).

FSP-1 eksprese eden kanser ilişkili fibroblast hücrelerinin malign fenotip üzerindeki etkilerini ortaya çıkarmaya yönelik bir dizi çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar ile FSP-1 eksprese eden kanser ilişkili fibroblast hücrelerinin, TGF- β sinyalizasyonunu sağladığı, HGF ekspresyonunu arttırdığı ve bu nedenle birden fazla bölgede neoplazi oluşumu meydana geldiği gösterilmiştir. FSP-1 eksprese eden hücrelerin yokluğu, stromal hücreler tarafından VEGF-A ve tenascin-C ekspresyonunu azaltarak metastatik kolonizasyonu büyük ölçüde azalttığı da bilinmektedir (Cortez ve ark. 2014).

Çeşitli belirteçler arasında, FSP-1 diğer belirteçler ile karşılaştırıldığında kanser ilişkili fibroblastların benzersiz bir alt popülasyonunun seçilimi ve aktive edilmiş fibroblastların tespiti açısından en etkili belirteçlerden biri olarak tanımlanmaktadır. Kanser ilişkili fibroblastların biyobelirteçlerinin farklı kombinasyonlarının kanser ilerlemesinde muhtemelen farklı rolleri paylaşan heterojen hücre popülasyonlarından oluştuğunu gösterdiği düşünülmektedir (Kuzet ve Gaggioli 2016).

4.5.1.4. Sitokeratin 19 (CK19)

Sitokeratin (CK) ailesi üyeleri olan sitokeratinler moleküler ağırlıklarına ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaktadırlar. CK1-CK8 sitokeratinler yüksek molekül ağırlıklı, bazik/nötr tip II olarak sınıflandırılırken; CK9-CK20 sitokinler düşük molekül ağırlıklı, asidik tip I keratinler grubudur. Hücresel sinyal iletim yollarındaki ana işlevleri; stres reaksiyonlarının düzenlenmesi, apoptoz, epitelyal hücrelerin özgünlüğünün korunması ve hücresel çoğalmanın sağlanmasıdır (Mehrpouya ve ark. 2019).

Epitelyal CK'lar arasında sitokeratin 19 (CK19) en az asidik olan sitokeratindir ve moleküler ağırlığı 40 kDa'dır. CK19; pankreas, safra kesesi, böbrek ve sindirim sisteminin periderminde ve epitel hücrelerinde eksprese edilmektedir. Epitel hücrelere ek olarak CK19'un ekspresyonu çeşitli kanser hücrelerinde ve kanser dokularında bulunan diğer hücrelerde de görülmektedir. Aynı zamanda, CK19'un erken evrelerde kolorektal karsinom tanısında da önemli olduğu bildirilmektedir (Mohammadi ve ark. 2016). Periferik kanda CK19 mRNA'sının ekspresyonu, heterotipik malign tümör hücrelerinin varlığını göstermektedir. Varsayımsal olarak bu durumun, metastaz gelişim riskinin yüksek olduğunu belirttiği düşünülmektedir (Xu ve ark. 2006).

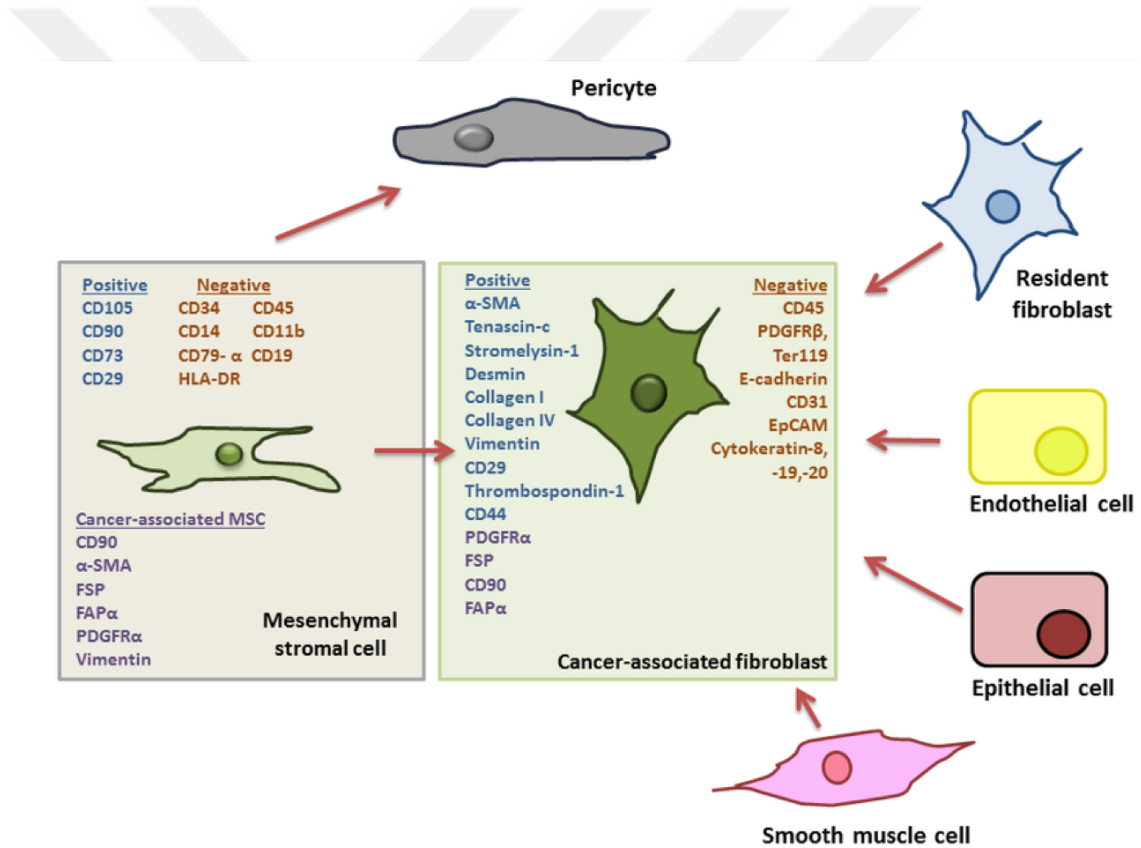
CK19'un da içerisinde bulunduğu bir grup sitokeratinin kanser ilişkili fibroblastlar için negatif biyobelirteçler olduğu bildirilmiştir (Şekil 15) (Shiga ve ark. 2015; O'Malley ve ark. 2016). CK19 epitelyal belirtecinin kanser ilişkili fibroblastlarda eksprese olmaması, bu hücrelerin EMT geçirmiş kanser hücrelerinden köken almadığının bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Amornsupa ve ark. 2014).

4.5.1.5. CD31

CD31 ya da diğer adı ile trombosit/endotelyal hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1) 1980'lerin ortalarında insan granülositleri, monositleri ve trombositlerin yüzeyinde eksprese edilen farklılaşma antijeni olarak tanımlanmıştır. CD31'in dolaşımdaki trombositlerin ve lökositlerin aktivasyonunu inhibe etmek, endotel hücre-hücre bağlantılarının bütünlüğünü desteklemek ve vasküler yatağın apoptotik uyarılara karşı korunmasını sağlamak gibi önemli rolleri vardır (Lertkiatmongkol ve ark. 2016).

Trombositler, monositler ve granülositlere ek olarak CD31 endotelial hücrelerde de ifade edilir. CD31 ayrıca vasküler tümörler, histiyositik maligniteler ve plazmasitomalar da dahil olmak üzere bazı tümörlerde de eksprese edilmektedir. İmmünohistokimya da CD31, öncelikle histolojik doku kesitlerinde endotelial hücrelerin varlığını göstermek için kullanılır ve şiddeti tümör anjiyogenezinin derecesini değerlendirmeye yardımcı olabilir. Malign endotel hücreleri de genellikle antijeni korur ve böylece CD31 immünohistokimyası hem anjiyomları hem de anjiyosarkomları göstermek için kullanılmaktadır (Guttaso 2010).

Literatürde CD31'in kanser ilişkili fibroblastlar için negatif biyobelirteç olduğu bildirilmiş ve çalışmalarda kullanılmıştır (Şekil 18) (Shiga ve ark. 2015; O'Malley ve ark. 2016).

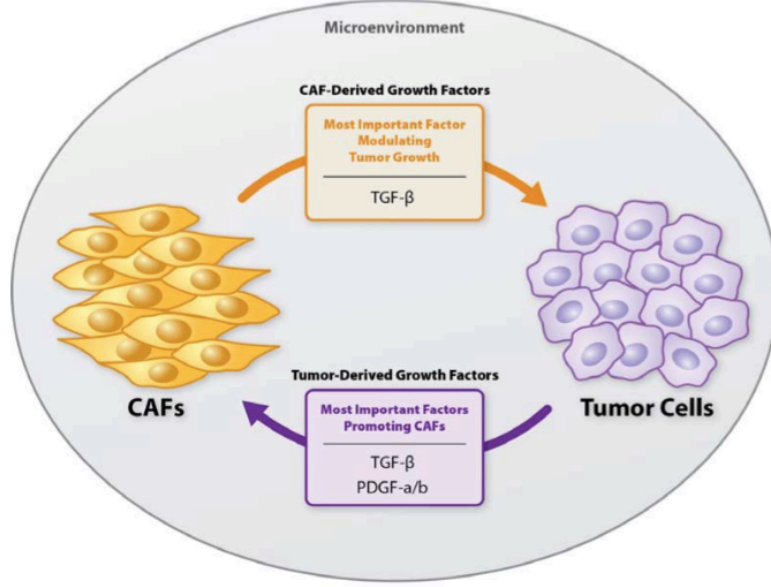


Şekil 18. CK19 ve CD31 proteinleri kanser ilişkili fibroblastların negatif biyobelirteç olarak kabul edilmektedir (O'Malley ve ark. 2016).

4.5.2. Çalışmada İncelenecek Olan Kanser İlişkili Fibroblastların Salgıladığı Faktörler

4.5.2.1. Transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF- β 1)

Kanser hücreleri ve kanser ilişkili fibroblastlar büyüme faktörleri aracılığıyla iletişim kurmaktadır. Bu büyüme faktörlerinden en önemlisi, tranforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) 'dır. Kanser hücrelerinin ve kanser ilişkili fibroblastların, kanser ilişkili fibroblastların oluşumunu ve normal fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını koordine eden üç TGF- β izoformunu (TGF- β 1-3) salgıladıkları bilinmektedir (Şekil 19). Meme kanseri hastalarından elde edilen kanser ilişkili fibroblastlar TGF- β ile inkübe edildiğinde, miyofibroblastların yüzdesinin arttığı, ancak normal fibroblastlarda artış olmadığı ve her iki hücre popülasyonunda α -SMA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Ayrıca *in vivo* tümör büyümesinin TGF- β uyarımı ile arttığı çeşitli hayvan modellerinde bildirilmiştir (Takebe ve ark. 2013). TGF- β 1 ve TGF- β 2 seviyelerinin kanser ilişkili fibroblastlarda arttığı ve miyofibroblastik fenotipi ve dolayısıyla otokrin olarak TGF üretimine devam ettikleri bilinmektedir (Kojima ve ark. 2010). TGF- β 1 komşu tümör hücreleri üzerinde de parakrin tarzda hareket ederek epitelyal hücre büyümesini negatif olarak düzenleyebilmektedir. TGF- β 1'in tümör baskılayıcıdan tümör ilerletici özelliğe geçişi, kemokin SDF-1/CXCL12 ile karşılıklı iletişimi ile açıklanabilir (Shimoda ve ark. 2010). Kanser ilişkili fibroblastların yapısal olarak yüksek miktarlarda kemokin salgıladığı ve özellikle ürettikleri SDF-1'in meme kanseri hücrelerinde tümör büyümesini ve anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir. İyi huylu prostat hiperplastik dokusunda *in vivo* tümör büyümesini uyarmak için kanser ilişkili fibroblastlardan hem TGF- β 1 hem de SDF-1 salgılanmasının gerektiği bildirilmektedir (Takebe ve ark. 2013). Normal fibroblastların tümör büyümesi üzerinde sadece nominal bir etkisi olsa da kanser ilişkili fibroblastlar tarafından üretilen SDF-1/CXCR4 ve TGF- β 1 arasındaki bu etkileşim, kanser hücrelerinin yayılımı ve invazivliği ile sonuçlanmaktadır. Bu sinyal döngüsünün önemi, küçük olmayan hücreli akciğer kanserinin (NSCLC) klinik örneklerinde de onaylanmıştır (Wals ve ark 2011).



Şekil 19. Neoplazi ve desmoplaziye neden olan önemli büyüme faktörleri. Kanser ilişkili fibroblast kökenli TGF- β ve kanser türevli TGF- β tümör mikroçevresinde hücre-hücre etkileşim için önemli bir faktördür (Takebe ve ark. 2013).

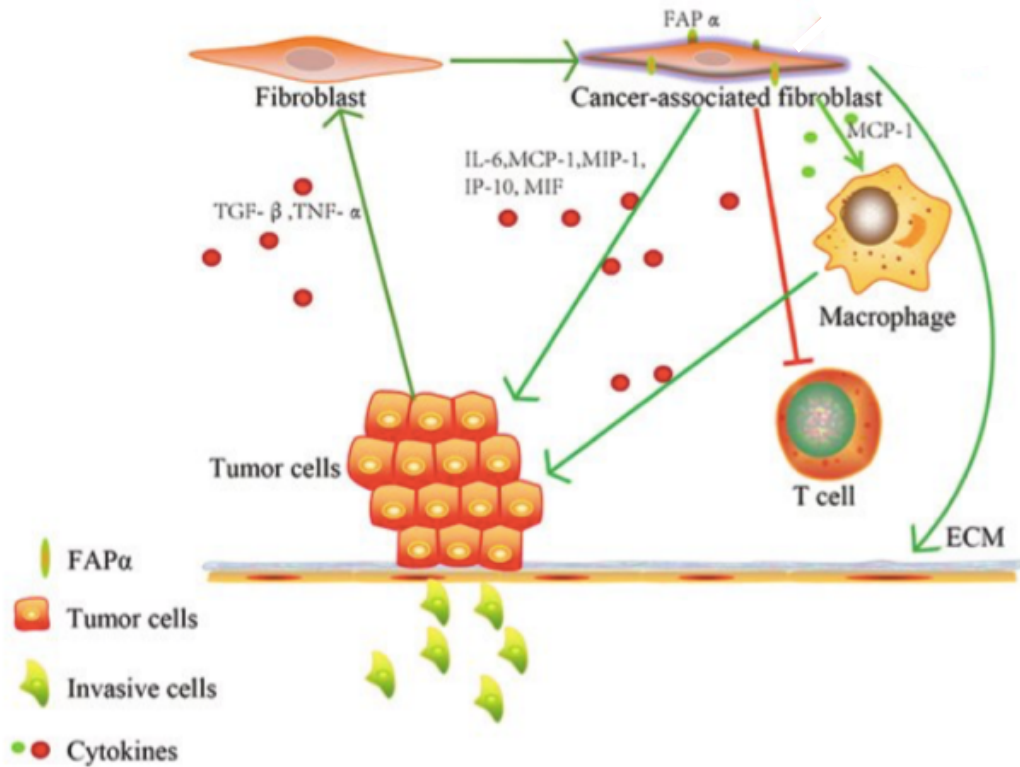
4.5.2.2. Fibroblast aktivasyon proteini (FAP)

Kanser ilişkili fibroblastlar normal fibroblastlardan farklı olarak, tümör oluşumunu, kanser hücrelerinin anjiyogenezini ve metastatik yayılmasını artırma yetenekleri ile kanser ilerlemesi ve metastazına daha fazla katılmaktadırlar (Karagiannis ve ark. 2012). Normal fibroblastlarda saptanmayan ve fibroblast aktivasyon proteini (FAP) adı verilen membrana bağlı bir serum proteaz (tip II integral membran proteini) kanser ilişkili fibroblastlarda eksprese edilmektedir (Şekil 20). FAP ekspresyonu; kolon, over, pankreas ve hepatosellüler karsinom da dahil olmak üzere birçok kanser tipinde genel olarak daha kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir ancak meme kanserinde görülmemiştir (Brennen ve ark. 2012). İmmünohistokimyasal çalışmalar ile FAP'ın esas olarak tümör hücrelerine bitişik stromada lokalize olduğu, ancak normal doku stromalarında bulunmadığı gösterilmiş ve tümör hedefli tedaviler için önemli bir aday olduğu belirtilmiştir (Xing ve ark 2010; Sounni ve Noel 2013).

FAP'ın kanser ilişkili fibroblastların proteolitik aktivitesinde de rol oynadığı düşünülmektedir. FAP, hem jelatin hem de kollajen I'i parçalayabilen bir serin

proteazdır (Attieh ve Vignjevic 2016). FAP eksprese eden fibroblastlar, kanser invazyonunu destekleyen paralel ve düzenli kollajen lifleri ile fibronektin açısından zengin bir ekstrasellüler matriks oluşturmaktadırlar (Lee ve ark. 2011). FAP+ fibroblastlar ayrıca α -SMA'nın da artmış regülasyonunu göstermektedirler, bu da proteolitik aktivitesine ek olarak FAP'ın kanser ilişkili fibroblastlarda dolaylı olarak bir kasılma fenotipine neden olabileceğini düşündürmektedir (Lee ve ark. 2011).

FAP geleneksel olarak dipeptidil peptidaz ve kollajenaz aktivitesi nedeniyle fibroblastlar tarafından doku onarımı, fibroz ve hücre dışı matriks yıkımı ile ilişkilendirilmiştir ancak aynı zamanda fotal mezenkimal dokularda ve embriyogenez sırasında da arttığı gösterilmiştir (Tuyeson ve ark. 2014). FAP epitelyal karsinomların % 90'ından fazlasında artmıştır (Brennen ve ark. 2012). Tümör stromasındaki yüksek ekspresyonu nedeniyle, çok sayıda çalışma kanser ilişkili fibroblastlar belirteci olarak FAP'ı kullanmıştır ve potansiyel klinik uygulamalar için de en uygun belirteçlerden biri olarak kabul edilmektedir (Nurmik ve ark. 2020).

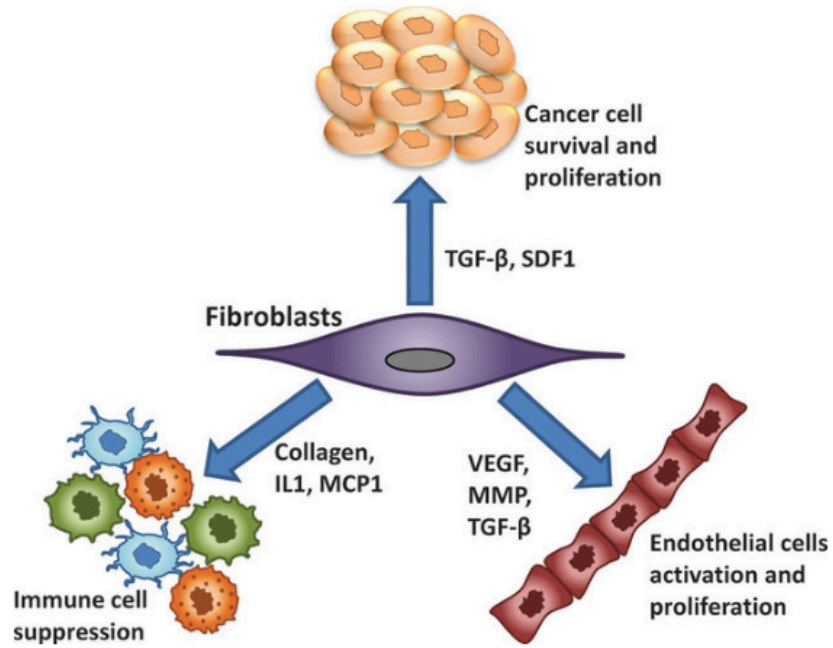


Şekil 20. FAP ve kanser ilişkili fibroblast ilişkisi (Zi ve ark. 2015).

4.5.2.3. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), kanser anjiyogenezinde önemli rol oynaması, birçok kanser türü tarafından salgılanması ve salgılanma derecesinin hastanın prognozunu etkilemesi sebebi ile kanser gelişiminin önemli moleküllerdendir (Liu ve ark. 2015).

Kanser ilişkili fibroblastların tümör anjiyogenezindeki rolleri henüz tam net değildir. Yapılan çalışmalarda fibroblast tiplerinin VEGF'i IL-6'nın etkisi altında salgıladığı ve salgılama seviyelerinin farklı fibroblast türleri arasında farklı olduğu gösterilmiştir. Dermal ve malign olmayan kolon fibroblastları tarafından VEGF salgılanması seviyeleri ihmal edilebilir düzeyde iken artmış VEGF ekspresyonu kanser ilişkili fibroblast fenotipi ile paralellik göstermektedir (Şekil 21) (Shiga ve ark. 2015).



Şekil 21. Kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan TGF-β ve VEGF'in fonksiyonları (Roy ve Li 2016).

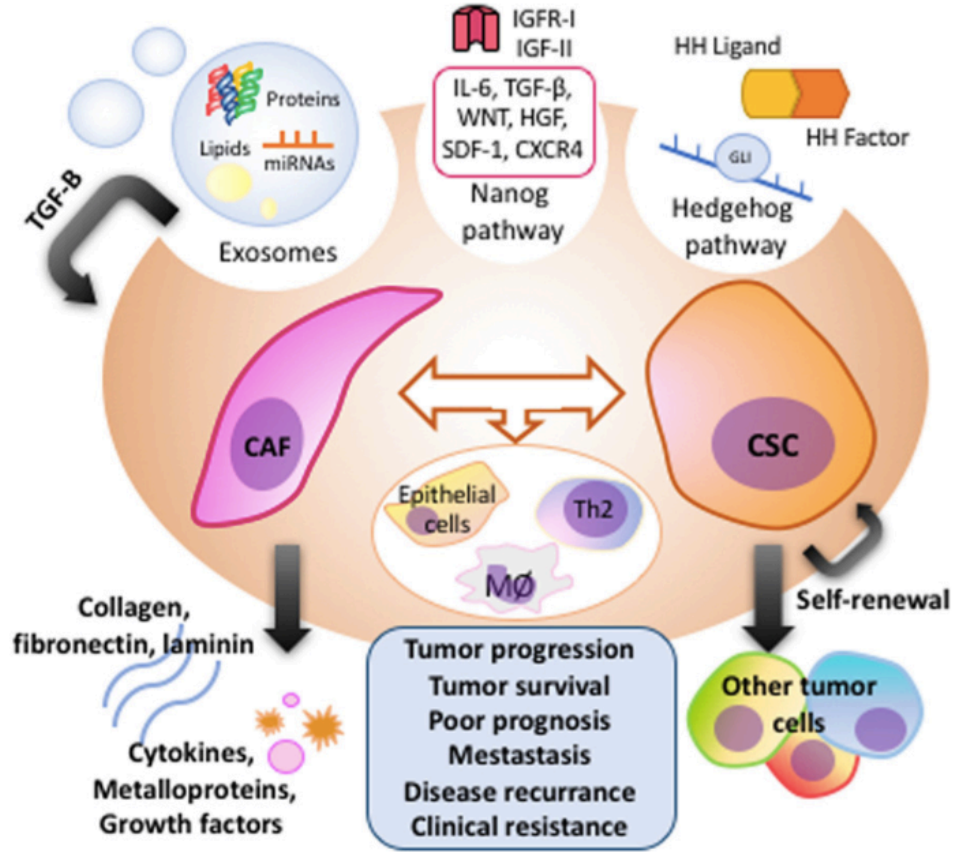
4.5.2.4. İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-6 (IL-6), inflamatuvar ve diğer bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde merkezi rol oynayan çok fonksiyonlu bir sitokindir ve anjiyogenik

özelliğe sahiptir. Birçok çalışma, kanserlerde IL-6'nın proliferasyon, migrasyon ve anjiyogenez gibi kanser ilerlemesinde önemli işlevleri yerine getirdiğini göstermiştir (Nagasaki ve ark. 2014). Kolon kanserinden izole edilen stromal fibroblastların önemli miktarlarda IL-6 ürettiği ve kanser hücrelerini de IL-6 üretimlerini arttırmaya teşvik ettiği bulunmuştur. Ayrıca IL-6, fibroblastlar tarafından VEGF üretimini arttırmakta ve böylece anjiyogenezi indüklemektedir (Shiga ve ark. 2015).

Ortaya çıkarılan veriler, gelişim sırasında tümör hücreleri ile stromal fibroblastlar arasındaki dinamik etkileşimin karşılıklı olduğunu göstermektedir. Bazı hücreler yüksek düzeyde IL-6 üretmekte ve IL-6, EMT'yi tetikleyen ve kanser kök hücrelerinin oluşumunu destekleyen MMP-2 ve MMP-9'u salgılayan komşu fibroblastları harekete geçirmektedir (Gioannoni ve ark. 2010) (Şekil 22). Ek olarak, otokrin IL-6 üretemeyen tümör hücreleri, kanser ilişkili fibroblastlardan gelen parakrin IL-6 sinyaline belirgin şekilde yanıt vermektedir. IL-6, STAT3 aracılığı ile kanser hücrelerinin büyümesini ve metastazını arttırmaktadır. Buna paralel olarak, IL-6 ile indüklenen STAT3, kanser hücrelerini apoptozdan korur. Bütün sonuçlar, IL-6'nın tümör dokusunun hayatta kalmasını desteklediği ve nihai tümör nüüsü için bir rezervuar görevi gören bir “kemo-dirençli mikroçevre” yarattığını göstermektedir (Li ve ark. 2015).

IL-6 ile aktive olan fibroblastlardan salgılanan VEGF'in neredeyse kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan VEGF seviyesine ulaştığı gözlenmiş ve IL-6 varlığında fibroblast hücrelerinin kanser gelişimini sağlayacak şekilde hareket ettiği bildirilmiştir. TNF ve lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan fibroblastların salgıladıkları IL-6 miktarının arttığı ve fibroblastların kanser ilişkili fibroblastlara benzer özellikler kazandığı da görülmüştür (Nagasaki ve ark. 2014). Kanser hücrelerinden salgılanan bazı sitokinlerin yerleşik fibroblastların, kanser ilişkili fibroblastlara geçişini desteklediği ve bu değişikliğin IL-6 sekresyonuna yol açtığı kabul edilmektedir (Shiga ve ark. 2015).



Şekil 22. Kanser ilişkili fibroblast ve kanser kök hücresi ilişkisi (Alguacil-Núñez ve ark. 2018).

Bu doktora tez çalışmasında metastatik kolon kanseri hücre hattı (COLO-741) içerisinde bulunan kanser kök hücrelerinin (CD133+ COLO-741) ve kanser kök hücre olmayan (CD133- COLO-741) kanser hücrelerinin fibroblast hücreleri ile indirekt olarak ko-kültüre edilmeleri sonucunda fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması ve kanser ilişkili fibroblast gelişimindeki rollerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 19/087/08/3/4 numaralı proje ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2019-036 numaralı proje ile desteklendi. Doktora tez çalışmaları Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

5.1. KOLON KANSER HÜCRELERİNİN VE VERO HÜCRELERİNİN KÜLTÜRÜ

COLO-741 (ECACC 93052621) metastatik kolon kanser hücreleri %10 Fötal Sığır Serum (FBS) (Katalog No: FBS-11B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany), 2 mM L-Glutamin (Katalog No: 25030-024, Gibco, USA) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Katalog No: PS-B, Lot No: CP18-2207, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) içeren RPMI-1640 hücre vasatında (Katalog No: R8758, Lot No: NBH0315, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); VERO (ATCC® CCL81™) hücreleri ise %10 FBS, 2 mM L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM Low Glucose (Katalog No: DMEM-LPA, Lot No: CP17-1857, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) hücre vasatında %5 CO₂ ve hava ortamı sağlayan 37°C nemli inkübatörde (CellCulture, ESCO) kültüre edildi.

COLO-741 ve VERO hücrelerinin kültür vasatları iki günde bir değiştirilerek %80 konfluent oluncaya kadar kültür işlemine devam edildi. Hücreler %80 konfluent olduklarında kültür kaplarına %0,25 Tripsin-EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Katalog No: TRY-1B10, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Germany) ilave edildi ve 37°C'de 5 dakika bekletilerek hücreler kaldırıldı ve üzerine kullanılan Tripsin-EDTA miktarının iki katı miktarda vasat eklenerek Tripsin-EDTA aktivitesi inhibe edildi. Kültür kabından ayrılan hücreler, içerisinde daha önceden 5 ml kültür

vasatı içeren tüplere toplanarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Her iki hücrenin supernatantları atılarak pelletler üzerine hücrelere uygun hücre vasatları ilave edilerek 1:3 oranında pasajlandı. Çalışmada kullanılacak hücre sayısına ulaşınca kadar pasajlanan hücrelerin bir kısmı tripsinizasyon işleminden sonra ayrıldı ve 9 birim FBS ile 1 birim Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Katalog No: A3672, AppliChem, Darmstadt, Germany) kullanılarak hazırlanan dondurma vasatı içerisine alındı. Hücreler eş zamanlı olarak sıvı azot tankı ve -80°C' de saklandı. Toplanan diğer hücreler çalışmada kullanılmak üzere uygun şekilde ekilerek kültür işlemine devam edildi.

5.2. KOLON KANSERİ KÖK HÜCRELERİNİN ELDESİ

Kolon kanseri kök hücrelerinin eldesi için manyetik-aktif hücre ayırıştırma tekniği (Mini MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) kullanıldı. Kolon kanser kök hücre yüzey belirteci olan CD133'e karşı hazırlanmış anti-CD133 primer antikoru içeren immüno-manyetik beadler ile COLO-741 hücreleri 37°C' de 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tripsinizasyon ile toplanan hücreler kültür vasatı ile 2 defa yıkandı. Kültür vasatı ile birlikte toplanan hücreler manyetik alana yerleştirilen kolondan geçirildi. Kolondan direkt olarak geçen hücreler CD133- hücreler olarak toplandı ve kolon manyetik alandan çıkartıldıktan sonra yıkanarak elde edilen hücreler ise CD133+ hücreler olarak toplandı. Tüm örnekler 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra CD133+ COLO-741 ve CD133- COLO-741 hücreler %10 FBS, 2 mM L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren RPMI-1640 vasatı kullanılarak %5 CO₂ ve 37°C şartlarını sağlayan nemli inkübatörde ayrı ayrı kültüre edildi.

5.3. KOLON KANSER KÖK HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU

MiniMACS ile elde edilen CD133+ COLO-741 hücrelerin karakterizasyonu için indirekt immunositokimya yöntemi kullanıldı.

FBS ile kaplanmış steril yuvarlak lameller üzerinde COLO-741, CD133+ COLO-741 ve CD133- COLO-741 hücreleri 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kabına ekildi ve 48 saat sonra %4'lük paraformaldehit (Katalog No:387507, Carla Erba, France) ile 30 dakika tespit edildi. Tespit işleminden sonra

kuyucuklar 3 kez 5 dakika Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS) (Katalog No: PBS404.100, BioShop, Canada) ile yıkandı. Daha sonra %3 lük Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (Katalog No: K40391897, Merck, Darmstadt, Germany) uygulanarak 5 dakika 3 defa PBS ile yıkanan hücreler permeabilizasyon için %0,1'lik Triton®-X-100 (Katalog No: A4025, Lot#8H56511, Biomatic, Canada) ile 15 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra 3 defa PBS ile tekrar yıkama işlemi yapıldı. Tüm örneklerle 1 saat bloklama solüsyonu (Katalog No: AEN080, Lot#38705, ScyTek, USA) uygulamasından sonra yıkama işlemi gerçekleştirilmeden anti-CD133 primer antikoru (rabbit polyclonal, Katalog No: orb99113, Lot No: RB190, Biorbyt, UK) ile 1 gece +4 C⁰ de inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra biotinlenmiş sekonder antikor (Katalog No: AEN080, Lot#38705, ScyTek, USA) (30 dakika) ve ardından streptavidin-peroksidaz (HRP) (Katalog No: AEN080, Lot#38705, ScyTek, USA) (30 dakika) uygulandı. İki uygulama arasında ve son uygulamadan sonra 3 defa PBS ile yıkamalar yapıldı ve 2 dakika diaminobenzidine (DAB) kromojeni (DAB Kit, Katalog No: ACK125, ScyTek, USA) uygulanarak immunoreaktivitelerin görünürlüğü sağlandı. Immunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile primer antikorlar kullanılmayarak negatif kontrol boyamaları gerçekleştirildi. Mayer'in Hematoksileni (Katalog No: BS-005, Lot#072019001, Beslab, Türkiye) ile artalan boyaması yapıldıktan sonra distile su ile yıkanan örnekler kapatma solüsyonu (Katalog No: K002, Lot No: H701, Diagnostic Biosystems, Holland) ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda (Nicon Eclips 80i, Japan) iki bağımsız araştırmacı tarafından fotoğrafları çekilerek skorlandı (Tablo 7). Çalışma birbirinden bağımsız üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 7. İndirekt immunositokimya yöntemi

Yapılan İşlem	Kullanılan Madde	Uygulanan Süre
Yıkama	PBS	3 x 5 dk.
Fiksasyon	%4'lük Paraformaldehit	30 dk.
Yıkama	PBS	3 x 5 dk.
Bloklama	%3'lük H ₂ O ₂	5 dk.
Yıkama	PBS	3 x 5 dk.
Permeabilizasyon	%0,1 lik Triton-X 100	15 dk.
Yıkama	PBS	3 x 5 dk.
Bloklama	Bloklama solüsyonu	1 saat
Primer Antikor Uygulaması	Poliklonal primer antikor	Oda Sıcaklığında 2 Saat veya +4°C'de 1 Gece
Yıkama	PBS	3 x 5 dk.
Sekonder Antikor Uygulaması	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dk.
Yıkama	PBS	3 x 5 dk.
Sekonder Antikor Uygulaması	Streptavidin HRP	30 dk.
Yıkama	PBS	3 x 5 dk.
Boyama	DAB	2 dk.
Yıkama	PBS	3 x 5 dk.
Artalan Boyaması	Mayer'in Hematoksileni	1 dk
Yıkama	Distile su	3 x 5 dk.
Kapatma	Kapatma mediumu	

5.4. DENEY GRUPLARININ BELİRLLENMESİ VE İNDİREKT KO-KÜLTÜR SİSTEMİNİN KURULMASI

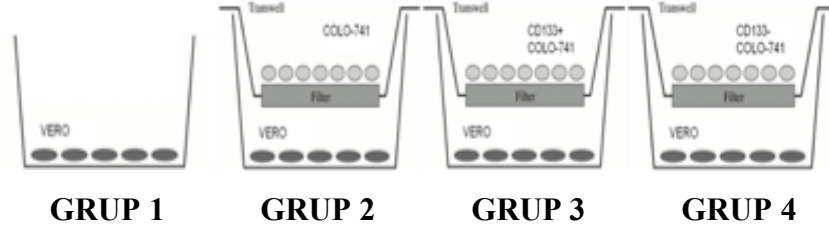
Tez çalışmasının amacına uygun olarak dört grup planlandı ve aşağıdaki şekilde adlandırıldı (Şekil 23).

GRUP 1: Kontrol grubu VERO hücreleri

GRUP 2: Metastatik kolon kanser hücre hattı (COLO-741) ile VERO hücrelerinin indirekt ko-kültürü

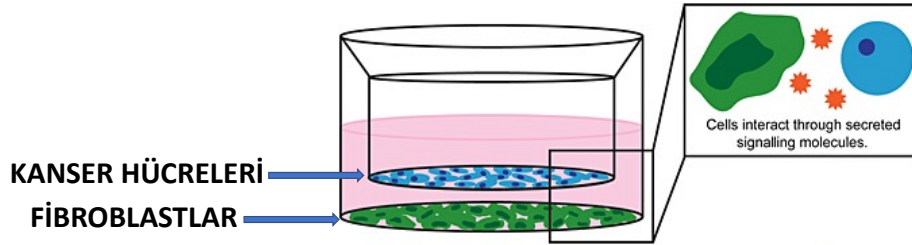
GRUP 3: CD133+ COLO-741 kolon kanser kök hücreleri ile VERO hücrelerinin indirekt ko-kültürü

GRUP 4: CD133- COLO-741 kanser kök hücresi olmayan hücreler ile VERO hücrelerinin indirekt ko-kültürü



Şekil 23. Deney gruplarının şematik gösterimi

Projede VERO hücrelerinin kanser hücreleri tarafından etkisi incelendiğinden dolayı çalışma gruplarında kültür vasatı olarak VERO hücrelerinin kültür vasatı ile devam edildi. FBS ile kaplanmış steril yuvarlak lameller içeren 24 gözlü kültür kaplarına her kuyuda 5×10^3 hücre olacak şekilde VERO hücreleri ekildi ve bir gece inkübe edildi. Ko-kültür oluşturmak üzere kullanılan 0,4 μm por çapına sahip insert'lerin (ThinCert™ Cell Culture Inserts 24 Well, Katalog No:662640, Granier, Germany) içerisine 3 farklı grup kanser hücreleri her insert içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekildi ve 4 saat inkübe edildi. Daha sonra içerisinde VERO hücreleri bulunan 24 kuyucuklu kültür kaplarının üzerlerine içerisinde kanser hücreleri bulunan insertler yerleştirilerek indirekt ko-kültür sistemleri kuruldu ve hücreler 37°C , %5 CO_2 koşullarına sahip nemli inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 24).



Şekil 24. Kanser hücreleri ile fibroblast hücrelerinin steril insertler kullanılarak oluşturulan ko-kültür işleminin şematik gösterimi.

5.5. İMMUNOSİTOKİMYA ANALİZİ

Tüm gruplara ait VERO hücreleri ko-kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde %4'lük paraformaldehit ile 30 dakika tespit edildikten sonra yöntem 5.3 de anlatılan şekilde immunositokimyasal analiz gerçekleştirildi. Analizde primer antikorlar olarak (Tablo 8);

- anti- **α -SMA** (rabbit polyclonal, Katalog No: FNab09409, Lot No: 20191025, FineTest, China)
- anti-**Vimentin** (rabbit polyclonal, Katalog No: FNab08038, Lot No: 20191025, FineTest, China)
- anti-**FSP-1 (S100A4)** (rabbit polyclonal, Katalog No: FNab07560, Lot No: 20191025, FineTest, China)
- anti-**Sitokeratin 19 (CK19)** (rabbit polyclonal, Katalog No: FNab02208, Lot No: 20191025, FineTest, China)
- anti-**CD31** (rabbit polyclonal, Katalog No: FNab09993, Lot No: 20191025, FineTest, China) kullanıldı.

Tablo 8. İmmünohistokimya analizi ile incelenen kanser ilişkili fibroblast biyobelirteçleri

Pozitif belirteçler	Negatif Belirteçler
α -SMA	Sitokeratin 19
Vimentin	CD31
FSP-1 (S100A4)	

5.6. ELISA ANALİZİ

İndirekt ko-kültür sistemi içerisinde kültüre edilen hücrelerin vasatları kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde toplandı. Toplanan hücre kültür vasatları 20 dk 1000xg 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak, pellet uzaklaştırıldı. Çalışmaya başlamadan önce solüsyonlar üreticinin talimatlarına göre hazırlandı. Analizi gerçekleştirilecek örneklerden 100 μ L alınarak 100 μ L örnek dilüsyon solüsyonu ile karıştırıldı ve örnekler 2 kat seyreltilmiş oldu. **TGF- β 1** (Katalog No: EH0287, Lot No: H0287E108, FineTest, China), **FAP- α** (Katalog No: EH3037, Lot No: H3037E108, FineTest, China), **VEGF** (Katalog No: EH0327, Lot No: H0327E108, FineTest, China) ve **IL-6** (Katalog No: EH0201, Lot No: H0201E108, FineTest, China) ile kaplanmış 96 gözlü kültür kapları çalışma başlamadan önce 2 defa 1 dakika yıkama solüsyonu ile yıkandı. Kit içerisinde çıkan standartlar hazırlandı ve her bir

standarttan (2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, 31.25 pg/mL) 100 µL alınarak standart kuyucuklarına 3 tekrar olacak şekilde konuldu. Kontrol (zero) kuyucuğu için 100 µL örnek/standart dilüsyon solüsyonu 3 tekrar olacak şekilde konuldu. Seyreltilmiş örneklerden 100 µL kuyucuklara her örnek için 3 tekrar olacak şekilde eklendi. Kültür kaplarının üstü kapatıldı ve 90 dakika 37°C’de inkübe edildi. İki defa 1 dakika yıkama solüsyonu ile yıkanan kuyucuklar içerisine 100 µL biotin ile işaretlenmiş antikor solüsyonu eklendi. Kültür kaplarının üstü tekrar kapatılarak 60 dakika 37°C’de inkübe edildi. Kültür kapları içerisindeki solüsyonlar çekildi ve 3 kere 1 dakika olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı. Takiben 100 µL HRP-streptavidin konjuge (SABC) solüsyonundan bütün kuyucuklara eklendi ve 30 dakika 37°C’de inkübe edildi. Kültür kapları içerisindeki solüsyonlar çekildi ve 5 kere 1 dakika olacak şekilde yıkama solüsyonu ile tekrar yıkandı. Her kuyucuğa 90 µL TMB substrat eklenerek, 15-20 dakika 37°C’de karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 50 µL durdurma (stop) solüsyonu her kuyucuğa eklendi ve bekletilmeden mikropılaka okuyucuda (SpectraMax i3, Molecular Devices) 450 nm absorbansta okutuldu (Tablo 9).

Tablo 9. ELISA yöntemi

Yapılan İşlem	Kullanılan Madde	Uygulanan Süre
Santrifüj		1000xg 4°C’ de 20 dk.
Yıkama	Yıkama Solüsyonu	2 x 1 dk.
Standartların ve örneklerin inkübasyonu		37°C’ de 90 dk.
Yıkama	Yıkama Solüsyonu	2 x 1 dk.
Sekonder Antikor Uygulaması	Biotinlenmiş sekonder antikor	37°C’ de 60 dk.
Yıkama	Yıkama Solüsyonu	5 x 1 dk.
Sekonder Antikor Uygulaması	Streptavidin HRP	37°C’ de 30 dk.
Yıkama	Yıkama Solüsyonu	5 x 1 dk.
Boyama	TMB Substrat	37°C’ de 15-20 dk.
Durdurma	Durdurma (stop) solüsyonu	
Mikropılaka okuyucu okutma		
450 nm		

5.7. IN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ MODELİ

VERO hücreleri 24 gözlü kültür kaplarına 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde pasajlandı ve konfluent oluncaya kadar (üç gün) inkübe edildikten sonra monolayer hücre tabakası steril 200 µl sarı pipet ucu yardımıyla çapraz olacak şekilde tek hamlede çizilerek *in vitro* yara iyileşme modeli oluşturuldu. Daha sonra indirekt ko-kültür sistemleri belirlenen gruplara uygun olarak kuruldu ve deney düzeneği 37°C' de %5 CO₂' li atmosfer içeren inkübatörde hücre çoğalması için bırakıldı. Kültürün 0., 1., 2., 3., 4., ve 7.günlerinde yara alanları inverted mikroskop (Olympus IX71, Japan) ile 10x büyütme altında görüntülendi. Elde edilen görüntülerden toplam alan ve yara alanları Image J görüntü analiz programı (1.50i, National Institutes of Health, USA) kullanılarak hesaplandı. Programdan elde edilen toplam alan ve yara alanı değerlerinden Microsoft Excel (Microsoft®, USA) programı kullanılarak yüzde (%) yara alanları hesaplandı. 1., 2., 3., 4., ve 7. günlerde elde edilen oranlar sıfırıncı gün ile karşılaştırılarak yüzde (%) kapanma oranları belirlendi. Formül: % Yara Alanı Kapanma = [(sıfırıncı gün yara genişliği – çalışılan gün yara genişliği) x100] / sıfırıncı gün yara genişliği]. Her bir deney grubu için beş farklı alandan görüntü alındı ve elde edilen sonuçların ortalamaları hesaplandı. Çalışma birbirinden bağımsız üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

5.8. BULGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İmmunoreaktivite boyanma şiddetleri; boyanma yok (0), zayıf (1), orta (2), kuvvetli (3) ve çok kuvvetli (4) olarak değerlendirildi. Her grup için rastgele seçilmiş 5 alanda her 100 hücre içinde pozitif boyanan hücreler sayılarak semi-kantitatif H-SCORE değerleri hesaplandı. [H-SCORE: $\sum P_i (i+1)$ (P_i : % pozitif boyanmış hücre sayısı; i : boyanma şiddeti)]. İmmunositokimya sonuçları “ortalama $\pm$ standart sapma” olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) programı kullanılarak; CD133 HSCORE değerlerinin tayini için “One-way ANOVA (nonparametric)” istatistiksel testi ve post-test olarak da “Tukey’s Multiple Comparison Test” ile değerlendirildi. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel yönden anlamlı olarak kabul edildi. α -SMA, Vimentin, FSP-1, Sitokeratin 19 ve CD31 HSCORE değerlerinin tayininde ise SPSS Version 18

(SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) kullanılarak non-parametrik Kruskal-Wallis H testi ile değerlendirildi ve $p<0,05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Grafikler GraphPad Prism 6 programı ile çizildi.

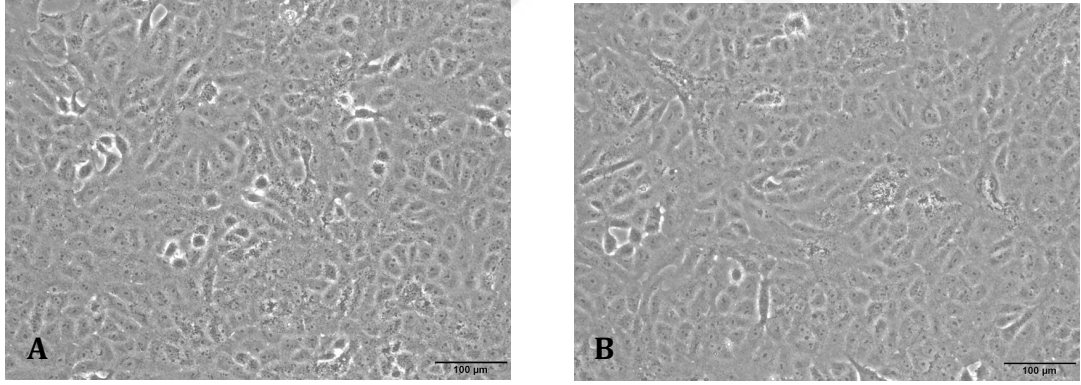
ELISA analizi sonucunda standartlardan elde edilen veriler ile her bir antikor için GraphPad Prism 6 programı kullanılarak OD/konsantrasyon eğrileri oluşturuldu. Örneklerden elde edilen verilere ait OD değerlerinin ortalamaları kullanılarak karşılık gelen konsantrasyon değerleri grafik üzerinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlar SPSS Version 18 kullanılarak non-parametrik Kruskal-Wallis H testi ile değerlendirildi. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel yönden anlamlı olarak kabul edildi. Grafikler GraphPad Prism 6 programı ile çizildi.

Yara modeli sonuçları arasındaki alan farkının kantitatif olarak ölçülmesi için Image J (1.50i, National Institutes of Health, USA) görüntü analiz yöntemi kullanıldı. Analiz için her grup için $\times 100$ büyüklükteki 5 alanın görüntüleri kullanıldı. “Analyze” sekmesi altında “Set Scale” kısmından piksel cinsinden birimin mikrometre (μm) cinsine dönüşümü sağlandı. Analiz edilecek görüntü programa yüklendikten sonra “Freehand” simgesi kullanarak yara alanı çizildi ve takiben “Analyze” sekmesi altında “Measure (Cmd+M)” kısmına tıklanarak seçilen alan değeri belirlendi. Bütün alana oranı hesaplanarak “% Yara Alanı” belirlendi ve GraphPad Prism 6 programı kullanılarak “Two-way ANOVA (nonparametric)” istatistiksel testi ve post-test olarak da “Tukey’s Multiple Comparison Test” ile değerlendirildi. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel yönden anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

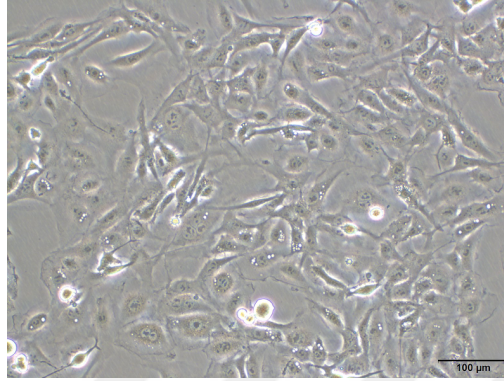
6.1. KOLON KANSER HÜCRELERİNİN VE VERO HÜCRELERİNİN KÜLTÜRÜ

VERO hücrelerinin kültür koşullarında adherent özellikte ve epitelyal hücre karakteristiğine sahip oldukları gözlemlendi (Resim 1). Hücrelerin çoğaltılması sırasında DMEM ve RPMI-1640 hücre vasatları kullanıldı ve hücre vasatı değişikliğinin VERO hücrelerinin morfolojisi ve konfluent olma süreleri ile ilgili özelliklerini etkilemediği ışık mikroskopik olarak tespit edildi. Bilinen ikilenme zamanı olan 24 saate uygun şekilde çoğaldıkları gözlenen VERO hücreleri %70-80 konfluent olduklarında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Vasat farklılığının hücrelerin ikilenme zamanlarını değiştirmedeği belirlendi.



Resim 1. DMEM hücre vasatında kültüre edilen VERO hücrelerinin genel görüntüsü (A), RPMI-1640 hücre vasatında kültüre edilen VERO hücrelerinin genel görüntüsü (B). Ölçek: 100 µm.

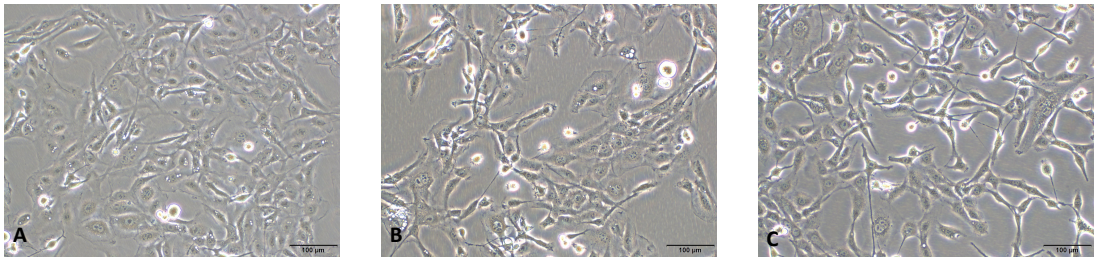
COLO-741 metastatik kolon kanser hücreleri kültür koşullarında adherent özellikte oldukları ve iğsi hücre tipi morfolojisine sahip oldukları gözlemlendi (Resim 2). COLO-741 hücrelerinin ikilenme zamanı 30 saat olarak belirlendi ve %70-80 konfluent olduklarında pasajlama işlemi gerçekleştirildi.



Resim 2. COLO-741 hücrelerin genel görüntüsü. Ölçek: 100 µm.

6.2. KOLON KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ELDESİ

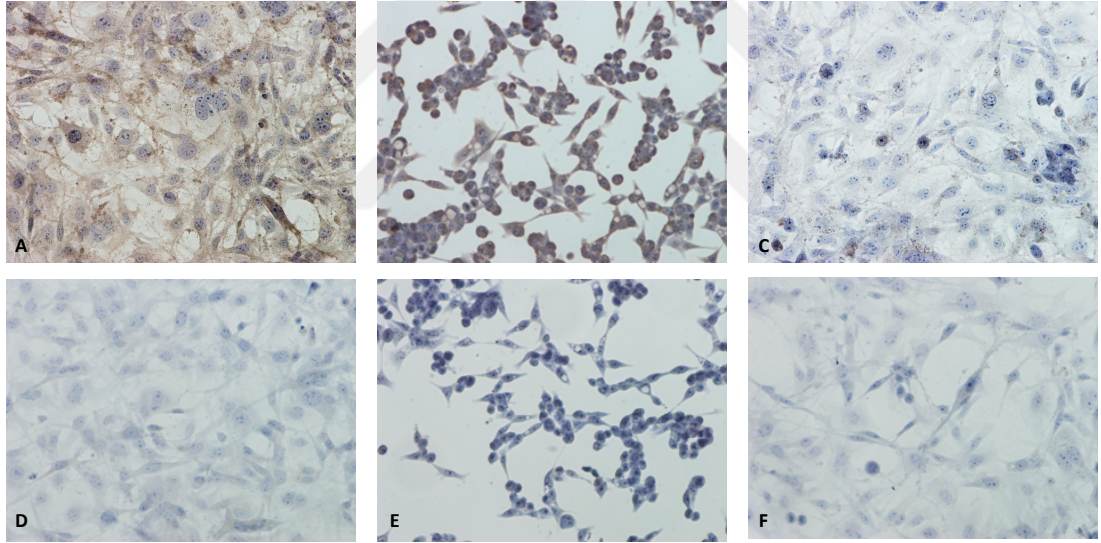
COLO-741 metastatik kolon kanser hücreleri miniMACS sistemi ile CD133+ ve CD133- hücrelerin ayrımı yapıldıktan sonra kültüre ayrı kültür kaplarında devam edildi. Ayrı kültüre edilen CD133+, CD133- ve ayırım yapılmayan COLO-741 hücrelerin morfolojik olarak birbirlerine benzer, iğsi yapıda oldukları gözlemlendi ve hücreler arasında morfolojik olarak farklılık saptanmadı (Resim 3A, 3B, 3C).



Resim 3. COLO-741 (A), COLO-741 CD133+ (B) ve COLO-741 CD133- (C) kolon kanseri hücrelerinin kültür işleminin 24. saatindeki inverted mikroskop görüntüleri. Ölçek: 100 µm.

6.3. KOLON KANSER KÖK HÜCRELERİNİN KARAKTERİZASYONU

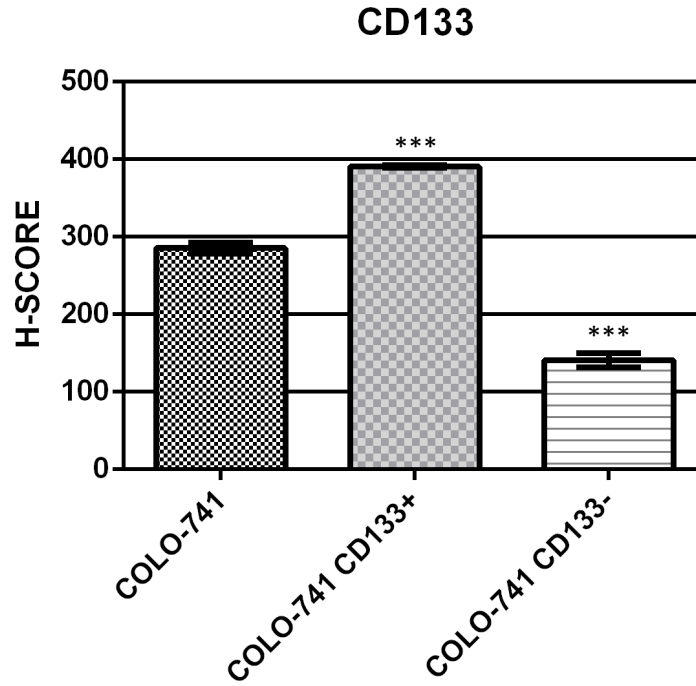
CD133+ ve CD133- hücrelerin histolojik olarak karakterizasyonu için anti-CD133 antikoru kullanılarak indirekt immunositokimyasal analizi gerçekleştirildi. Ayırma işleminden sonra 48 saat kültüre edilen hücrelerin CD133 immunoreaktiviteleri incelendiğinde; COLO-741 hücrelerinde orta şiddette (++) ve yer yer zayıf (+) (Resim 4A), CD133+ hücrelerinde kuvvetli (+++) (Resim 4B) immunoreaktivite tespit edilirken CD133- hücrelerinde ise nadiren zayıf (+/-) CD133 immunoreaktivitesi olduğu gözlemlendi (Resim 4C). H-SCORE değerleri sırası ile $285,8 \pm 7,09$; $390,8 \pm 1,64$ ve $139 \pm 8,94$ olarak hesaplandı (Tablo 10) (Şekil 25). H-SCORE değerlerine göre; CD133+ ve CD133- COLO-741 hücrelerinin COLO-741 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi ($p < 0,001$). Bütün kanser hücrelerine ait negatif kontrol boyamaları gerçekleştirildi (Resim 4D, 4E, 4F).



Resim 4. COLO-741 (A), COLO-741 CD133+ (B) ve COLO-741 CD133- (C) hücrelerine ait CD133 immunoreaktivitelerinin görüntüleri. COLO-741 (D), COLO-741 CD133+ (E) ve COLO-741 CD133- (F) hücrelerine ait negatif kontrol boyamaları.

Tablo 10. CD133 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

CD133, H-SCORE değerleri	
COLO 741	285,8 ± 7,09
COLO-741 CD133+	390,8 ± 1,64
COLO-741 CD133-	139 ± 8,94



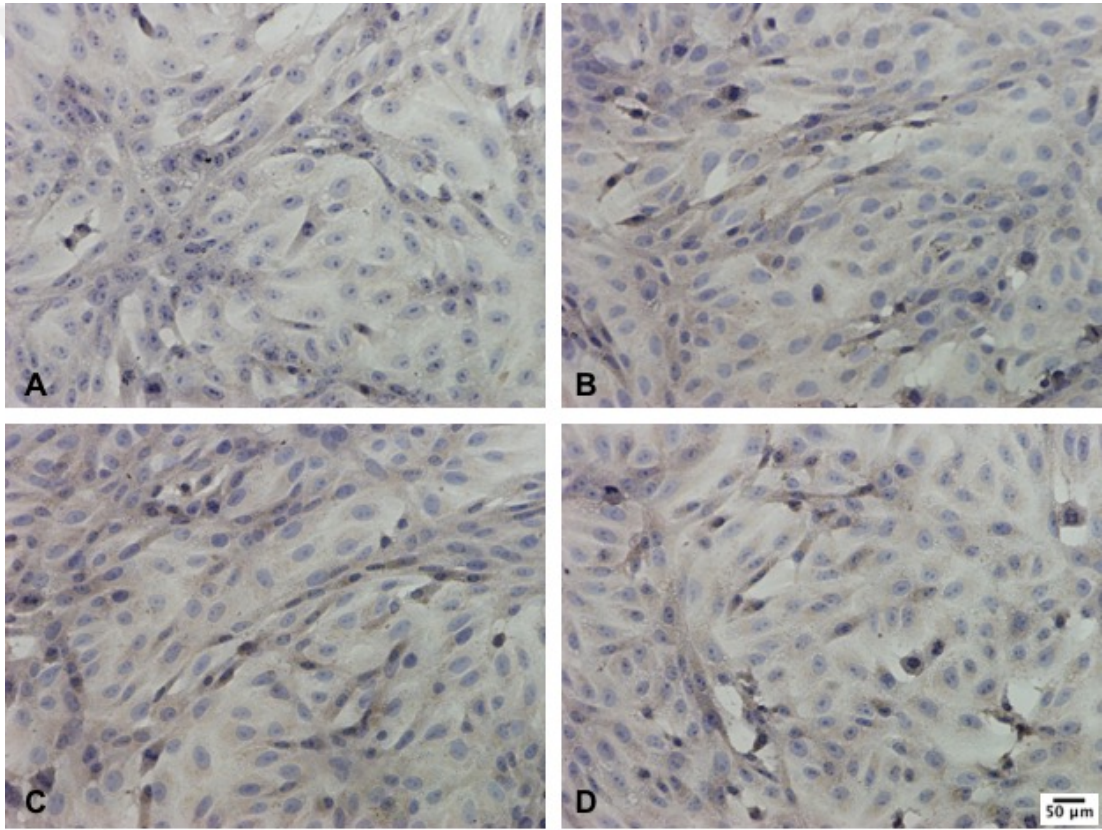
Şekil 25. Kanser hücrelerine ait CD133 H-SCORE değerleri (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

6.4. VERO HÜCRELERİNİN İNDİREKT KO-KÜLTÜR SONRASINDA İMMUNOSİTOKİMYASAL BULGULARI

6.4.1. α-SMA immunoreaktivitesi

VERO hücrelerinin COLO-741, CD133+ COLO-741 ve CD133- COLO_741 hücreleri ile birlikte kültürü sonrasında, kültürün birinci gününde α-SMA immunoreaktivitesinin Grup 1 VERO hücrelerinde zayıf (+), yer yer orta (++) (Resim 5A); Grup 2 VERO hücrelerinde orta (++) (Resim 5B), Grup 3 ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise orta (++) şiddette immunoreaktivite gözlemlendi (Resim 5C, 5D).

Birinci gün kültür sonucunda gruplara ait α -SMA H-SCORE değerleri sırası ile $215,4 \pm 4,04$; $285 \pm 4,24$; $305,2 \pm 6,26$ ve $242 \pm 13,79$ olarak hesaplandı (Tablo 11). Kontrol grubu ile ko-kültür grupları karşılaştırıldığında, α -SMA immunoreaktivitesinin ko-kültür gruplarında yüksek olduğu ve kontrol grubuna göre Grup 2 ve Grup 3 sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,001$) (Şekil 26). VERO hücrelerinde birinci gün kültür sonucunda en yüksek α -SMA immunoreaktivitesi ise CD133+ COLO-741 hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 3'te gözlemlendiği tespit edildi (Tablo 11) (Şekil 26). Kontrol grubu ve CD133-hücreler ile ko-kültüre edilen Grup 4 VERO hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 26).



Resim 5. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün α -SMA immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.

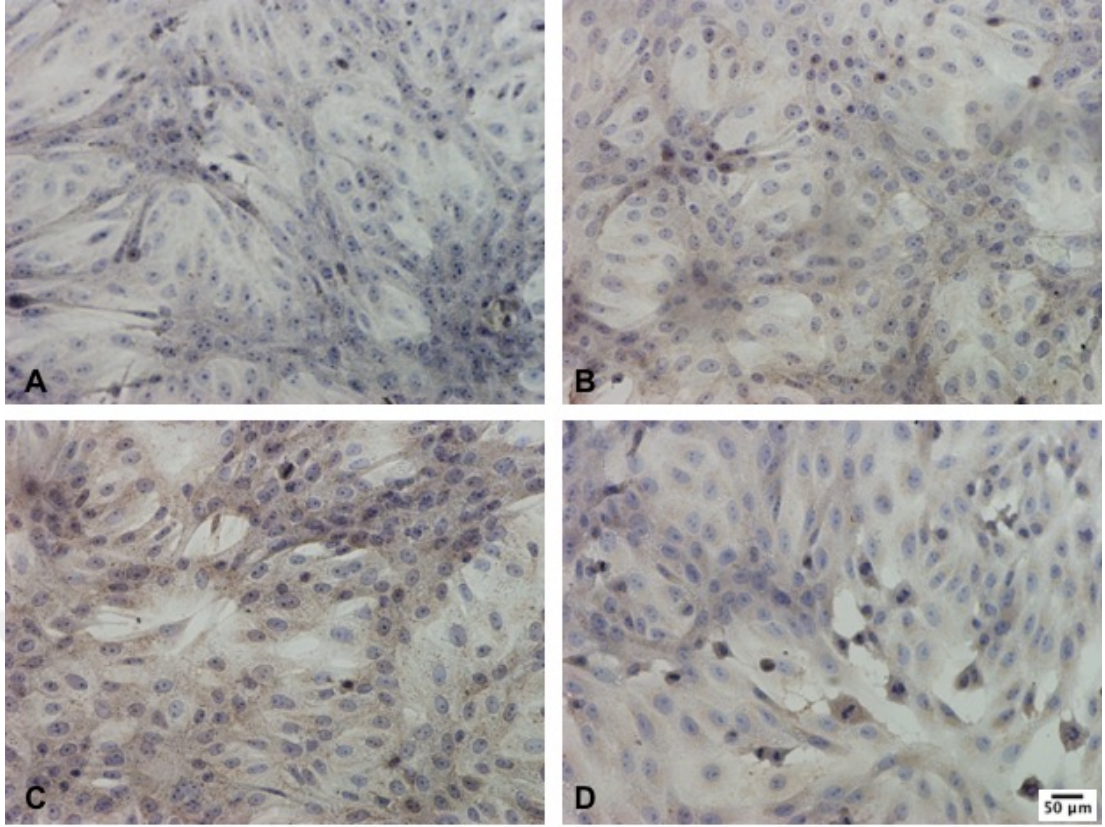
Tablo 11. Birinci gün α -SMA immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	α -SMA, H-SCORE değerleri
Grup 1	215,4 $\pm$ 4,04
Grup 2	285 $\pm$ 4,24
Grup 3	305,2 $\pm$ 6,26
Grup 4	242 $\pm$ 13,79

Üçüncü gün kültür sonucunda α -SMA immunoreaktivitesinin Grup 1 VERO hücrelerinde zayıf/orta (+/++) (Resim 6A), Grup 2 VERO hücrelerinde orta (++) yer yer zayıf (+) (Resim 6B), Grup 3 VERO hücrelerinde kuvvetli (+++) yer yer orta (++) (Resim 6C) ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) yer yer orta (++) olduğu belirlendi (Resim 6D).

Üçüncü gün kültür sonucunda gruplara ait α -SMA H-SCORE değerleri sırası ile 233,2 $\pm$ 11,80; 284,4 $\pm$ 19,62; 352,8 $\pm$ 7,56 ve 244,8 $\pm$ 6,10 olarak hesaplandı (Tablo 12). İstatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde immunoreaktivitenin Grup 2 ve Grup 3'te yüksek olduğu ve bu gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark olduğu belirlendi ($p < 0,001$) (Tablo 12) (Şekil 26). VERO hücrelerinde üçüncü gün kültür sonucunda en yüksek α -SMA immunoreaktivitesi ise CD133+ hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 3'te gözlemlendi (Tablo 12). Kontrol grubu ve Grup 4 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 26).

Deney gruplarına ait üçüncü gün sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında Grup 1 ($p < 0,05$) ve Grup 3'te ($p < 0,001$) α -SMA immünoreaktivitesine ait artışın istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği, Grup 2 ve Grup 4'te istatistiksel olarak anlamlılık olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 26).



Resim 6. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün α -SMA immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.

Tablo 12. Üçüncü gün α -SMA immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

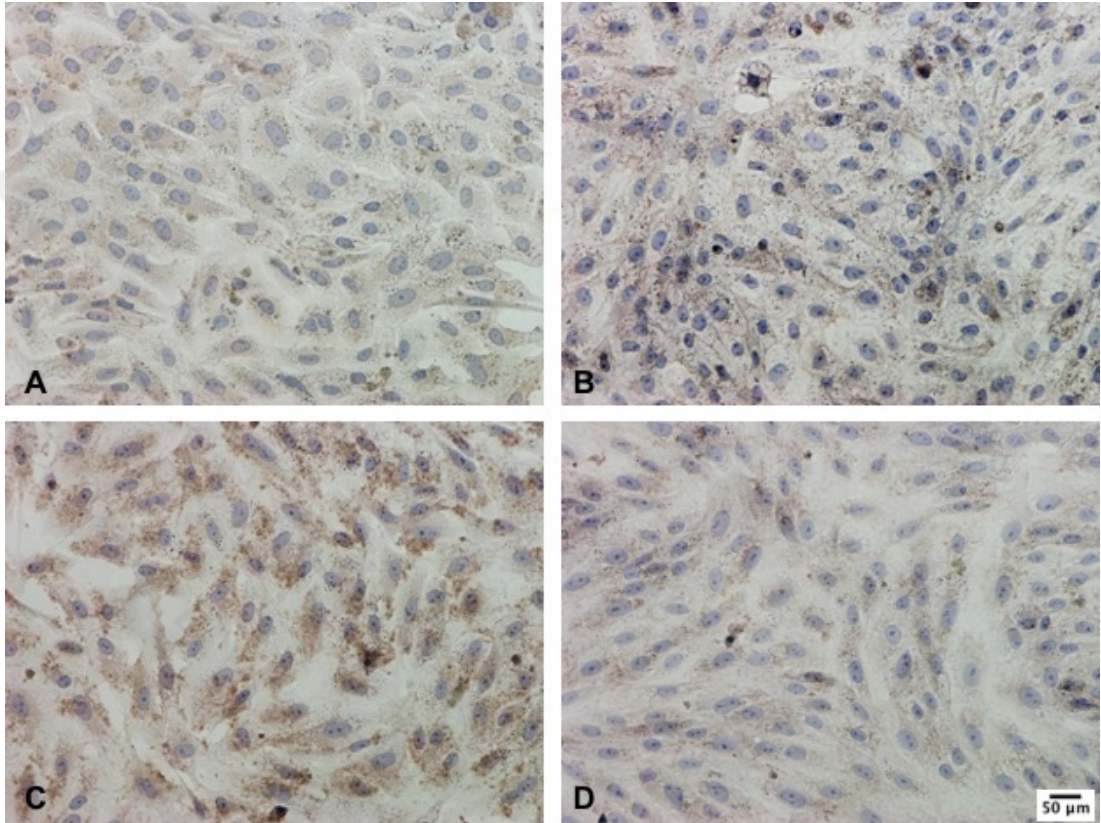
Deney Grupları	α -SMA, H-SCORE değerleri
Grup 1	233,2 $\pm$ 11,80
Grup 2	284,4 $\pm$ 19,62
Grup 3	352,8 $\pm$ 7,56
Grup 4	244,8 $\pm$ 6,10

Yedinci gün kültür sonucunda Grup 1 VERO hücrelerinde α -SMA immunoreaktivitelerinin zayıf/orta (+/++) (Resim 7A), Grup 2 ve Grup 3 VERO hücrelerinde orta/kuvvetli (++) (Resim 7B) ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise orta (++) ve yer yer zayıf (+) şiddette olduğu belirlendi (Resim 7C, 7D).

Yedinci gün kültür sonucunda gruplara ait α -SMA H-SCORE değerleri sırası ile 248,4 $\pm$ 9,10; 336 $\pm$ 8,67; 350,8 $\pm$ 4,60 ve 273,8 $\pm$ 12,85 olarak hesaplandı (Tablo 13). İstatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde immunoreaktivitenin ko-kültür

gruplarında yüksek olduğu ve kontrol grubuna göre anlamlı fark olduğu belirlendi (Şekil 26). VERO hücrelerinde yedinci gün kültür sonucunda en yüksek α -SMA immunoreaktivitesinin CD133+ hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 3'te olduğu gözlemlendi (Tablo 13).

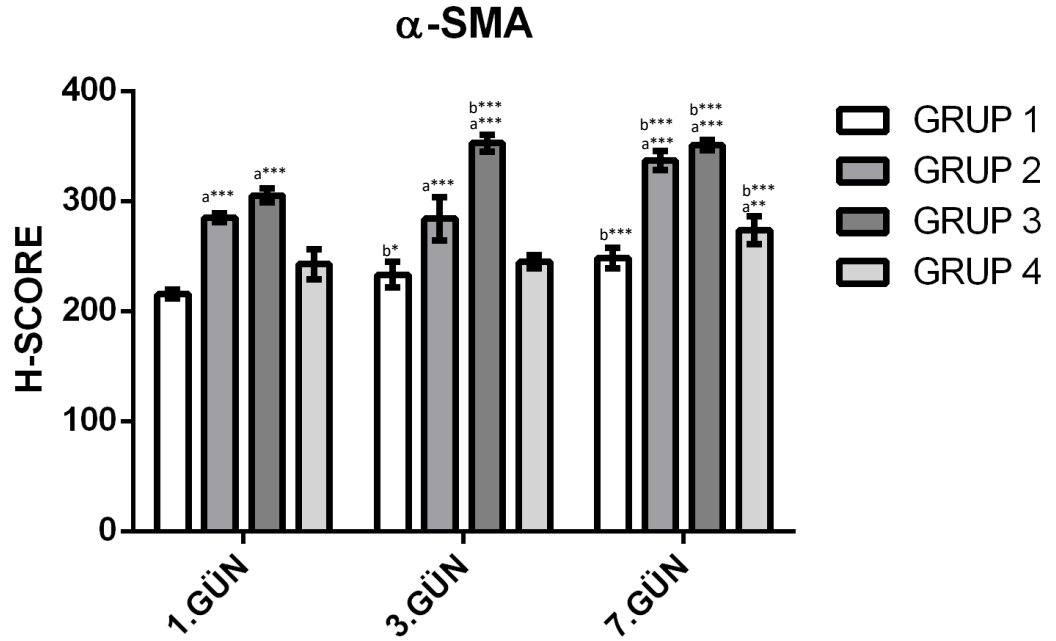
Yedinci gün immunoreaktivite sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında, yedinci gün sonunda bütün gruplara ait α -SMA immunoreaktivitesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$) (Şekil 26).



Resim 7. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün α -SMA immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μ m.

Tablo 13. Yedinci gün α -SMA immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	α -SMA, H-SCORE değerleri
Grup 1	$248,4 \pm 9,10$
Grup 2	$336 \pm 8,67$
Grup 3	$350,8 \pm 4,60$
Grup 4	$273,8 \pm 12,85$



Şekil 26. Tüm gruplara ait α -SMA H-SCORE grafiği.

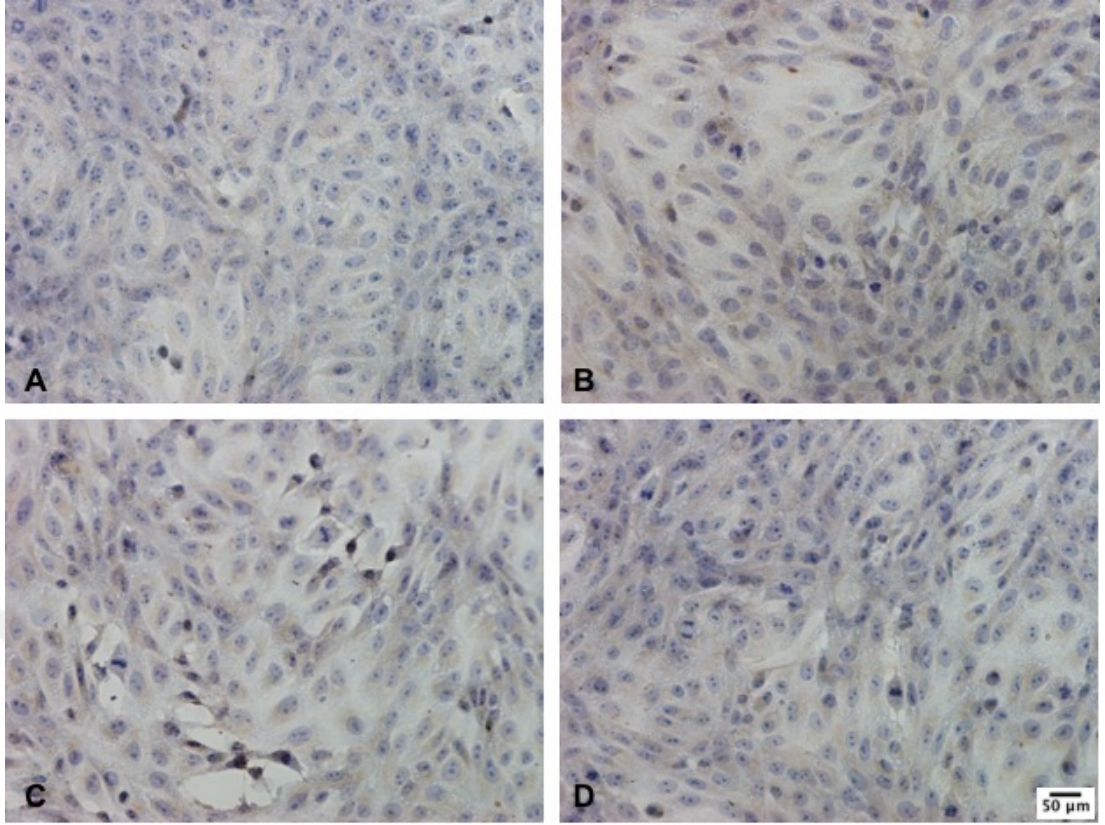
^a Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$).

^b Birinci güne göre istatistiksel anlamlı (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$, (*) $p < 0,05$).

6.4.2. Vimentin immunoreaktivitesi

VERO hücrelerinin COLO-741, CD133+ COLO-741 ve CD133- COLO-741 hücreleri ile birlikte kültürü sonrasında, kültürün birinci gününde vimentin immunoreaktivitesinin bütün gruplara ait VERO hücrelerinde orta (++) şiddette olduğu gözlemlendi (Resim 8A, 8B, 8C, 8D).

Birinci gün kültür sonucunda gruplara ait vimentin H-SCORE değerleri sırası ile $297,6 \pm 6,23$; $300,4 \pm 9,74$; $300,4 \pm 6,23$ ve $298,4 \pm 3,29$ olarak hesaplandı (Tablo 14). İstatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile ko-kültür grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 27).



Resim 8. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün vimentin immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

Tablo 14. Birinci gün vimentin immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

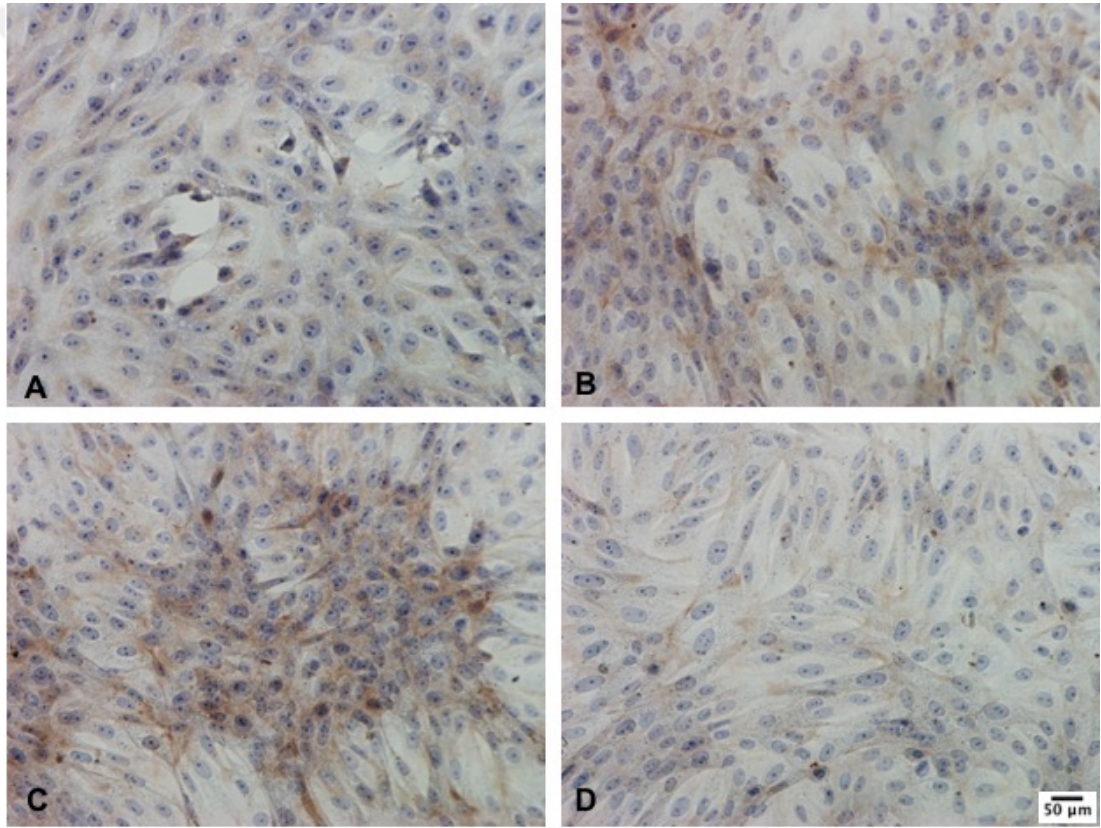
Deney Grupları	Vimentin, H-SCORE değerleri
Grup 1	297,6 ± 6,23
Grup 2	300,4 ± 9,74
Grup 3	300,4 ± 6,23
Grup 4	298,4 ± 3,29

Üçüncü gün kültür sonucunda vimentin immunoreaktivitesinin Grup 1 VERO hücrelerinde orta (++) (Resim 9A), Grup 2 VERO hücrelerinde orta (++) yer yer kuvvetli (+++) (Resim 9B), Grup 3 VERO hücrelerinde orta/kuvvetli (++) (+++) (Resim 9C) ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise orta (++) şiddette olduğu belirlendi (Resim 9D).

Üçüncü gün kültür sonucunda gruplara ait vimentin H-SCORE değerleri sırası ile 305,2 ± 5,76; 320,8 ± 7,56; 347,6 ± 15,71 ve 295,2 ± 4,15 olarak hesaplandı

(Tablo 15). Kontrol grubu ile ko-kültür grupları karşılaştırıldığında Grup 2 ($p<0,05$) ve Grup 3 ($p<0,001$) vimentin immunoreaktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 27). VERO hücrelerinde üçüncü gün kültür sonucunda en yüksek vimentin immunoreaktivitesi ise CD133+ hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 3'te gözlemlendi (Tablo 15). Kontrol grubu ve CD133- hücreler ile ko-kültüre edilen Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 27).

Deney gruplarına ait üçüncü gün sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında vimentin immunoreaktivitesindeki artışın Grup 2 ($p<0,01$) ve Grup 3'te ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlılık gösterir iken, Grup 1 ve Grup 4'te ise istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 27).



Resim 9. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün vimentin immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

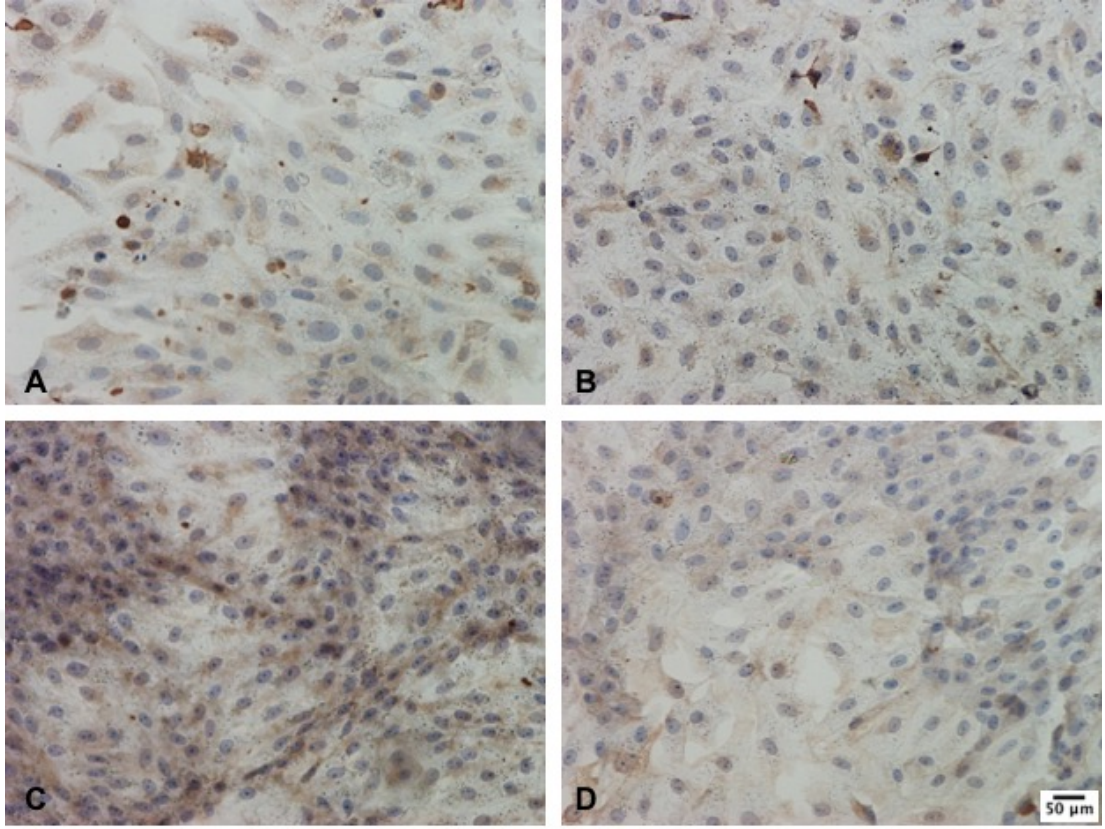
Tablo 15. Üçüncü gün vimentin immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	Vimentin, H-SCORE değerleri
Grup 1	305,2 ± 5,76
Grup 2	320,8 ± 7,56
Grup 3	347,6 ± 15,71
Grup 4	295,2 ± 4,15

Yedinci gün kültür sonucunda Grup 1 ve Grup 2 VERO hücrelerinde vimentin immunoreaktivitesinin orta (++) (Resim 10A, 10B), Grup 3 VERO hücrelerinde orta/kuvvetli (++) (Resim 10C) ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise orta (++) şiddette olduğu belirlendi (Resim 10D).

Yedinci gün kültür sonucunda gruplara ait vimentin H-SCORE değerleri sırası ile $297 \pm 2,74$; $299,8 \pm 8,07$; $369 \pm 6,16$ ve $298,8 \pm 7,46$ olarak hesaplandı (Tablo 16). VERO hücrelerinde yedinci gün kültür sonucunda en yüksek vimentin immunoreaktivitesi CD133+ hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 3'te gözlemlendi ve kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,001$) (Şekil 27). Kontrol grubu ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi ($p > 0,05$) (Şekil 27).

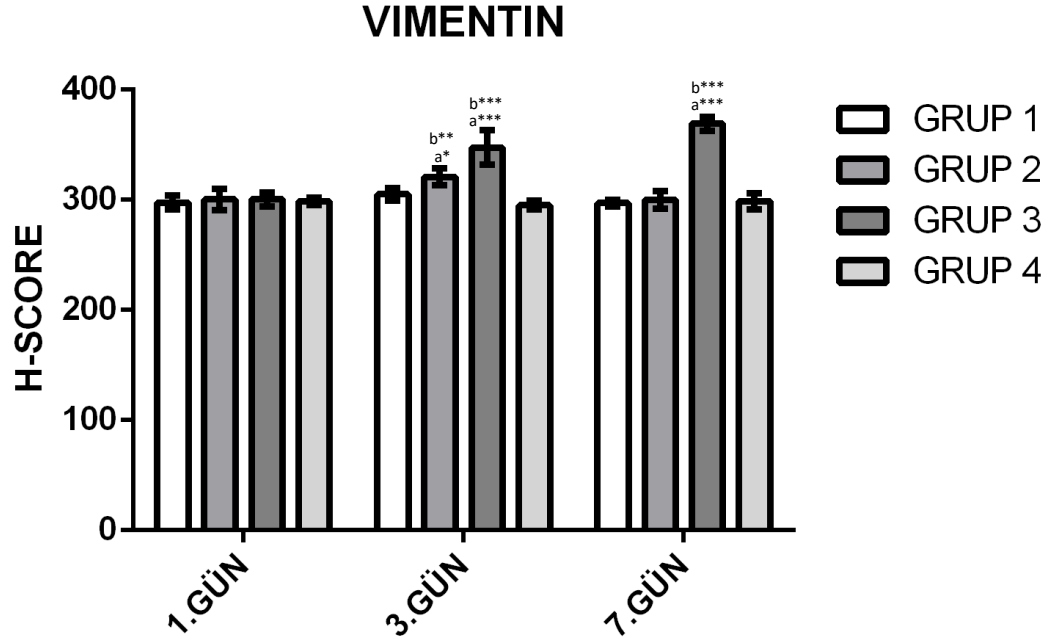
Yedinci gün immunoreaktivite sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında ise yedinci gün sonunda sadece Grup 3'e ait vimentin immunoreaktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği tespit edildi ($p < 0,001$) (Şekil 27).



Resim 10. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün vimentin immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

Tablo 16. Yedinci gün vimentin immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	Vimentin, H-SCORE değerleri
Grup 1	$297 \pm 2,74$
Grup 2	$299,8 \pm 8,07$
Grup 3	$369 \pm 6,16$
Grup 4	$298,8 \pm 7,46$



Şekil 27. Tüm gruplara ait vimentin H-SCORE grafiği.

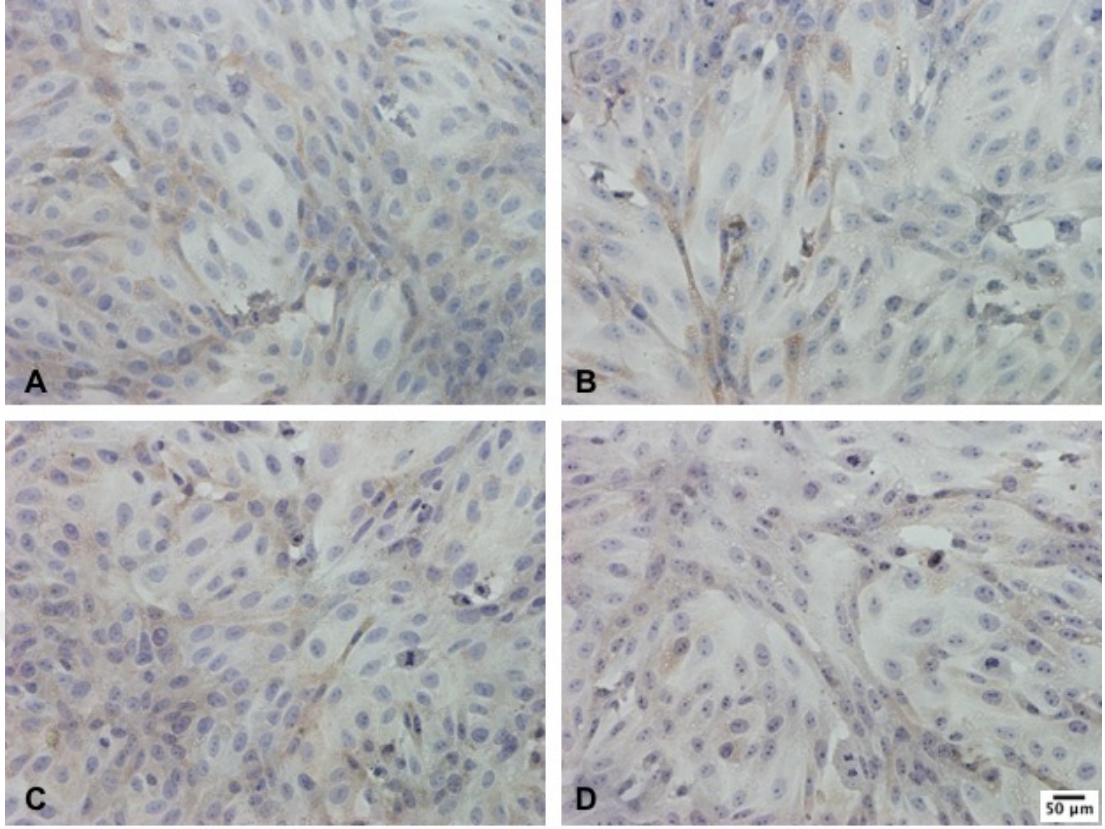
^a Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

^b Birinci güne göre istatistiksel anlamlı (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

6.4.3. FSP-1 immunoreaktivitesi

VERO hücrelerinin COLO-741, CD133+ ve CD133- kanser hücreleri ile birlikte kültürü sonrasında, kültürün birinci gününde FSP-1 immunoreaktivitesinin Grup 1 ve Grup 2 VERO hücrelerinde zayıf (+) (Resim 11A, 11B), Grup 3 VERO hücrelerinde zayıf (+) yer yer orta (++) (Resim 11C) şiddette ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) şiddette ve yer yer boyanmamış (-) hücreler olduğu gözlemlendi (Resim 11D).

Birinci gün kültür sonucunda gruplara ait FSP-1 H-SCORE değerleri sırası ile $197,4 \pm 3,72$; $206,6 \pm 14,33$; $209,2 \pm 8,90$ ve $184,4 \pm 4,10$ olarak hesaplandı (Tablo 17). İstatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile ko-kültür grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Şekil 28).



Resim 11. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün FSP-1 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

Tablo 17. Birinci gün FSP-1 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

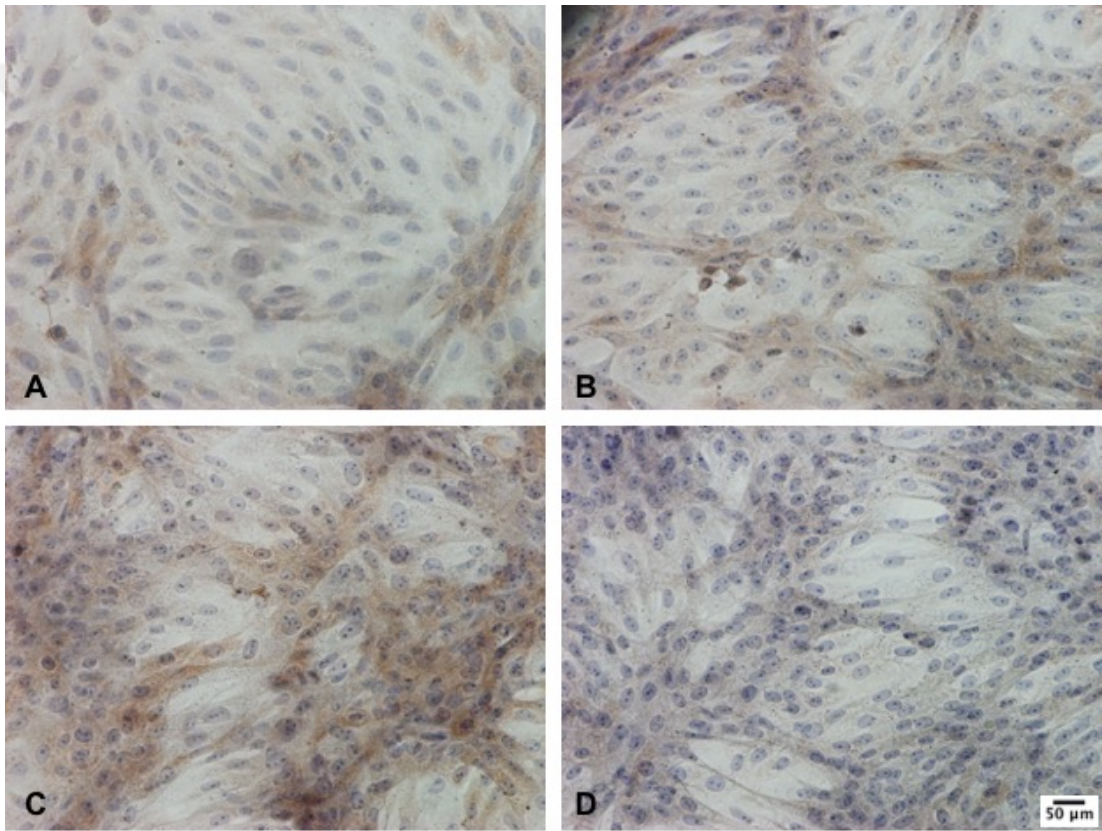
Deney Grupları	FSP-1, H-SCORE değerleri
Grup 1	197,4 ± 3,72
Grup 2	206,6 ± 14,33
Grup 3	209,2 ± 8,90
Grup 4	184,4 ± 4,10

Üçüncü gün kültür sonucunda FSP-1 immunoreaktivitesinin Grup 1 ve Grup 2 VERO hücrelerinde zayıf (+) yer yer orta (++) (Resim 12A, 12B), Grup 3 VERO hücrelerinde zayıf/orta (+/++) (Resim 12C) ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) şiddette olduğu belirlendi (Resim 12D).

Üçüncü gün kültür sonucunda gruplara ait FSP-1 H-SCORE değerleri sırası ile $222 \pm 5,87$; $236,8 \pm 6,87$; $246,8 \pm 8,79$ ve $193,4 \pm 12,56$ olarak hesaplandı (Tablo 18). Kontrol grubu ile ko-kültür grupları karşılaştırıldığında Grup 2 ($p < 0,05$), Grup 3

($p<0,001$) ve Grup 4 ($p<0,001$) FSP-1 immunoreaktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 28). VERO hücrelerinde üçüncü gün kültür sonucunda en yüksek FSP-1 immunoreaktivitesinin CD133+ hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 3'te gözlenirken, en düşük FSP-1 immunoreaktivitesi ise CD133- hücreler ile ko-kültüre edilen Grup 4'te tespit edildi (Tablo 18).

Deney gruplarına ait üçüncü gün sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında FSP-1 immunoreaktivitesindeki artışın Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,001$), Grup 4'te istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 28).



Resim 12. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün FSP-1 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 μm .

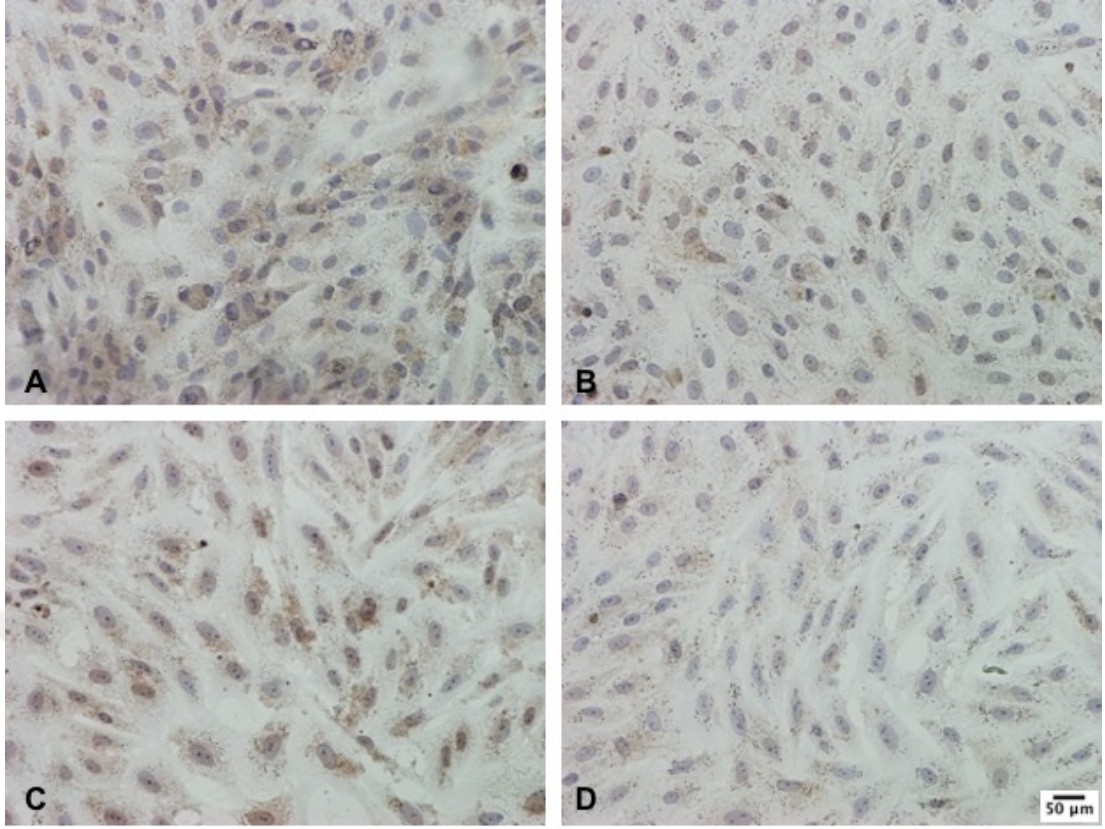
Tablo 18. Üçüncü gün FSP-1 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	FSP-1, H-SCORE değerleri
Grup 1	222 ± 5,87
Grup 2	236,8 ± 6,87
Grup 3	246,8 ± 8,79
Grup 4	193,4 ± 12,56

Yedinci gün kültür sonucunda Grup 1 VERO hücrelerinde FSP-1 immunoreaktivitelerinin zayıf (+) yer yer orta (++) (Resim 13A), Grup 2 VERO hücrelerinde zayıf (+) (Resim 13B), Grup 3 VERO hücrelerinde zayıf (+) yer yer orta (++) (Resim 13C) ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) ve yer yer boyanmamış (-) hücrelerin olduğu belirlendi (Resim 13D).

Yedinci gün kültür sonucunda gruplara ait FSP-1 H-SCORE değerleri sırası ile 231 ± 6,16; 179 ± 7,42; 221 ± 6,16 ve 171,4 ± 5,46 olarak hesaplandı (Tablo 19). VERO hücrelerinde yedinci gün kültür sonucunda en yüksek FSP-1 immunoreaktivitesi kontrol grubunda gözlemlendi (Tablo 19). Kontrol grubu ile Grup 2 ve Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0,001$) (Şekil 28).

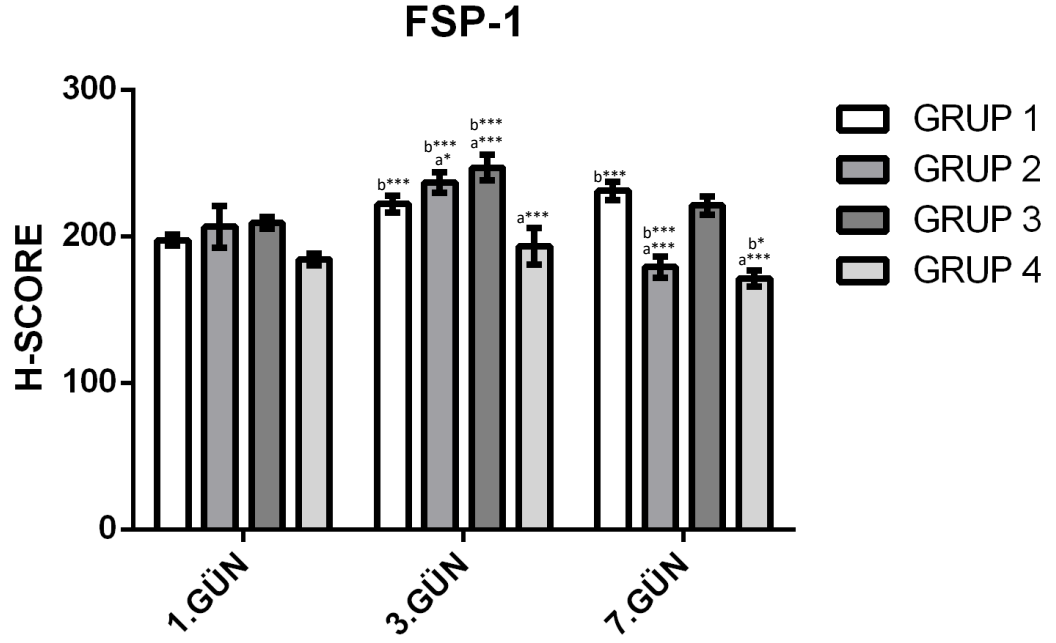
Yedinci gün immunoreaktivite sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında yedinci gün sonunda Grup 1'e ait FSP-1 immunoreaktivitesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,001$); Grup 2 ve Grup 4'e ait FSP-1 immunoreaktivitesindeki azalışın ise istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği belirlendi ($p<0,001$) ($p<0,05$) (Şekil 28).



Resim 13. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün FSP-1 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

Tablo 19. Yedinci gün FSP-1 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	FSP-1, H-SCORE değerleri
Grup 1	231 ± 6,16
Grup 2	179 ± 7,42
Grup 3	221 ± 6,16
Grup 4	171,4 ± 5,46



Şekil 28. Tüm gruplara ait FSP-1 H-SCORE grafiği.

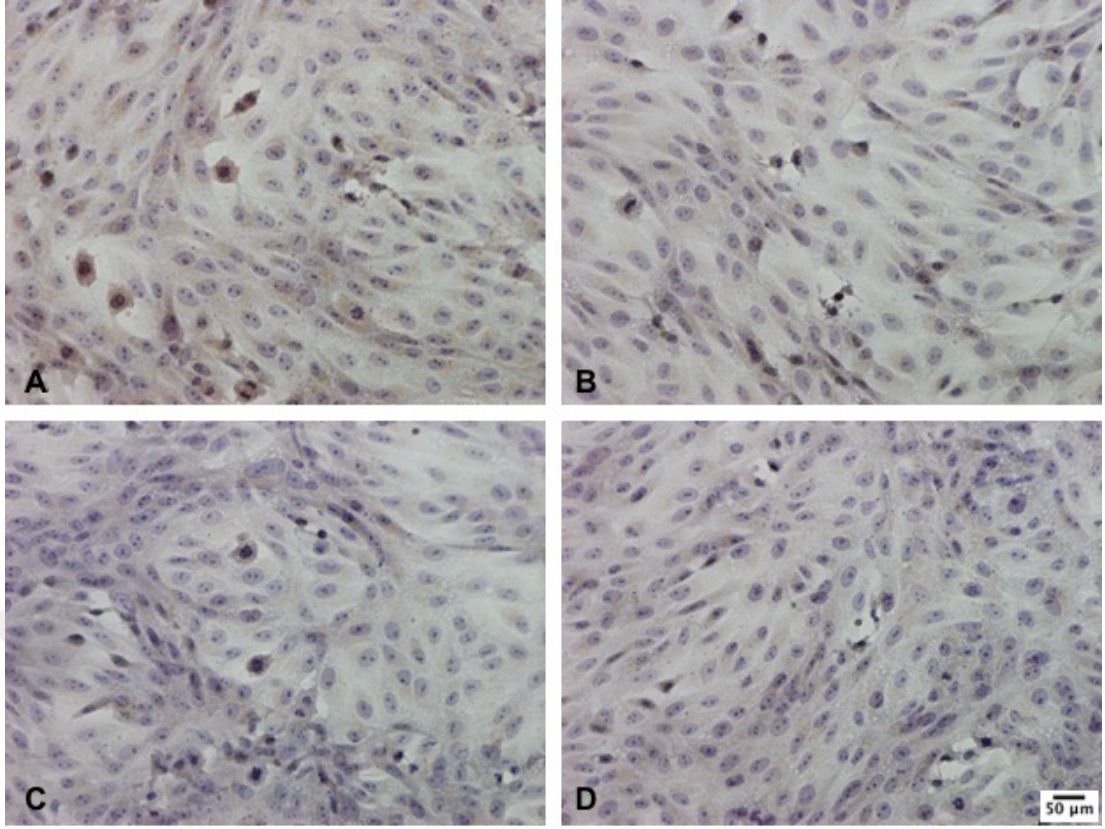
^a Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı (**p<0,01, ***p<0,001, *p<0,05).

^b Birinci güne göre istatistiksel anlamlı (**p<0,01, ***p<0,001, *p<0,05).

6.4.4. CK19 immunoreaktivitesi

VERO hücrelerinin COLO-741, CD133+ ve CD133- kanser hücreleri ile birlikte kültürü sonrasında, kültürün birinci gününde CK19 immunoreaktivitesinin Grup 1 VERO hücrelerinde zayıf (+) (Resim 14A), Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) şiddette ve yer yer boyanmamış (-) hücreler olduğu gözlemlendi (Resim 14B, 14C, 14D).

Birinci gün kültür sonucunda gruplara ait CK19 H-SCORE değerleri sırası ile $200 \pm 5,10$; $154,4 \pm 5,18$; $150,8 \pm 3,63$ ve $149,2 \pm 4,38$ olarak hesaplandı (Tablo 20). VERO hücrelerinde birinci gün kültür sonucunda en yüksek CK19 immunoreaktivitesi kontrol grubu olan Grup 1’de gözlenirken, ko-kültür gruplarında (Grup 2, 3 ve 4) immunoreaktivitenin azaldığı belirlendi. İstatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 29).



Resim 14. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün CK19 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

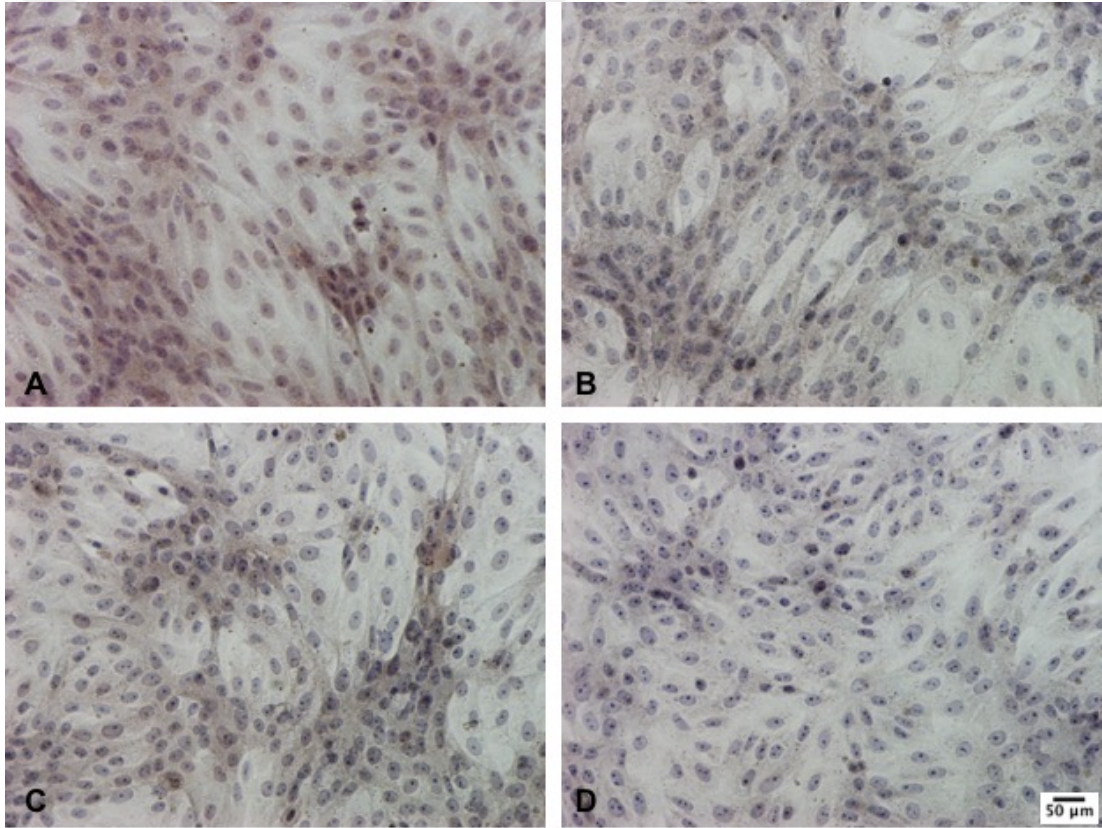
Tablo 20. Birinci gün CK19 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	CK19, H-SCORE değerleri
Grup 1	200 ± 5,10
Grup 2	154,4 ± 5,18
Grup 3	150,8 ± 3,63
Grup 4	149,2 ± 4,38

Üçüncü gün VERO hücrelerinin COLO-741, CD133+ ve CD133- kanser hücreleri ile birlikte kültürü sonrasında CK19 immunoreaktivitesinin Grup 1 VERO hücrelerinde orta (++) yer yer zayıf (+) (Resim 15A), Grup 2 ve Grup 3 VERO hücrelerinde zayıf (+) yer yer orta (++) şiddette (Resim 15B, 15C) ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) ve yer yer boyanmamış (-) hücreler olduğu gözlemlendi (Resim 15D).

Üçüncü gün kültür sonucunda gruplara ait CK19 H-SCORE değerleri sırası ile $250 \pm 8,72$; $186,4 \pm 15,96$; $170 \pm 5,10$ ve $150 \pm 2,45$ olarak hesaplandı (Tablo 21). Kontrol grubu ile ko-kültür grupları karşılaştırıldığında ko-kültür gruplarına ait sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 29). VERO hücrelerinde üçüncü gün kültür sonucunda en yüksek CK19 immunoreaktivitesi ise birinci gün ile benzer şekilde kontrol grubu olan Grup 1’de gözlenirken, ko-kültür gruplarında immunoreaktivitenin azaldığı belirlendi (Tablo 21).

Deney gruplarına ait üçüncü gün sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında CK19 immunoreaktivitesi Grup 1, Grup 2 ve Grup 3’te istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ($p < 0,001$), Grup 4’te istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmedi ($p > 0,05$) (Şekil 29).



Resim 15. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün CK19 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

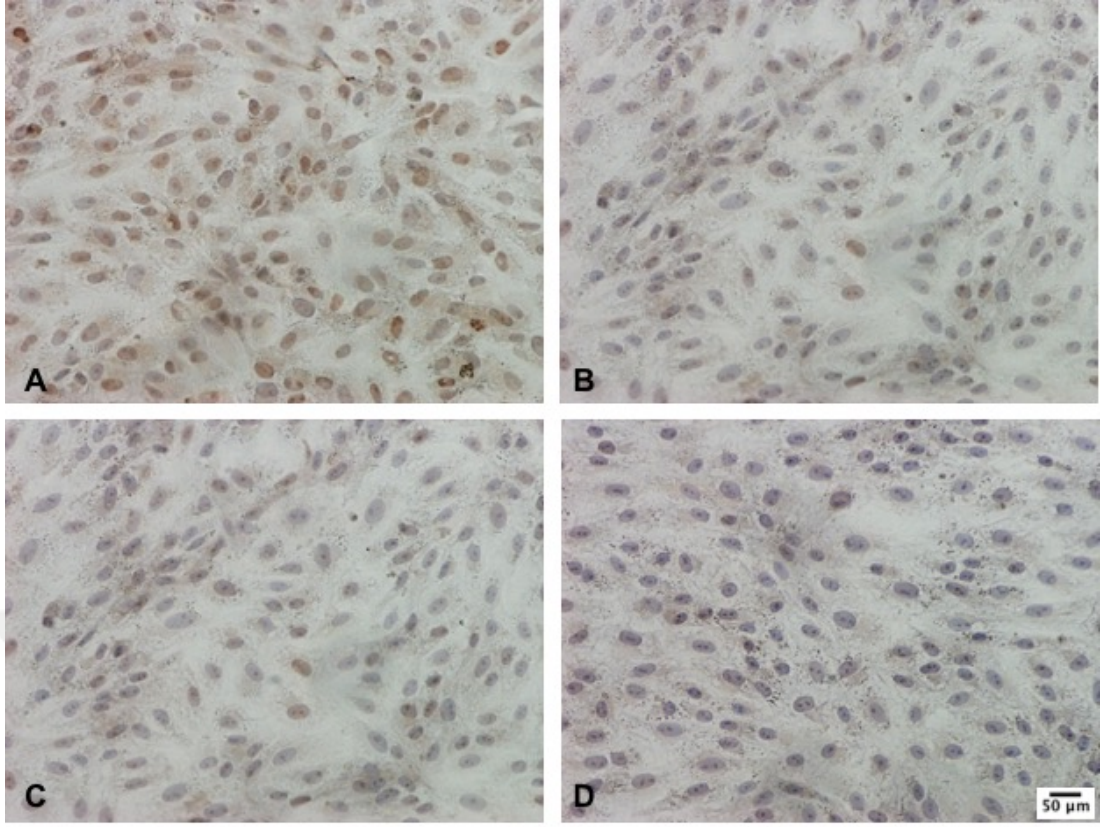
Tablo 21. Üçüncü gün CK19 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	CK19, H-SCORE değerleri
Grup 1	250 ± 8,72
Grup 2	186,4 ± 15,96
Grup 3	170 ± 5,10
Grup 4	150 ± 2,45

Yedinci gün kültür sonucunda Grup 1 ve Grup 2 VERO hücrelerinde CK19 immunoreaktivitelerinin zayıf (+) yer yer orta (++) (Resim 16A, 16B), Grup 3 ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) ve yer yer boyanmamış (-) hücrelerin olduğu belirlendi (Resim 16C, 16D).

Yedinci gün kültür sonucunda gruplara ait CK19 H-SCORE değerleri sırası ile $232 \pm 6,07$; $200 \pm 5,10$; $169,2 \pm 5,02$ ve $150,4 \pm 4,34$ olarak hesaplandı (Tablo 22). VERO hücrelerinde yedinci gün kültür sonucunda en yüksek CK19 immunoreaktivitesi kontrol grubunda gözlemlendi (Tablo 22). Kontrol grubu ile ko-kültür grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p < 0,001$) (Şekil 29).

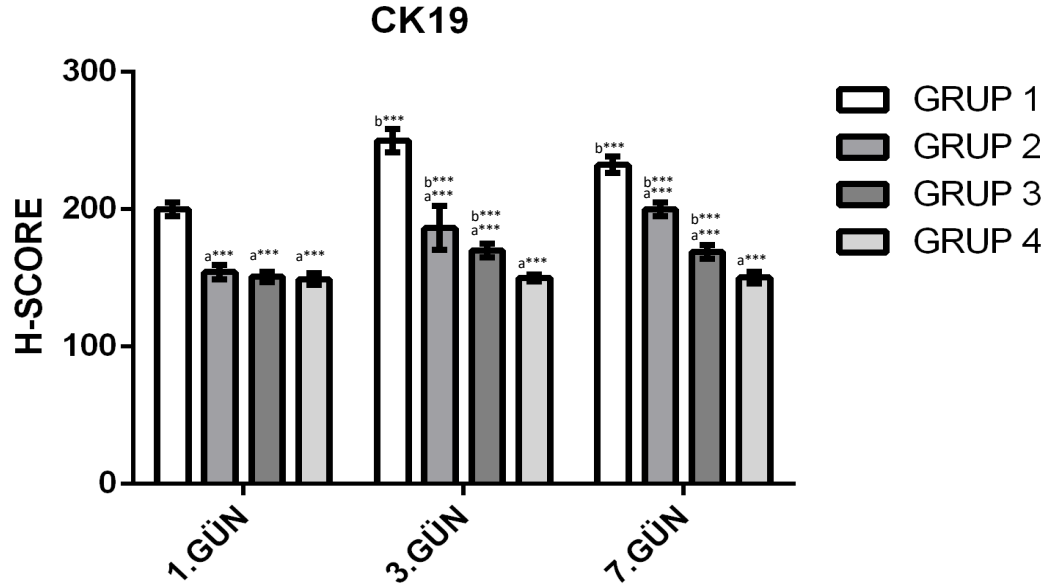
Yedinci gün immunoreaktivite sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'te gözlenen CK19 immünoreaktivitelerindeki artış istatistiksel anlamlılık gösterirken ($p < 0,001$), Grup 4'te istatistiksel anlamlılık belirlenmedi ($p > 0,05$) (Şekil 29).



Resim 16. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün CK19 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

Tablo 22. Yedinci gün CK19 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	CK19, H-SCORE değerleri
Grup 1	232 ± 6,07
Grup 2	200 ± 5,10
Grup 3	169,2 ± 5,02
Grup 4	150,4 ± 4,34



Şekil 29. Tüm gruplara ait CK19 H-SCORE grafiği.

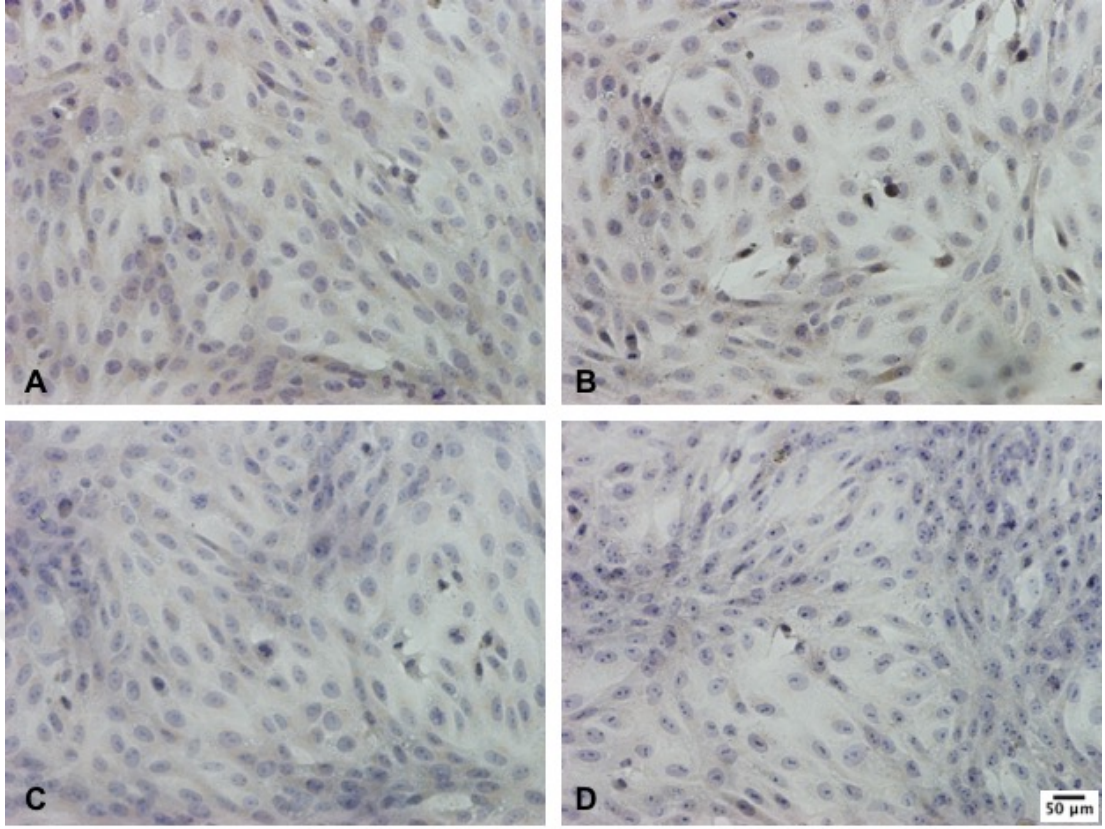
^a Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı (**p<0,001, *p<0,01, *p<0,05).

^b Birinci güne göre istatistiksel anlamlı (**p<0,001, *p<0,01, *p<0,05).

6.4.5. CD31 immunoreaktivitesi

VERO hücrelerinin COLO-741, CD133+ COLO-741 ve CD133- COLO-741 hücreleri ile birlikte kültürü sonrasında, kültürün birinci gününde CD31 immunoreaktivitesinin Grup 1 ve Grup 2 VERO hücrelerinde zayıf (+) (Resim 17A, 17B), Grup 3 ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) şiddette ve yer yer boyanmamış (-) hücreler olduğu gözlemlendi (Resim 17C, 17D).

Birinci gün kültür sonucunda gruplara ait CD31 H-SCORE değerleri sırası ile $200 \pm 5,10$; $190,4 \pm 4,34$; $150,8 \pm 3,63$ ve $143,6 \pm 4,10$ olarak hesaplandı (Tablo 23). VERO hücrelerinde birinci gün kültür sonucunda en yüksek CD31 immunoreaktivitesi kontrol grubu olan Grup 1’de gözlenirken, Grup 3 ve Grup 4 hücrelerinde immunoreaktivitenin azaldığı belirlendi (Tablo 23). İstatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grubu (Grup 1) ile Grup 3 ve Grup 4 ko-kültür grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu ($p<0,001$) fakat Grup 2 ile anlamlı fark bulunmadığı tespit edildi (Şekil 30).



Resim 17. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında birinci gün CD31 immunoreaktiviterleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

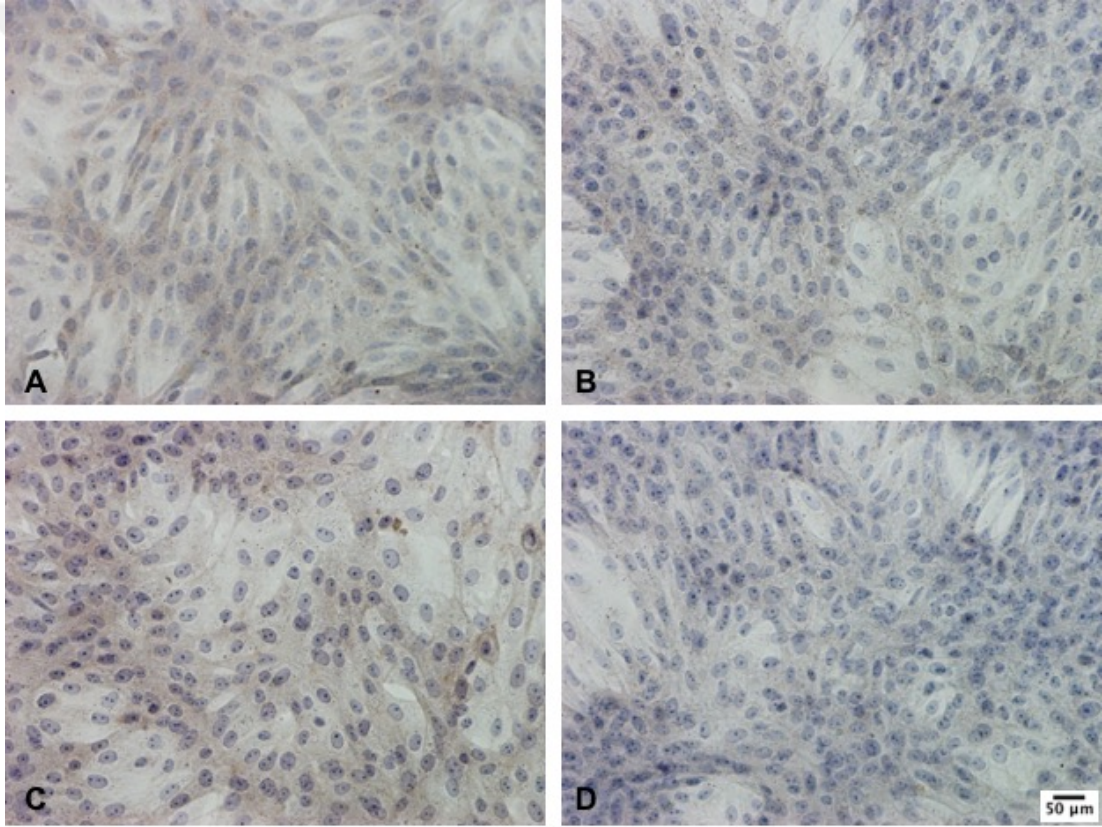
Tablo 23. Birinci gün CD31 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	CD31, H-SCORE değerleri
Grup 1	200 ± 5,10
Grup 2	190,4 ± 4,34
Grup 3	150,8 ± 3,63
Grup 4	143,6 ± 4,10

Üçüncü gün VERO hücrelerinin COLO-741, CD133+ ve CD133- kanser hücreleri ile birlikte kültürü sonrasında CD31 immunoreaktivitesinin Grup 1 VERO hücrelerinde orta (++) yer yer zayıf (+) (Resim 18A), Grup 2 VERO hücrelerinde zayıf (+) şiddette ve yer yer boyanmamış (-) (Resim 18B), Grup 3 VERO hücrelerinde zayıf (+) yer yer orta (+) ve yer yer boyanmamış (-) (Resim 18C) ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise çoğunlukla boyanmamış (-) ve yer yer zayıf (+) olduğu gözlemlendi (Resim 18D).

Üçüncü gün kültür sonucunda gruplara ait CD31 H-SCORE değerleri sırası ile $250 \pm 8,72$; $160 \pm 5,83$; $186 \pm 8,12$ ve $119 \pm 4,18$ olarak hesaplandı (Tablo 24). Kontrol grubu ile ko-kültür grupları karşılaştırıldığında ko-kültür gruplarına ait sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 30). VERO hücrelerinde üçüncü gün kültür sonucunda en yüksek CD31 immunoreaktivitesi birinci gün ile benzer şekilde kontrol grubu olan Grup 1’de gözlemlendi (Tablo 24).

Gruplara ait üçüncü gün sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında CD31 immunoreaktivitesinin artışı Grup 1 ve Grup 3’te istatistiksel anlamlılık gösterirdi ($p<0,001$) (Şekil 30). Grup 2 ve Grup 3’te gözlenen CD31 immunoreaktivitesinin azalışında da istatistiksel anlamlılık belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 30).



Resim 18. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında üçüncü gün CD31 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

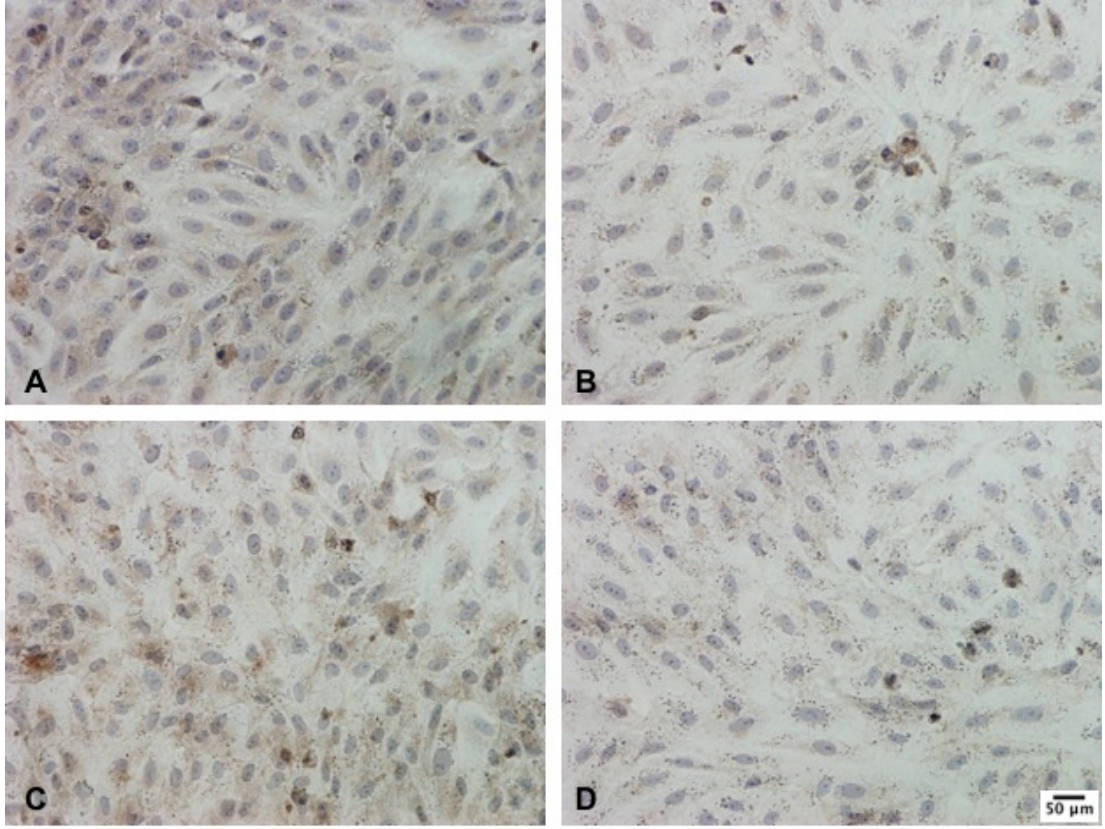
Tablo 24. Üçüncü gün CD31 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	CD31, H-SCORE değerleri
Grup 1	250 ± 8,72
Grup 2	160 ± 5,83
Grup 3	186 ± 8,12
Grup 4	119 ± 4,18

Yedinci gün kültür sonucunda Grup 1 VERO hücrelerinde CD31 immunoreaktivitelerinin zayıf/orta (+/++) (Resim 19A); Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 VERO hücrelerinde ise zayıf (+) ve yer yer boyanmamış (-) hücrelerin olduğu belirlendi (Resim 19B, 19C, 19D).

Yedinci gün kültür sonucunda gruplara ait CD31 H-SCORE değerleri sırası ile $284,4 \pm 4,56$; $155,6 \pm 1,67$; $172,8 \pm 11,37$ ve $145,2 \pm 4,60$ olarak hesaplandı (Tablo 25). VERO hücrelerinde yedinci gün kültür sonucunda en yüksek CD31 immunoreaktivitesi kontrol grubunda gözlemlendi (Tablo 25). Kontrol grubu ile ko-kültür grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu tespit edildi ($p < 0,001$) (Şekil 30).

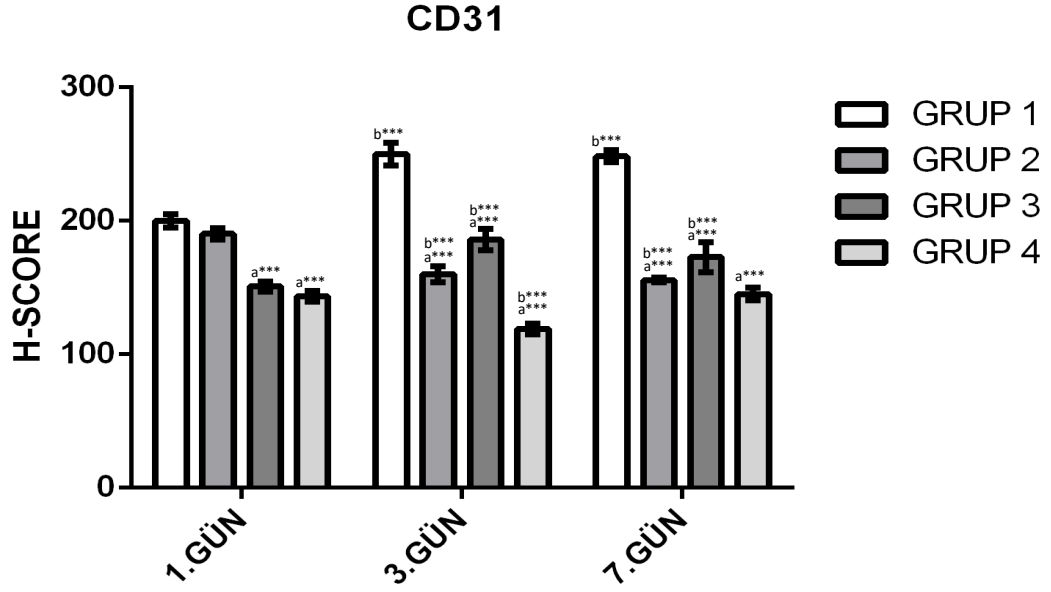
Yedinci gün immunoreaktivite sonuçları birinci gün ile karşılaştırıldığında Grup 1 ve Grup 3'te CD31 immünoreaktivitesinde meydana gelen artış ($p < 0,001$) ile Grup 2'de meydana gelen azalış istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi ($p < 0,001$) (Şekil 30). Yedinci gün Grup 4'te ise CD31 immünoreaktivitesi birinci gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık tespit edilmedi ($p > 0,05$) (Şekil 30).



Resim 19. VERO hücrelerinin indirekt ko-kültür sonrasında yedinci gün CD31 immunoreaktiviteleri. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

Tablo 25. Yedinci gün CD31 immunoreaktivitesine ait H-SCORE değerleri.

Deney Grupları	CD31, H-SCORE değerleri
Grup 1	284,4 ± 4,56
Grup 2	155,6 ± 1,67
Grup 3	172,8 ± 11,37
Grup 4	145,2 ± 4,60

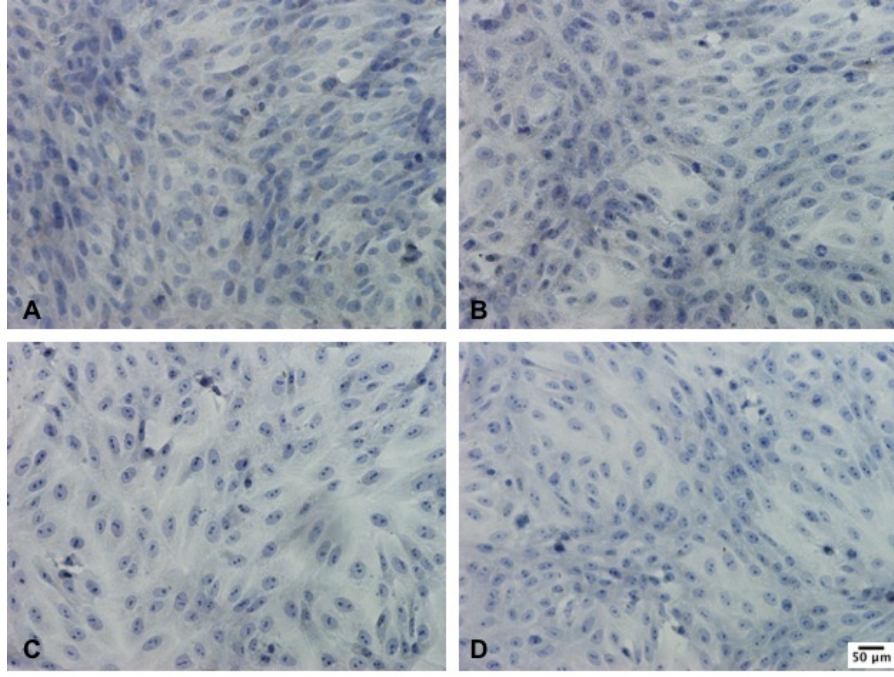


Şekil 30. Tüm gruplara ait CD31 H-SCORE grafiği.

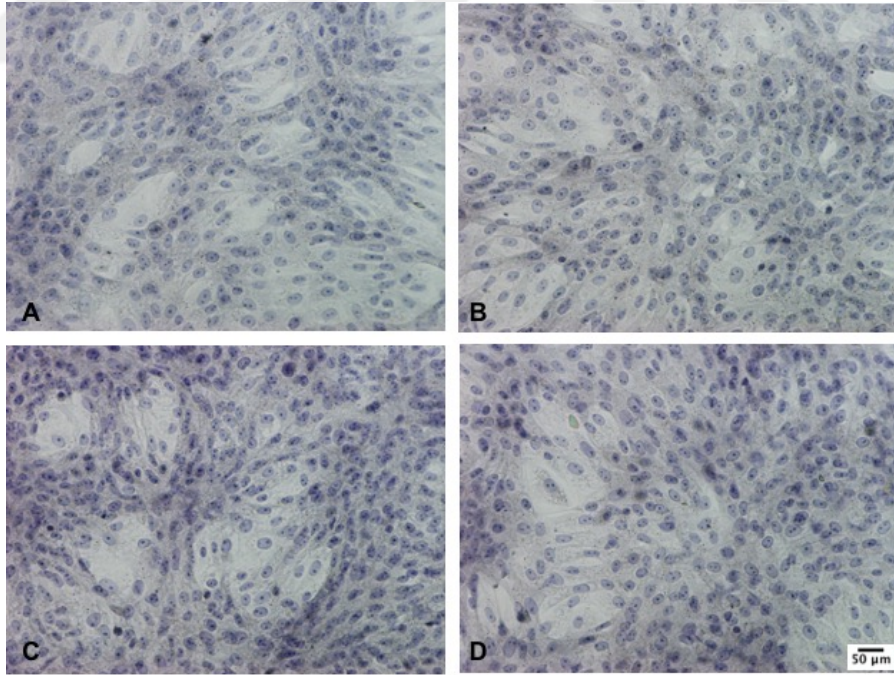
^a Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

^b Birinci güne göre istatistiksel anlamlı (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

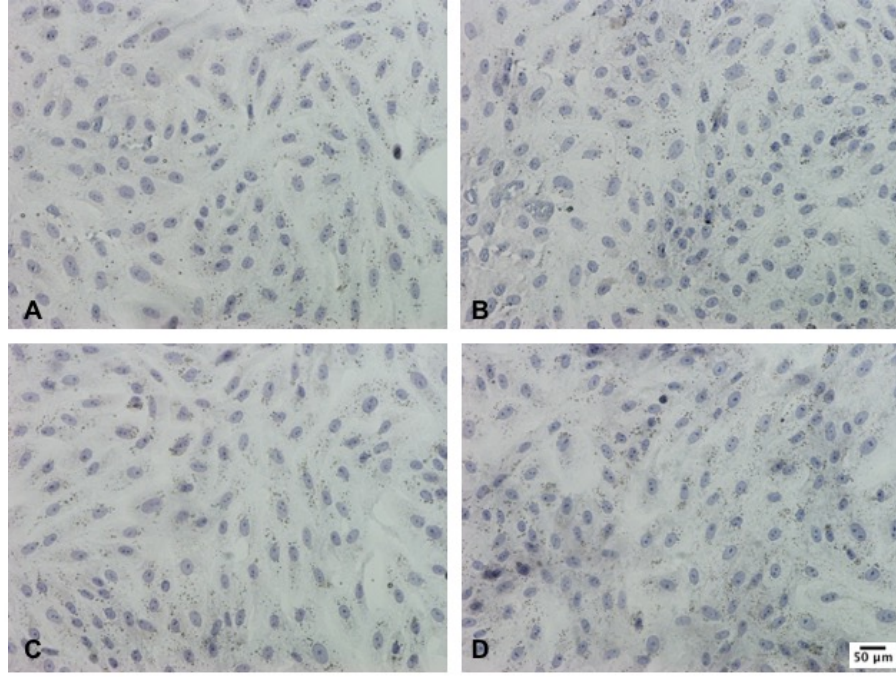
Tüm gruplara ait immunositokimyasal çalışmalar esnasında negatif immunohistokimya kontrol boyamaları gerçekleştirildi ve herhangi bir immunoreaktivite gözlenmedi (Resim 20A, 20B, 20C, 20D; Resim 21A, 21B, 21C, 21D; Resim 22A, 22B, 22C, 22D).



Resim 20. Birinci gün deney gruplarına ait VERO hücrelerinin negatif kontrol boyamaları. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.



Resim 21. Üçüncü gün deney gruplarına ait VERO hücrelerinin negatif kontrol boyamaları. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.



Resim 22. Yedinci gün deney gruplarına ait VERO hücrelerinin negatif kontrol boyamaları. Grup 1 (A), Grup 2 (B), Grup 3 (C) ve Grup 4 (D). Ölçek: 50 µm.

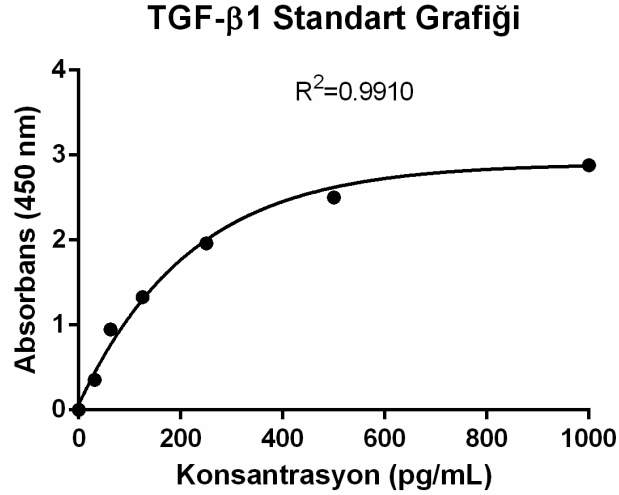
6.5. VERO HÜCRELERİNİN ELISA ANALİZİ BULGULARI

6.5.1. TGF-β1

TGF-β1 proteinin bilinen konsantrasyonlardaki standart solüsyonları kullanılarak (Tablo 26) ELISA metodu sonucu TGF-β1 standart eğrisi (OD_{450} /konsantrasyon) oluşturuldu (Şekil 31).

Tablo 26. TGF-β1 proteinine ait bilinen konsantrasyonlardaki standartların OD_{450} değerleri.

Konsantrasyon (pg/mL)	1000	500	250	125	62.5	31.25	0
Absorbans (OD_{450})	2,883	2,502	1,963	1,329	0,947	0,355	0



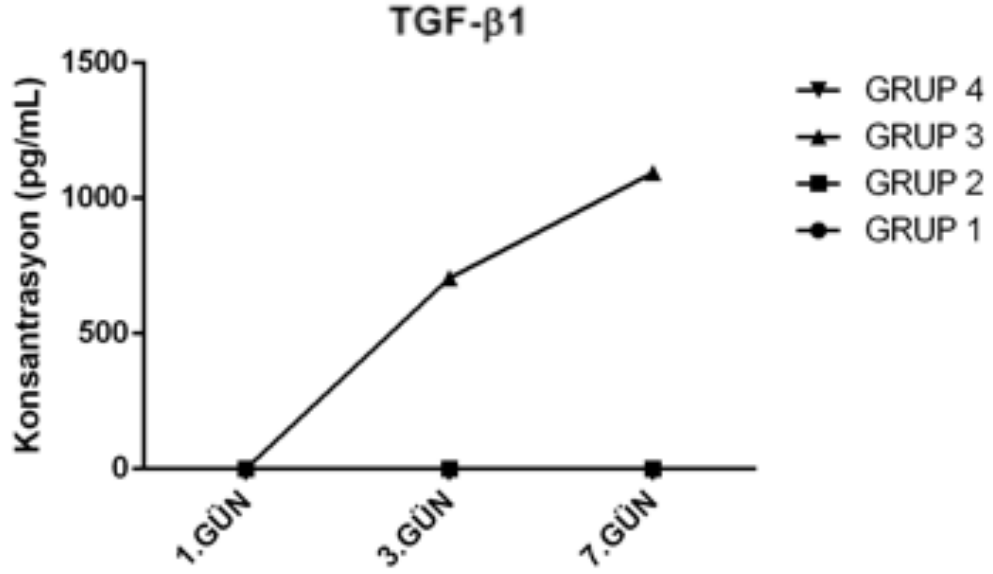
Şekil 31. TGF-β1 standart eğrisi.

Standart eğrisi formülünden gruplara ait OD₄₅₀ değerlerine karşılık gelen TGF-β1 konsantrasyonları (pg/mL) hesaplandı ve Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 hücrelerine ait kültür vasatında tüm inkübasyon günlerinde TGF-β1 proteininin bulunmadığı tespit edildi (Tablo 27) (Şekil 32). CD133+ COLO-741 hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 3'e ait kültür vasatlarında ise birinci gün TGF-β1 proteininin bulunmadığı tespit edilirken (Tablo 27), üçüncü gün örneğinde 705,28 pg/mL TGF-β1 ve yedinci gün örneğinde 388,87 pg/mL TGF-β1 proteinin varlığı tespit edildi (Tablo 27) (Şekil 32). VERO hücrelerinin 7 gün boyunca vasat içerisine salgıladıkları toplam TGF-β1 proteinine ait konsantrasyon değerlerini belirlemek için elde edilen değerler toplanarak grafik oluşturuldu (Tablo 27) (Şekil 32).

Tablo 27. TGF-β1 konsantrasyonları (pg/mL).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001: Birinci güne göre istatistiksel anlamlılık.

Deney Grupları	1. Gün	3. Gün	7. Gün	TOPLAM
Grup 1	0	0	0	0
Grup 2	0	0	0	0
Grup 3	0	705,28***	388,87***	1094,15
Grup 4	0	0	0	0



Şekil 32. TGF-β1 konsantrasyonunun deney gruplarındaki toplam değerleri.

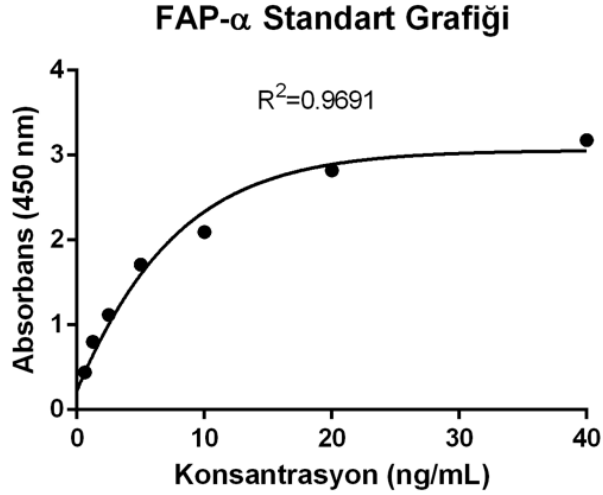
Deney gruplarına ait TGF-β1 protein konsantrasyonları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde üçüncü ve yedinci gün sonuçlarına göre Grup 3 ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,001$) (Tablo 27). TGF-β1 proteininin konsantrasyonunun Grup 3'e ait sonuçları kendi içerisinde istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; TGF-β1 protein konsantrasyonunun birinci gün ile üçüncü gün arasında ($p < 0,001$), birinci gün ile yedinci gün arasında ($p < 0,001$) ve üçüncü gün ile yedinci gün arasında ($p < 0,01$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi (Tablo 27).

6.5.2. FAP-α

FAP-α proteinin bilinen konsantrasyonlardaki standart solüsyonları kullanılarak (Tablo 28) ELISA metodu sonucu FAP-α standart eğrisi (OD_{450} /konsantrasyon) oluşturuldu (Şekil 33).

Tablo 28. FAP-α proteinine ait bilinen konsantrasyonlardaki standartların OD_{450} değerleri.

Konsantrasyon (ng/mL)	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0
Absorbans (OD_{450})	3,1797	2,8223	2,096	1,7133	1,117	0,8017	0,4427	0



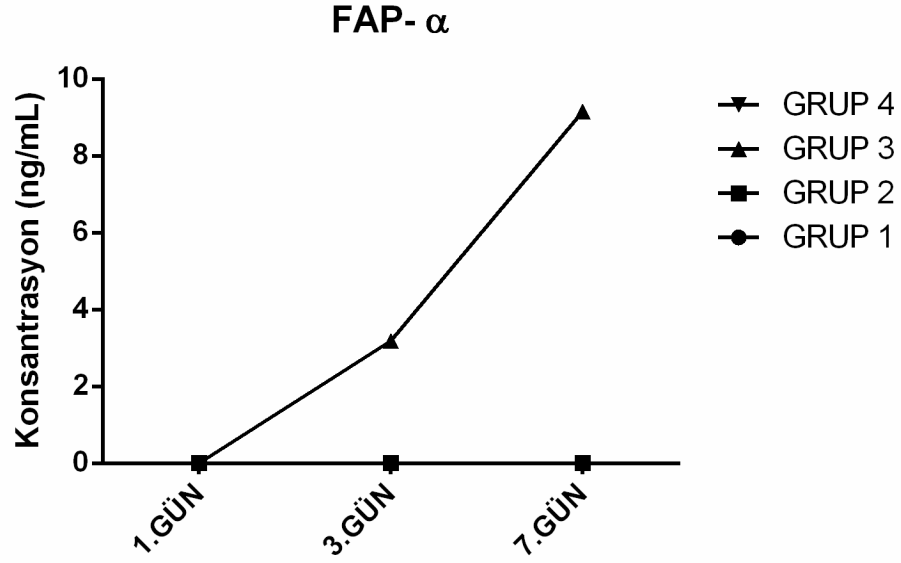
Şekil 33. FAP- α standart eğrisi.

Standart eğrisi formülünden gruplara ait OD₄₅₀ değerlerine karşılık gelen FAP- α konsantrasyonları (ng/mL) hesaplandı ve Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 hücrelerine ait kültür vasatında tüm inkübasyon günlerinde FAP- α proteininin bulunmadığı tespit edildi (Tablo 29) (Şekil 34). CD133+ COLO-741 hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 3'e ait kültür vasatlarında ise birinci gün FAP- α proteininin bulunmadığı tespit edilirken, üçüncü gün örneğinde 3,187 ng/mL FAP- α ve yedinci gün örneğinde 5,967 ng/mL FAP- α proteinin varlığı tespit edildi (Tablo 29) (Şekil 34). VERO hücrelerinin 7 gün boyunca vasat içerisine salgıladıkları toplam FAP- α proteinine ait konsantrasyon değerlerini belirlemek için elde edilen değerler toplanarak grafik oluşturuldu (Tablo 29) (Şekil 34).

Tablo 29. FAP- α konsantrasyonları (ng/mL).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001: Birinci güne göre istatistiksel anlamlılık.

Deney Grupları	1. Gün	3. Gün	7. Gün	TOPLAM
Grup 1	0	0	0	0
Grup 2	0	0	0	0
Grup 3	0	3,187***	5,967***	9,154
Grup 4	0	0	0	0



Şekil 34. FAP- α konsantrasyonunun deney gruplarındaki toplam değerleri.

Deney gruplarına ait FAP- α protein konsantrasyonları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yedinci gün sonuçlarına göre Grup 3 ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p < 0,001$) (Tablo 29). FAP- α proteininin konsantrasyonunun Grup 3'e ait sonuçları kendi içerisinde istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; FAP- α protein konsantrasyonunun birinci gün ile üçüncü gün arasında ($p < 0,05$) ve birinci gün ile yedinci gün arasında ($p < 0,001$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi (Tablo 29).

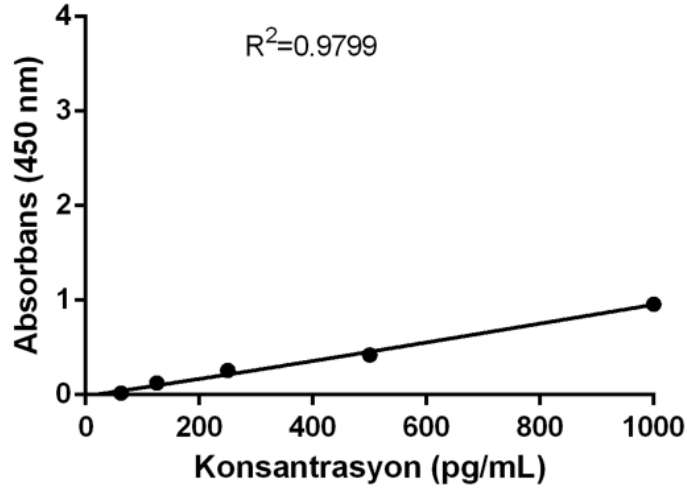
6.5.3. VEGF

VEGF proteinin bilinen konsantrasyonlardaki standart solüsyonları kullanılarak (Tablo 30) ELISA metodu sonucu VEGF standart eğrisi (OD_{450} /konsantrasyon) oluşturuldu (Şekil 35).

Tablo 30. VEGF proteinine ait bilinen konsantrasyonlardaki standartların OD_{450} değerleri.

Konsantrasyon (pg/mL)	1000	500	250	125	62.5	31.25	0
Absorbans (OD_{450})	0,957	0,422	0,257	0,125	0,053	0,019	0

VEGF Standart Grafiği



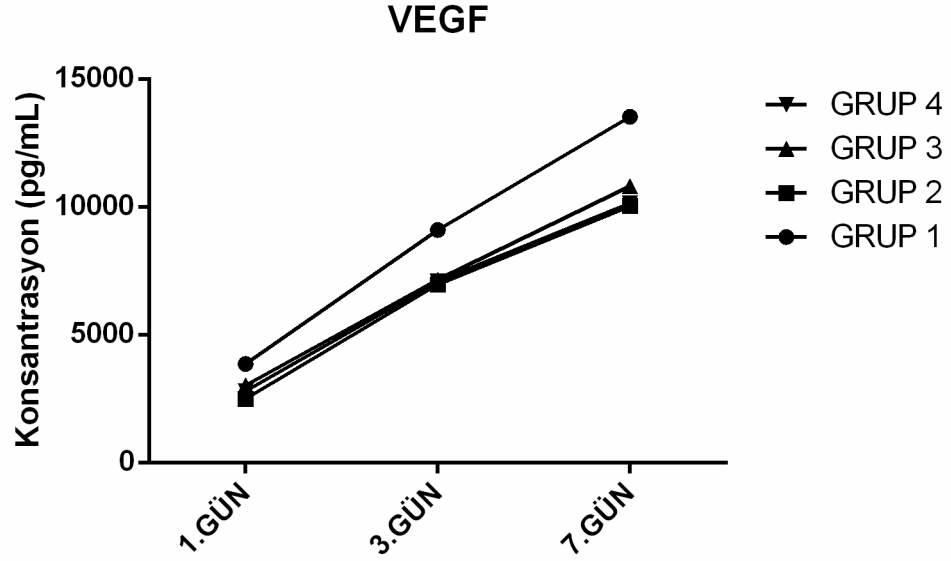
Şekil 35. VEGF standart eğrisi.

Standart eğrisi formülünden gruplara ait OD₄₅₀ değerlerine karşılık gelen VEGF konsantrasyonları (pg/mL) hesaplandı. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait VEGF konsantrasyon değerleri sırası ile birinci gün 3858,44 pg/mL, 2495,48 pg/mL, 3013,25 pg/mL ve 2791,04 pg/mL olarak; üçüncü gün 5231,04 pg/mL, 4476,96 pg/mL, 4146,59 pg/mL ve 4295,48 pg/mL olarak ve yedinci gün 4429,56 pg/mL, 3056,22 pg/mL, 3652,52 pg/mL ve 3045,85 pg/mL olarak hesaplandı (Tablo 31) (Şekil 36). VERO hücrelerinin 7 gün boyunca vasat içerisine salgıladıkları toplam VEGF proteinine ait konsantrasyon değerlerini belirlemek için elde edilen değerler toplanarak grafik oluşturuldu (Tablo 31) (Şekil 36).

Tablo 31. VEGF konsantrasyonları (pg/mL).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001: Birinci güne göre istatistiksel anlamlılık.

Deney Grupları	1. Gün	3. Gün	7. Gün	TOPLAM
Grup 1	3858,44	5231,04***	4429,56*	13519,04
Grup 2	2495,48	4476,96***	3056,22*	10028,66
Grup 3	3013,25	4146,59***	3652,52**	10812,36
Grup 4	2791,04	4295,48***	3045,85	10132,37



Şekil 36. VEGF konsantrasyonunun deney gruplarındaki toplam değerleri.

Deney gruplarına ait VEGF protein konsantrasyonları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; birinci gün sonuçlarına göre bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,001$) ve en fazla VEGF konsantrasyonunun Grup 1’de olduğu saptandı (Tablo 31). Üçüncü gün sonuçlarına göre VEGF konsantrasyonu en fazla Grup 1’de saptandı ve diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$). Yedinci gün sonuçlarına göre ise, VEGF konsantrasyonunun Grup 2 ve Grup’4 de benzer olduğu ($p>0,005$), fakat diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık görüldü ($p<0,01$) (Tablo 31).

VEGF proteininin konsantrasyonunun Grup 1’e ait sonuçları kendi içerisinde istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; birinci gün ile üçüncü gün arasında ($p<0,001$), birinci gün ile yedinci gün arasında ($p<0,05$) ve üçüncü gün ile yedinci gün arasında ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi. Grup 2’ye ait sonuçlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde; birinci gün ile üçüncü gün arasında ($p<0,001$), birinci gün ile yedinci gün arasında ($p<0,05$) ve üçüncü gün ile yedinci gün arasında ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi. Grup 3’e ait sonuçlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde; birinci gün ile üçüncü gün arasında ($p<0,001$), birinci gün ile yedinci gün arasında ($p<0,01$) ve üçüncü gün ile yedinci gün arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi. Grup 4’e ait sonuçlar kendi içerisinde değerlendirildiğinde ise; birinci gün ile üçüncü gün arasında ($p<0,001$) ve üçüncü gün ile yedinci gün arasında ($p<0,001$)

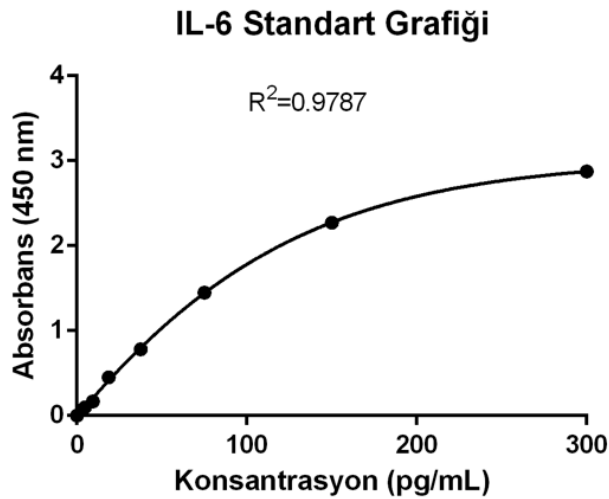
istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu fakat birinci gün ile yedinci gün arasında ($p>0,05$) anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi (Tablo 31).

6.5.4. IL-6

IL-6 proteinin bilinen konsantrasyonlardaki standart solüsyonları kullanılarak (Tablo 32) ELISA metodu sonucu IL-6 standart eğrisi (OD_{450} /konsantrasyon) oluşturuldu (Şekil 37).

Tablo 32. IL-6 proteinine ait bilinen konsantrasyonlardaki standartların OD_{450} değerleri.

Konsantrasyon (pg/mL)	300	150	75	37.5	18.75	9.375	4.688	0
Absorbans (OD_{450})	2,8733	2,272	1,4473	0,7823	0,4503	0,1677	0,97	0



Şekil 37. IL-6 standart eğrisi.

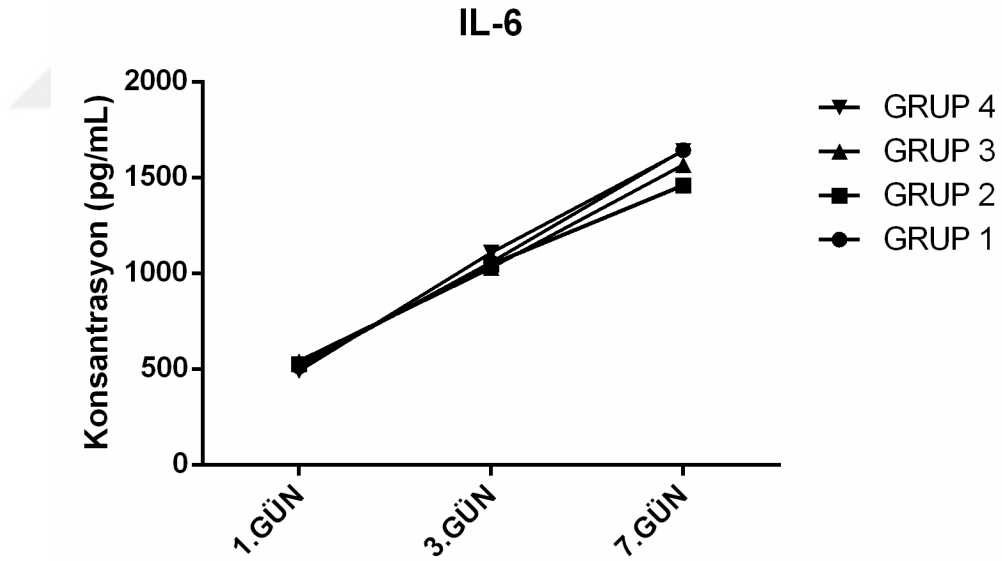
Standart eğrisi formülünden gruplara ait OD_{450} değerlerine karşılık gelen IL-6 konsantrasyonları (pg/mL) hesaplandı. Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'e ait IL-6 konsantrasyon değerleri sırası ile birinci gün 512,59 pg/mL, 523,88 pg/mL, 541,63

pg/mL ve 490,15 pg/mL olarak; üçüncü gün 544,49 pg/mL, 521,21 pg/mL, 487,63 pg/mL ve 617,38 pg/mL olarak ve yedinci gün 585,38 pg/mL, 414,35 pg/mL, 536,67 pg/mL ve 532,20 pg/mL olarak hesaplandı (Tablo 33) (Şekil 38). VERO hücrelerinin 7 gün boyunca vasat içerisine salgıladıkları toplam IL-6 proteinine ait konsantrasyon değerlerini belirlemek için elde edilen değerler toplanarak grafik oluşturuldu (Tablo 33) (Şekil 38).

Tablo 33. IL-6 konsantrasyonları (pg/mL).

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001: Birinci güne göre istatistiksel anlamlılık.

Deney Grupları	1. Gün	3. Gün	7. Gün	TOPLAM
Grup 1	512,59	544,49	585,38	1642,46
Grup 2	523,88	521,21	414,35	1459,44
Grup 3	541,63	487,63	536,67	1565,93
Grup 4	490,15	617,38*	532,20	1639,73



Şekil 38. IL-6 konsantrasyonunun deney gruplarındaki toplam değerleri.

Deney gruplarına ait IL-6 protein konsantrasyonları gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sadece Grup 1 ile Grup 2 IL-6 konsantrasyonunda yedinci günde istatistiksel olarak anlamlılık saptanır iken, (p<0,05), diğer gün ve gruplar arasındaki karşılaştırma sonrasında anlamlılık görülmedi (p>0,05) (Tablo 33).

IL-6 proteininin konsantrasyonunun günler bazında Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'e ait sonuçları grup içinde değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmaz iken ($p>0,05$), Grup 4'e IL-6 konsantrasyondaki üçüncü gündeki artışın sadece birinci gün istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,05$) tespit edildi (Tablo 33).

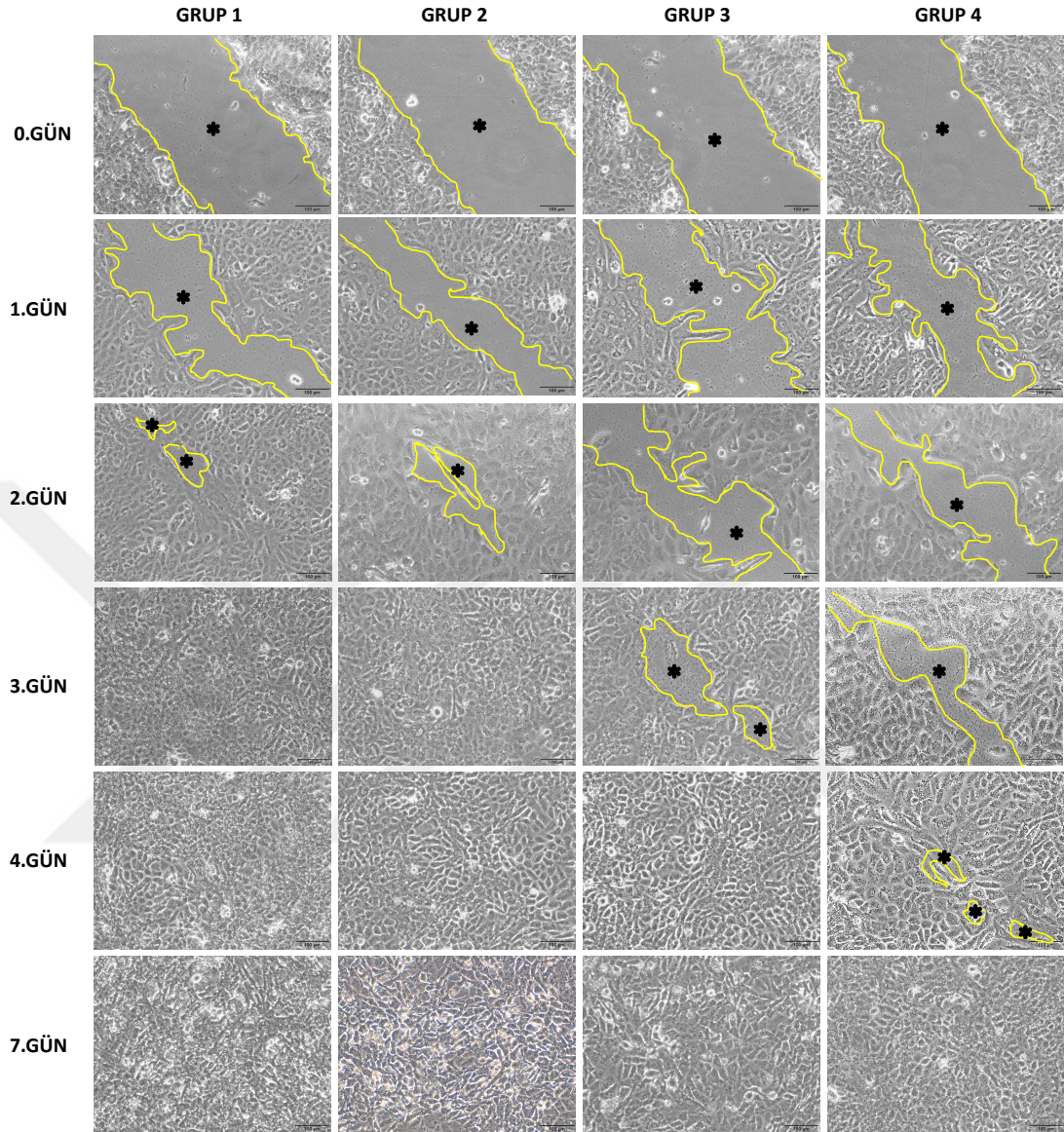
6.6. IN VİTRO YARA İYİLEŞMESİ MODELİ BULGULARI

In vitro yara iyileşmesi modelinde yara alanları Image J görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. İlk oluşturulan yara alanları sıfırcı gün değeri olarak kabul edildi ve takiben 1., 2., 3., 4., ve 7.gün ölçümleri gerçekleştirildi. Grup 1 ve Grup 2'de yara alanının üçüncü günde kapandığı, Grup 3'te kapanmanın dördüncü günde gerçekleştiği ve Grup 4'te ise kapanmanın beşinci günde tamamlandığı ve en geç yara alanında kapanmanın Grup 4'de gerçekleştiği belirlendi (Resim 23).

VERO hücrelerinin kanser hücreleri ile ko-kültür sonrasında yara modeli analizlerinin Image J görüntü analiz programı ile elde edilen sonuçlar sıfırcı gün yara alanına göre % kapanma oranı olarak verildi. Hesaplamalar sonucunda; Grup 1 VERO hücrelerinin yüzde kapanma oranlarının birinci gün %44,9; ikinci gün %85,3; üçüncü, dördüncü ve yedinci günlerde ise %100 olduğu hesaplandı (Tablo 34). COLO-741 hücreleri ile ko-kültüre edilen Grup 2 VERO hücrelerinin yüzde kapanma oranlarının birinci gün %45,2; ikinci gün %85; üçüncü, dördüncü ve yedinci günlerde ise %100 olduğu belirlendi. CD133+ hücreler ile ko-kültüre edilen Grup 3'te ise VERO hücrelerinin yüzde kapanma oranlarının birinci gün %34,6; ikinci gün %69,6; üçüncü gün %86,7; dördüncü ve yedinci günlerde %100 olduğu tespit edildi. Son grup olan CD133- hücreler ile ko-kültüre edilen Grup 4 VERO hücrelerinin yüzde kapanma oranlarının ise birinci gün %27,9; ikinci gün %52; üçüncü gün %77,9; dördüncü gün 87,7 ve yedinci gün %100 olduğu hesaplandı (Tablo 34) (Şekil 39).

Yara analizi kapanma verileri değerlendirildiğinde, birinci gün sonunda Grup 1 ve Grup 3 ($p<0,01$), Grup 1 ve Grup 4 ($p<0,001$), Grup 2 ve Grup 3 ($p<0,001$), Grup 3 ve Grup 4 ($p<0,001$) arasında istatistiksel anlamlılık tespit edildi (Şekil 39). İkinci ve üçüncü gün sonuçları incelendiğinde Grup 1 ve Grup 2 arasında istatistiksel anlamlılık bulunmazken ($p>0,05$) diğer bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi ($p<0,001$). Dördüncü günün verilerine bakıldığında ise

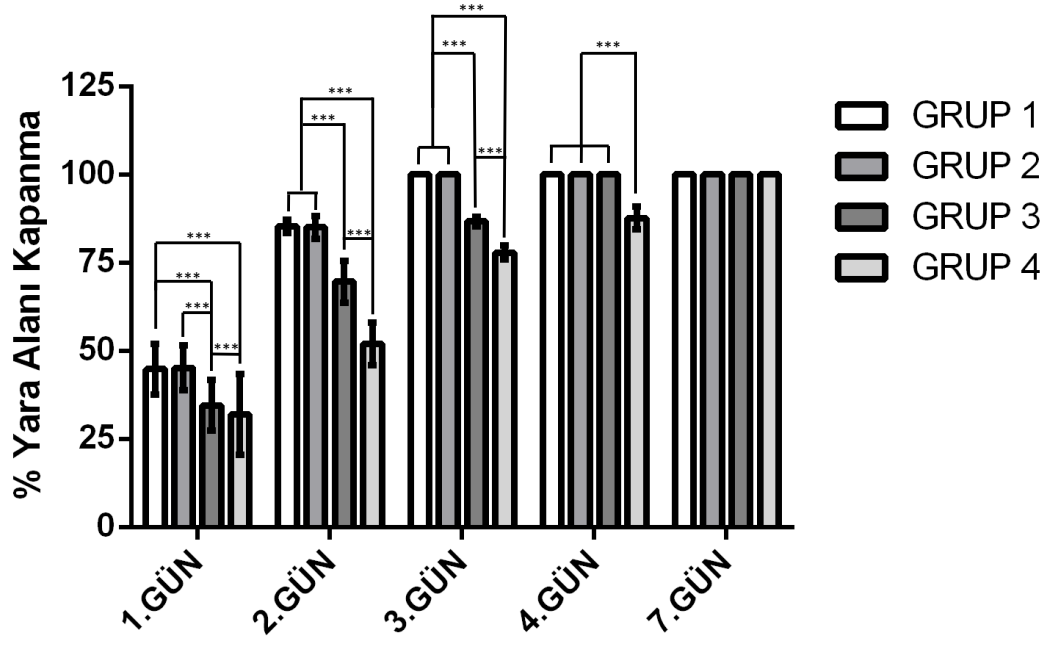
Grup 1 ve Grup 4 ($p<0,001$), Grup 2 ve Grup 3 ($p<0,001$), Grup 3 ve Grup 4 ($p<0,001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (Şekil 39).



Resim 23. Gruplara ve günlere göre VERO hücrelerinin yara iyileşmesi analizi inverted mikroskop fotoğrafları. Ölçek: 100 μm . *: Yara alanları

Tablo 34. Yara alanı kapanma oranları.

Deney Grupları	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	7. Gün
Grup 1	%44,9	%85,3	%100	%100	%100
Grup 2	%45,2	%85,0	%100	%100	%100
Grup 3	%34,6	%69,6	%86,7	%100	%100
Grup 4	%32,0	%52,0	%77,9	%87,7	%100



Şekil 39. Günlere göre VERO hücrelerinin yüzde kapanma oranları (***) $p < 0,001$).

7. TARTIŞMA

Kolorektal kanserler her yıl yaklaşık 700 000 mortaliteye neden olması ile dünyanın en ölümcül dördüncü kanser tipidir. En yüksek insidans oranları, gelişmiş ülkelerdedir ve modern batı diyetlerinin artması ile kolorektal kanser insidansının artması beklenmektedir (Brody 2015). Bu nedenler ile kolorektal kanser, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen küresel bir sorundur.

Kolorektal kanser semptomları genellikle hastalığın ileri evrelerinde ortaya çıkmaktadır (Loktionov 2020). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, kolorektal kanserlerde de kanserinin erken evrede saptanması daha iyi prognoza yol açmaktadır (Xie ve Lin 2020). Kolorektal kanser hastalarının yaklaşık % 25'i periton metastazı göstermektedir. Son yıllarda, cerrahi tedavilerdeki ilerlemelere ve yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına rağmen cerrahi ve kemoterapi temelli tedaviler kolorektal periton metastazı gösteren hastalarda yeterli etkiyi gösterememektedir (Ceelen ve ark. 2020). Kolorektal kanserlerin 2030 yılına kadar yaklaşık 2.2 milyon yeni vaka ve 1.1 milyon ölüme neden olacağı tahmin edilmektedir (Xie ve Lin 2020).

Tüm gelişimsel süreçler gibi, tümör gelişimi de mikroçevre tarafından şekillendirilmektedir. Tümör mikroçevresi (tümör stroması) tümör hücrelerinin, transforme olmamış hücre tiplerinin ve hücre dışı matriksin kompleks bir karışımından oluşur. Tümör mikroçevresi, kanser gelişiminin birçok aşamasında kritik rol oynamaktadır. Tümör anjiyogenezini sağlar ve metastazın ilerlemesinde oldukça etkilidir. Yapılan çalışmalar ile tümör mikroçevresinin tedavilere verilen yanıtları etkilediği açıkça ortaya konulmuştur. Ayrıca, tümör stromasını düzenlemenin mevcut tedavilerin etkinliğini arttırabileceği ve terapötik hedefleme için yeni fırsatlar sunabileceği düşünülmektedir (Hirata ve Sahai 2017). Kolon kanser gelişimi, ilerlemesi ve metastazında öncülük ettiği bilinen tümör mikroçevresine ait hücrelerin ve mekanizmalarının iyi anlaşılması gerekmekte ve bu basamakları açıklayacak çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (Ceelen ve ark. 2020).

Kanser dokusu, içerisinde yer alan farklı özellikteki kanser hücrelerinin varlığı sebebiyle heterojendir. Kanser stroması içerisinde, sınırsız kendini yenileme, ilaç

direnci geliştirme ve apoptoza dirençli olma özelliklerine sahip kanser kök hücreleri yer almaktadır (Haydaroglu ve ark. 2011). Kanser kök hücrelerinin tanımlanması ile kanser tedavilerinde kanser kök hücreleri hedeflenmesine yönelik çalışmalar büyük artış göstermiştir. Normal hücreleri ve normal kök hücreleri koruyarak, kanser kök hücrelerini ve mikroçevrelerini etkileyebilecek tedavi girişimlerinin geliştirilmesi için kanser mikroçevresini oluşturan hücrelerin iyi anlaşılması gerekmektedir (Haydaroglu ve ark. 2011).

Bu çalışmada kanser hücreleri ile fibroblast hücrelerinin ko-kültür sistemi aracılığı ile etkileşimi sonrasında, fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast özellikleri kazanma potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda metastatik kolon kanser hücrelerinden (COLO-741) izole edilen CD133+ (kolon kanser kök hücre) ve CD133- (kök hücre olmayan) kanser hücreleri ile fibroblastlar (VERO) arasında kurulan indirekt ko-kültürün birinci, üçüncü ve yedinci günlerinde kanser ilişkili fibroblast belirteçleri olarak bilinen α -SMA, vimentin, FSP-1, CK19 ve CD31 proteinlerinin dağılımları indirekt immunositokimya yöntemi ile ve eş zamanlı olarak kanser ilişkili fibroblastlardan salgılandığı bilinen TGF- β 1, FAP, VEGF ve IL-6 proteinlerinin kültür vasatları içerisindeki konsantrasyonları ELISA analizi ile incelendi. Analizlere ek olarak *in vitro* yara iyileşmesi modeli oluşturularak değerlendirildi.

Kanser kitlesi içerisinde bulunan farklı kanser hücrelerinin özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Son yıllarda kanser kök hücrelerinden salgılanan faktörlerin diğer tümör hücrelerinden farklı olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmıştır (Paltridge ve ark. 2013). Bu konuda yapılmış bir çalışmada, insan glioblastomalarından izole edilen CD133+ kanser kök hücreleri ve CD133- hücrelerin farelere enjekte edilmesi ile CD133+ hücrelerin oluşturduğu tümörlerin CD133- hücrelerinden elde edilenlere göre tümör boyutunun ve vaskülaritesinin fazla olduğu gözlenmiş ve CD133+ kanser kök hücrelerinden VEGF dahil birçok pro-anjiyogenik faktörün de daha yüksek seviyelerde salgılandığı bildirilmiştir. Kanser kök hücrelerin vaskülarite üzerindeki etkisinin salgılanan faktörler aracılığıyla gerçekleştiği ve tümörün büyümesi ile hayatta kalmasını aktif olarak teşvik edebileceğini düşündürmüştür (Bao ve ark. 2006). Bu nedenle çalışma heterojen kanser hücre popülasyonları içerisindeki farklı kanser hücrelerinin fibroblast hücreleri üzerinde meydana getirebileceği etkilerin birbirleri ile karşılaştırılmalı olarak incelenmesini amaçlamaktadır. Bu amaç doğrultusunda

çalışmada COLO-741 metastatik kolon kanseri hücrelerinden kök hücre olan ve olmayan hücrelerin izole edilmesi hedeflenmiştir.

COLO-741 hücreleri manyetik ayırıştırma tekniği kullanılarak CD133+ ve CD133- COLO-741 hücrelerine ayrıldıktan sonra hücrelerin karakterizasyonu için immunositokimyasal olarak CD133 boyaması gerçekleştirildi ve CD133+ COLO-741 hücrelerinin kuvvetli CD133 immunoreaktivitesine sahip oldukları gösterildi. Literatürde kolon kanseri kök hücrelerinin izolasyonu ve karakterizasyonu için en sık kullanılan hücre yüzey belirteci CD133 olarak ortaya çıkmaktadır (Kozovska ve ark. 2014). CD133; kolon, karaciğer ve akciğer kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kanser kök hücresi yüzey belirteci olarak tanımlanmış bir transmembran glikoproteindir (Schneider ve ark. 2012) Ayrıca CD133, onkojenik sinyal yollarıyla da yakından ilişkilidir (Mak ve ark. 2012). Kolon kanseri üzerine yapılmış olan iki temel çalışmada, CD133 kullanılarak kolon kanserinde kanser kök hücrelerin varlığı gösterilmiş ve bu çalışmaları takiben kolon kanser kök hücre araştırmaları hız kazanmıştır (O'Brien ve ark. 2007; Ricci-Vitiani ve ark. 2007). CD133, tümör dokularıyla karşılaştırıldığında nadiren normal kolon dokularında eksprese edilmektedir (O'Brien ve ark. 2007). Yüksek CD133 ekspresyon düzeyleri sergileyen kolon kanseri hastalarının metastaz oluşumuna ve nüklere yatkın olduğu da gösterilmiştir. Lim ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada CD133'ün, cerrahi insan kolorektal kanser örneklerinde kanser kök hücrelerini tanımlamak için geçerli bir belirteç olduğu gösterilmiş ve çalışılan örneklerin % 28'inin, % 3'ten fazla CD133+ kanser kök hücresi içerdiği belirtilmiştir (Lim ve ark. 2014). Kolon ve over kanserlerinde CD133'ün ifadesinin azalmasının epitelyal-mezenkimal geçişe bağlı gen ekspresyonunun azalmasına ve tümör büyümesinin inhibisyonuna yol açtığı da bilinmektedir (Kang ve ark. 2019). Kim ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada HT29 ve HCT116 insan kolon kanseri hücrelerinde CD133 susturulmuş ve CD133'ün susturulmasının, kanser hücre çoğalmasının, viabilitesinin, migrasyonunun, invazyonunun ve glikoz taşınmasının azalması ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Kim ve ark. 2019). Bu çalışmada COLO-741 kolon kanseri hücrelerinden CD133+ kanser kök hücrelerinin ayrılması işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görülmektedir.

Embriyonik gelişimin ilk aşamalarında, epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler gelişen organların yapılarına ve işlevlerine katkıda bulunurlar. Bununla birlikte, bu fenotipler her zaman kalıcı değildir ve uygun koşullar altında epitelyal ve

mezenkimal hücreler bu iki fenotip arasında dönüşüm yapabilirler (Micalizzi ve ark. 2010). Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) veya mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) olarak adlandırılan bu süreçler, embriyogenez ve morfogenez süreçleri için gereklidir. Kanser çalışmaları, epitelyal kanser hücrelerinin primer tümörden uzaklaşmasına izin veren mezenkimal özellikler kazandığını göstermektedir. Lokal invazyonun metastatik yayılımı için gerekli bir ilk adım olduğu düşünüldüğünden, EMT ve epitelyal plastisitenin tümör ilerlemesine katkıda bulunduğu varsayılmaktadır. EMT, apikal-bazal polarite kaybıyla başlamakta ve hücre-hücre teması ile bazal membrana bağlanma ortadan kalkmaktadır (Peinado ve ark. 2004). Hücrelerin komşu hücrelere ve bazal membrana bağlanmasına aracılık eden E-kaderin gibi hücre yüzey proteinlerinin yerini, mezenkimal fenotip için gerekli olan N-kaderin gibi hücre yüzey proteinleri alır. Ek olarak, hücre iskelet elemanları yeniden düzenlenir ve periferik aktin filamentler, stres filamentleri (α -SMA) ile yer değiştirirken, sitokeratin ara filamentleri ile de vimentin yer değiştirmektedir. Bu değişiklikler hücreleri küboidal şekilden daha iğsi bir morfolojiye geçirir. Kanser hücreleri EMT sonucunda herhangi bir hücre-hücre temasından bağımsız, hücre dışı matriks içine hareket edebilme yeteneği kazanmış, primer tümör alanlarını terk edebilecek ve metastatik yayılımı gerçekleştirebilecek fenotipik özellikleri kazanmış olmaktadır (Micalizzi ve ark. 2010).

Tümör mikroçevresinde bulunan ve kanser olmayan hücrelerin tümör gelişimine olan önemli katkısı son yıllarda yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Kanser ilişkili fibroblastlar tümör mikroçevresinde bulunan ve kanserin düzenlenmesinde rol oynayan en önemli stromal hücre olarak gösterilmektedir. Kanser ilişkili fibroblastlar, iyileşme yarısındaki granülasyon dokusunun klasik miyofibroblastlarına çok benzemektedirler. Kanser ilişkili fibroblastların kanser hücreleri, lokal fibroblastlar, mezenkimal kök hücreler, perisitler, endotel hücreleri ve/veya makrofajlardan kaynaklandığına dair bazı teoriler ve çalışmalar vardır (De Wever ve ark. 2008). Kanser ilişkili fibroblastların oluşumu hakkındaki veriler toplu olarak ele alındığında, kanser ilişkili fibroblastların mezenkimal hücrelerden köken almaları kanser hücrelerinden oluşmalarından daha olası olduğu görülmektedir (Lacina ve ark. 2015). Kanser ilişkili fibroblastların kanser gelişimini etkileme mekanizmaları tam olarak anlaşılmasına rağmen, oluşma mekanizmaları ile ilgili hala açıklanmamış kısımlar bulunmaktadır. Fibroblastların kanser ilişkili fibroblastlara dönüşümünü inceleyen çok az sayıda mevcuttur. Bu çalışmalar özellikle kanser hücrelerinden salgılanan

eksozomların ya da mikroveziküllerin hedef hücrelerde kanser destekleyici fenotipler ortaya çıkardığını göstermektedir (Webber ve ark. 2010) (Zhao ark. 2015). Fakat bu çalışmalarda kanser kök hücresi olan veya olmayan hücelere odaklanılmamıştır. Meme kanseri ile ilgili yapılmış bir *in vivo* çalışmada ise kanser kök hücrelerinin tümör mikroçevresinde var olan kanser kök hücrelerin fonksiyonlarını aktive ettikleri gösterilmiş fakat kanser ilişkili fibroblastların meydana gelme mekanizmaları ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır (Valenti ve ark. 2017). Literatürde CD133+ kolon kanser kök hücreleri ve CD133- kanser kök hücre olmayan kolon kanser hücrelerinin etkilerini karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada kanser ilişkili fibroblastların tanımlanması için en fazla kullanılan pozitif (α -SMA, vimentin, FSP-1) ve negatif (CK-19, CD31) proteinler immunositokimyasal olarak incelenmiştir.

Çalışmada α -SMA immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre, kanser hücreleri ile ko-kültüre edilen fibroblast hücrelerinde kültürün bütün günlerinde arttığı gözlemlendi. En yüksek artış CD133+ COLO-741 hücreleri ile birlikte kültüre edilen VERO hücrelerinde tespit edildi. Stres fiberleri olarak da adlandırılan α -SMA, hücre motilitesi ve kontraksiyonu ile ilişkilidir (Mezawa ve Orimo 2016). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile, kanser dokusunda bulunan kanser ilişkili fibroblastlarda meydana gelen spesifik morfolojik farklılıkların yanı sıra tümörle ilişkili bu hücrelerde normal fibroblastlara göre daha fazla eksprese olan biyobelirteçler tanımlanmış ve α -SMA hem miyofibroblastların hem de kanser ilişkili fibroblastların tanımlanmaları için temel spesifik marker olarak kabul edilmiştir (Alguacil-Núñez ve ark. 2018). Kanser hücrelerinin varlığında fibroblast hücrelerinde α -SMA immunoreaktivitesinin artması fibroblast hücrelerinin motilite ve invaziv özellik kazandığını ve kanser ilişkili fibroblast fenotipine yöneldiğini göstermektedir. Bu artışın en çok CD133+ COLO-741 ile kültüre edilen fibroblastlarda görülmesi, fibroblastların α -SMA ekspresyonu üzerine en etkili kanser hücre grubunun kanser kök hücreleri olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmada birinci gün gruplar arasında vimentin immunoreaktiviteleri arasında fark görülmezken, üçüncü gün COLO-741 ve CD133+ COLO-741 hücreleri ile kültüre edilen VERO hücrelerinde vimentin immunoreaktivitesinin arttığı gözlemlendi. Yedinci güne gelindiğinde COLO-741 hücreleri ile birlikte kültüre edilen VERO hücrelerindeki artışın biraz düştüğü fakat CD133+ COLO-741 hücreleri ile birlikte kültüre edilen VERO hücrelerinde vimentin artışının devam ettiği belirlendi. Meydana gelen bu sürekli artış, kanser kök hücrelerin fibroblastların vimentin

ekspresyonunu etkilemede en etkili kanser hücre grubu olduğunu düşündürmüştür. Literatürde kanser ilişkili fibroblast izolasyon çalışmalarına bakıldığında temel olarak α -SMA ve vimentinin pozitif belirteçler olarak kullanıldığı görülmektedir (Fuyuhiro ve ark. 2011). Bhattacharya ve arkadaşlarının yaptıkları mezenkimal kök hücre ve hepatosellüler kanser hücre (SK-Hep1) direkt ko-kültür çalışmasında, kanser ilişkili fibroblast ve EMT belirteci olduğu vurgulanan vimentinin kanser hücrelerinde arttığı gösterilmiştir (Bhattacharya ve ark. 2012). Valenti ve arkadaşlarının yaptıkları *in vivo* meme kanseri modelinde meme kanseri oluşumundan sonra tümör dokusunun α -SMA ve vimentin protein seviyelerinin iki katına çıktığı immünfloresan ve western blot teknikleri ile gösterilmiş ve oluşturdukları meme kanseri modelinde tümör büyümesi sırasında vimentin pozitif kanser ilişkili fibroblast oluşumunun meydana geldiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada meme tümör dokularından kanser ilişkili fibroblastlar izole edilmiş ve CD24+ CD49+ meme kanser kök hücreleri ile birlikte indirekt ko-kültür sistemi ile kültüre edildiklerinde kanser mamosferlerinin kanser ilişkili fibroblastların salgıladığı faktörler ile kanser kök hücrelerinin iki kat daha fazla proliferasyon kapasitesine sahip olduklarını belirtmişlerdir (Valenti ve ark. 2017).

Çalışmada fibroblast hücrelerinde α -SMA ve vimentinin paralel olarak artışının özellikle kanser kök hücreler ile birlikte kültüre edilen grupta gözlenmesi, bu grupta bulunan fibroblast hücrelerinin farklılaştığını ve kanser ilişkili fibroblast benzeri özellik kazandığını düşündürmektedir.

Çalışmada birinci gün gruplar arasında FSP-1 immunoreaktiviteleri arasında fark görülmezken, üçüncü gün COLO-741 ve CD133+ COLO-741 hücreleri ile kültüre edilen VERO hücrelerinde FSP-1 immunoreaktivitesinin arttığı gözlemlendi. Yedinci güne gelindiğinde ise COLO-741 hücreleri ile birlikte kültüre edilen VERO hücrelerindeki artışın ciddi bir şekilde düştüğü fakat CD133+ COLO-741 hücreleri ile birlikte kültüre edilen VERO hücrelerinde FSP-1 düşüşünün daha az olduğu belirlendi. Kontrol grubunda ise üçüncü gün ve yedinci günde FSP-1 immunoreaktivitesinde artış gözlemlendi. FSP-1; fibroblastlar, makrofajlar ve malign hücreler dahil olmak üzere tümör stroması içerisinde çok çeşitli hücre tiplerinde eksprese olmaktadır ve bu nedenle, FSP-1 fonksiyonlarının belirli bir hücre alt kümesine atfedilmesi zordur (Cortez ve ark. 2014). Esas olarak FSP-1 çoğu çalışmada kanser ilişkili fibroblastlar için pozitif belirteç olarak kabul edilse de bazı çalışmalarda aksi iddia edilebilmekte ve kanser ilişkili fibroblastların aynı stroma

içinde farklı popülasyonları olabileceği belirtilmektedir. Örneğin Sugimoto ve arkadaşları meme ve pankreas tümörlerinin bazı memeli modellerinde, tek bir stroma içinde en az iki kanser ilişkili fibroblast popülasyonunun var olduğunu öne sürmektedirler: Bunlar FSP-1 ifade eden, ancak NG2, α -SMA veya PDGFR- β ifade etmeyen ve FSP-1 ifade etmezken NG2, α -SMA ve PDGFR- β ifade edenler olarak sınıflandırılmıştır (Sugimoto ve ark. 2006). Bu durum henüz ortaya çıkarılamamış ve soru işaretleri barındıran bir kanser ilişkili fibroblast kökenine ve fonksiyonuna işaret etmektedir (Takebe ve ark. 2013). *İn vitro* olarak, tümör hücresi içeren bir kültür ortamına maruz bırakılan insan kemik iliği türevi mezenkimal kök hücrelerin, kanser ilişkili fibroblast benzeri bir fenotip kazandığı gösterilmiştir; bu deneyde fenotipin hem α -SMA hem de FSP-1 için pozitif olduğu karakterize edilmiştir (Mishra ve ark. 2008). FSP-1'i kanser ilişkili fibroblastlar için spesifik bir belirteç olarak kabul etmeyen çalışmalar olmasına rağmen FSP-1+ hücrelerin, malign ilerleme sırasında tümör mikroçevresinde önemli rolleri olduğu açıkça görülmektedir (Cortez ve ark. 2014). Dourado ve arkadaşlarının 2017 yılında oral skuamöz hücre karsinomu hastalarından alınan örneklerde yaptıkları bir çalışmada histolojik olarak sınıflandırılmış kanser ilişkili fibroblastların % 82,3'ünün FSP-1 pozitif olduğu, % 97'sinin vimentin pozitif olduğu ve % 88,2'sinin ise α -SMA pozitif olduğu bildirilmektedir (Dourado ve ark. 2017). Bununla birlikte, FSP pozitif hücrelerin insan kanserlerindeki spesifik fonksiyonel ve prognostik yeteneklerini tam olarak açıklamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmada kontrol grubu fibroblast hücrelerinde meydana gelen sürekli FSP-1 artışı göz önüne alındığında; normal fibroblastların FSP-1'i artan derecelerde ifade ettiği, kanser ilişkili fibroblastlar için belirteç olarak düşünülemeyeceği fakat kanser hücrelerinin varlığında FSP-1 ekspresyonunun etkilendiği sonucuna varıldı. Çalışmanın bulguları ve literatür değerlendirmesi sonucunda fibroblast harici diğer hücrelerden kanser ilişkili fibroblast oluşumları ile ilgili çalışmalarda FSP-1'in karakterizasyon için kullanılmasının daha uygun olacağı değerlendirildi.

Çalışmaya ait bir diğer bulgu olan CK19 immunoreaktivite sonuçlarına göre, kanser hücreleri ile birlikte kültüre edilen VERO hücrelerinin kontrol grubuna göre azalan seviyelerde CK19 immunoreaktivitesi gösterdiği belirlendi. Azalış günlere göre anlamlı olmamakla birlikte kanser hücre tiplerine göre de farklılık gözlenmedi. CK19 epitelyal hücreler için spesifik bir biyobelirteç olmasının yanı sıra hücre çoğalması sinyal yollarında da görev almaktadır (Mehrpouya ve ark. 2019).

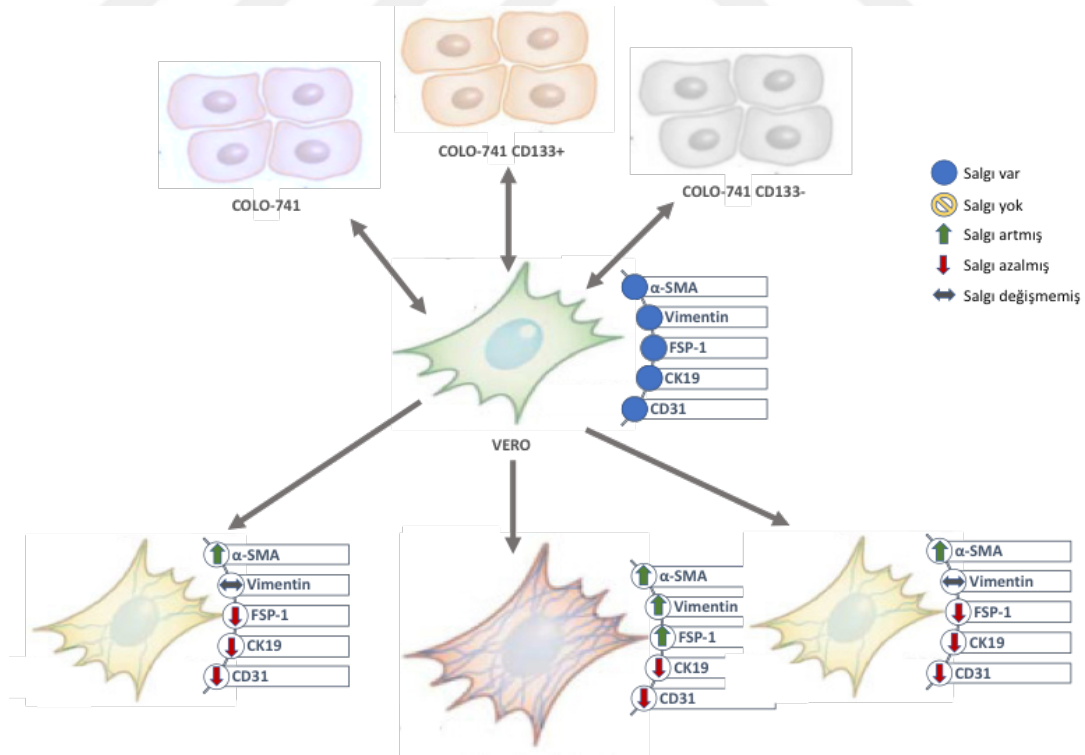
Kanser stroması çalışmalarında CK19, kanser ilişkili fibroblastlar için negatif belirteç olarak tanımlanmaktadır (O'Malley ve ark. 2016). CK19'un negatif olması incelenen hücrelerin epitelyal-mezenkimal geçiş sonucu meydana gelmediğinin göstergesi olarak kabul edilir (Amornsupa ve ark. 2014). Amornsupa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada meme kanserli hastalardan izole edilen kanser ilişkili fibroblastların α -SMA pozitif ve CD19 negatif oldukları gösterilmiş ve bu hücrelerin meme kanseri kemoresistansına katkıda bulunma potansiyelleri olduğu bildirilmiştir (Amornsupa ve ark. 2014). Ba ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada dil skuamoz hücreli karsinom dokularında, kanser ilişkili fibroblastlar ile normal fibroblastlar arasındaki farklar araştırılmış ve çalışmanın immünohistokimyasal sonuçlarına göre CK19 ve vimentin pozitif hücre sayıları açısından bir farklılık tespit edilmezken, α -SMA pozitif kanser ilişkili fibroblast hücre sayısının normal fibroblastlara göre yüksek olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada kanser ilişkili fibroblastlarda α -SMA proteininin varlığının normal fibroblastlardan 4,3 kat daha fazla olduğu Western blot analizi ile de gösterilmiştir (Ba ve ark. 2019).

Bu çalışmanın sonuçları kanser hücreleri ile kültürünün ilerleyen zamanlarında fibroblast hücrelerinde, α -SMA ve vimentin immunoreaktiviteleri artarken, CK19 immunoreaktivitesinin azalıyor olması fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast benzeri özellikler kazandığını göstermektedir.

Bu çalışmada birinci gün gruplar arasında CD31 immunoreaktivitesinin kontrol grubuna göre, CD133+ ve CD133- COLO-741 kanser hücreleri ile birlikte kültüre edilen gruplarda azalırken, COLO-741 kanser hücreleri ile birlikte kültüre edilen grupta değişmediği bulundu. Kontrol grubunda ise CD31 immunoreaktivitesinin günlere göre sürekli bir artış gösterdiği belirlendi. Üçüncü gün ve yedinci gün sonuçlarına bakıldığında COLO-741 hücreleri ile kültüre edilen VERO hücrelerinde CD31 immunoreaktivitesinin birden azaldığı gözlemlendi. Epitelyal hücre karakteristiğinin belirteçleri olan CK19 ve CD31'in kontrol grubu hücrelerinde artması epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)'in tam tersi bir süreç olan mezenkimal-epitelyal geçiş (MET)'e dikkat çekmiştir. MET; hareketli, çok kutuplu veya iğ şekilli mezenkimal hücrelerden polarize epitel hücrelere geçişi içeren geri dönüşümlü bir biyolojik süreçtir. MET embriyogenez, uyarılmış pluripotent kök hücre yeniden programlaması (iPS oluşumu), kanser metastazı ve yara iyileşmesinde ortaya çıkabilmektedir (Pei ve ark. 2019). Elde edilen kontrol grubu sonuçları, VERO

hücrelerinin epitelyal hücre karakteristikleri kazanmaya yatkın olabilecekleri ve uygun uyaranlar varlığında trans-diferansiasyona uğrayabileceklerini düşündürmektedir.

Kanser ilişkili fibroblastlara özgü belirteçlerin immünohistokimyasal incelemesi sonucunda; kanser kök hücreleri CD133+ COLO-741 ile ko-kültüre edilen VERO hücrelerinde α -SMA, vimentin ve FSP-1 dağılımlarının artması ile CK19 ve CD31 dağılımlarının azalması, bu gruba ait fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast hücrelerine ait özellikleri kazandığını göstermektedir. COLO-741 ve CD133-COLO-741 kanser hücreleri ile kültüre edilen gruplardaki VERO hücrelerinde ise vimentin dağılımının değişmemesi ve FSP-1 dağılımının azalması sonucunda bu gruplardaki fibroblastların kanser ilişkili fibroblast olarak tanımlanmayacakları belirlenmiştir. Bu gruplardaki fibroblastlarda gözlenen α -SMA artışı, kanser hücrelerinin fibroblastlar üzerinde bir stres meydana getirdiği fakat bu etkinin kanser kök hücrelerinin oluşturduğu kadar şiddetli olmadığını göstermektedir. Bu gruplarda bulunan fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast özelliklerinden ziyade aktif fibroblast/miyofibroblast özellikleri kazandığı belirlenmiştir (Şekil 40).



Şekil 40. Kanser ilişkili fibroblast belirteçlerinin çalışma sonuçları.

Tyan ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kanser ilişkili fibroblastların meme kanseri hücre büyümesi ve invazivliğini, aynı hastalardan elde edilen normal fibroblastlara göre daha fazla arttırdığı bildirilmektedir (Tyan ve ark. 2011). MDA-MB-468 meme kanseri hücreleri, normal fibroblastlara kıyasla kanser ilişkili fibroblastlar ile birlikte kültüre edildiğinde kanser hücrelerinde yaklaşık iki kat daha fazla proliferasyon ve invazyon gözlenmiştir (Orimo ve ark. 2005). Eiro ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları kanser ilişkili fibroblastlar ile ko-kültüre edilmiş ve kanser hücrelerinde gen ekspresyonunu (TGF- β , FGF2, FGF7), invazyonu (S100A4, MMP2, MMP9) ve anjiyogenezi (VEGF) düzenleyen birçok önemli molekülün ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Eiro ve ark. 2018). Yapılan çalışmalar kanser ilişkili fibroblastların primer olarak salgıladıkları faktörler etkisi ile tümör mikroçevresi üzerinde belirgin bir etki yaptıklarını ortaya koymaktadır. Normal fibroblastları, kanser ilişkili fibroblastlar ile salgıladıkları faktörler üzerinden karşılaştırarak malignitenin başlangıcındaki potansiyel efektörleri tanımlamak kanser ilerleme mekanizmalarının anlaşılmasını sağlayabilir.

Kanser ilişkili fibroblastların ve normal fibroblastların salgıladığı çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerden bazıları ortak iken bazıları farklıdır. Kanser ilişkili fibroblastlar da normal fibroblastlar gibi, kollajen, fibronektin ve laminin gibi ekstrasellüler matriks formasyonunu sağlayan molekülleri sentezlerler. Farklı olarak ise HGF, TNF- α , çeşitli IL'ler ve TGF- β 1 gibi EMT'yi düzenleyen ve kanser gelişimine katkı sağlayan proteinleri de üretir ve salgılarlar (Alguacil-Núñez ve ark. 2018). Kanser çalışmalarında kanser ilişkili fibroblastlar için önerilen rol göz önüne alındığında, son yapılan çalışmalar, kanser ilişkili fibroblastların salgıladıkları moleküllerin normal fibroblastlardan nasıl farklı olduğuna ve bu farklılıkların mikroçevreyi değiştirerek kansere nasıl katkıda bulunabileceğine odaklanmaktadır (Paltridge ve ark. 2013). Bu çalışmada kanser ilişkili fibroblastlardan salgılandığı ve literatürde kanser gelişimini ilerletici yönde düzenlediği belirtilen proteinler (TGF- β 1, FAP- α , VEGF, IL-6) hücre vasatları içerisinde incelenmiştir.

Çalışmada kontrol grubu, COLO-741 kolon kanser hücreleri ve CD133- COLO-741 hücreleri ile birlikte kültüre edilmiş VERO hücrelerinin kültür vasatlarında TGF- β 1 proteininin bulunmadığı tespit edildi. CD133+ COLO-741 hücreleri ile ko-kültüre edilen VERO hücrelerine ait kültür vasatlarında ise birinci gün TGF- β 1 proteininin bulunmadığı tespit edilirken üçüncü ve yedinci gün vasatlarında TGF- β 1 proteinin

varlığı tespit edildi. TGF- β sinyal yolağı iki ana bölümden oluşmaktadır. Bunlardan ilki BMP ve GDF uyarımına bağlı olarak Smad 1, 4, 5 ve 8 proteinlerinin fosforilasyonunun gerçekleştiği ve hücrede transkripsiyon faktörlerinin aktive olduğu yolaktır. İkincisi ise Aktivin ve Nodal uyarımına bağlı olarak Smad 2, 3 ve 4 proteinlerinin fosforilasyonunun gerçekleştiği yolaktır. Her iki yolağında ortak mediatörü olan Smad 4'ün TGF- β mutasyonlarına bağlı olarak azalmış aktivasyonu birçok kanser tipi ile ilişkilendirilmesine rağmen TGF- β sinyal yolaklarının aşırı aktivasyonu kanser gelişimi ile doğrudan ilişkilidir. Smad 4 aracılı TGF- β sinyal yolağının aktivasyonu çekirdekte metastaz ve anjiyogenezden sorumlu genlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Buna ek olarak TGF- β epitelyal kanser hücrelerinin hareket kazanmasına, hücrelerin transdiferansiasyonuna ve metastaz ile anjiyogenezin artırılması ile de immün sistemden kaçışa olanak sağlamaktadır. Böylece TGF- β 'nın tümör hücreleri üzerine direkt etkisinin yanı sıra tümör hücrelerinin lokal davranışlarını uyarabilmesi ile de tümör mikroçevresi üzerinde de in-direkt etkisi olduğu görülmektedir (Haydaroğlu ve ark. 2011). TGF- β 1, TGF- β ailesinin üç izoformundan biridir ve kanser gelişiminde çok fonksiyonu olan bir moleküldür. Kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan TGF- β 1'in kanser gelişimini, anjiyogenez ve metastazı desteklediği özellikle kanser kök hücrelerin sağ kalımına destek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca parakrin olarak kanser kök hücrelerinden ve aynı zamanda otokrin olarak kanser ilişkili fibroblastlar TGF- β 1 etkisinde aktivasyonlarını korumaktadırlar (Alguacil-Núñez ve ark. 2018). TGF- β 1 varlığında kanser ilişkili fibroblastlarda α -SMA ekspresyonunun artmakta ve miyofibroblast özellikleri korunmaktadır (Takebe ve ark. 2013). Ba ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, kanser ilişkili fibroblastlar ile normal fibroblastların salgıladığı faktörler karşılaştırılmış ve TGF- β 1'in kanser ilişkili fibroblast hücrelerinden daha fazla salgılandığı RT-PCR ve ELISA analizleri ile gösterilmiştir (Ba ve ark. 2019).

Kontrol grubuna ait normal fibroblastlarda, TGF- β 1 proteininin bulunmaması literatüre uygun olarak ortaya çıkmaktadır. Sadece kanser kök hücreleri ile ko-kültüre edilen fibroblast hücreleri grubunda TGF- β 1 salgısının tespit edilmesi ise, kanser kök hücreleri varlığında fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast benzeri özellikler kazandığını düşündürmektedir.

ELISA analizi ile çalışmada kontrol grubuna, COLO-741 ve CD133- COLO-741 hücreleri ile birlikte kültüre edilmiş gruplara ait kültür vasatlarında, FAP- α proteininin bulunmadığı tespit edildi. CD133+ COLO-741 hücreleri ile ko-kültüre

edilen VERO hücrelerine ait kültür vasatlarında ise birinci gün FAP- α proteininin bulunmadığı tespit edilirken, üçüncü ve yedinci gün vasatlarında FAP- α proteinin varlığı belirlendi. FAP- α , yara iyileşmesi sırasında görev alan ya da tümör stromasında bulunan aktif fibroblastlar/miyofibroblastlar haricinde olgun hücreler tarafından eksprese edilmemektedir (Brennen ve ark. 2012). Bu nedenle kanser ilişkili fibroblastlar için pozitif bir biyobelirteçtir ve kanser ilişkili fibroblastları özel olarak hedeflemek için aday olarak gösterilmektedir (Li ve ark 2016). Tükrük bezi adenoid kistik karsinoma dokularında yapılan bir çalışmada kanser ilişkili fibroblastların FAP- α ve FSP-1 pozitif oldukları, normal fibroblastların ise negatif oldukları bildirilmiştir (Li ve ark 2016). Renal hücre karsinomundan elde edilen kanser ilişkili fibroblast hücrelerinin de FAP- α pozitif, α -SMA pozitif, vimentin pozitif ve CK19 negatif oldukları vurgulanmaktadır (Yap ve ark. 2019). Genel kanının aksine Du ve arkadaşlarının akciğer kanser dokularında yaptıkları bir çalışmada ise kanser ilişkili fibroblastların FAP- α ekspresyonu göstermediği fakat kanser hücrelerinin sitoplazmalarında FAP- α ifadesinin bulunduğu bildirilmektedir (Du ve ark. 2014).

Literatürde belirtildiği gibi normal fibroblastların FAP- α ifade etmemesi durumu ile uygun olarak (Brennen ve ark. 2012; Li ve ark 2016), çalışmada kontrol grubuna ait normal fibroblastlarda FAP- α proteini tespit edilmemiştir. TGF- β 1 sonuçları ile paralel bir şekilde sadece kanser kök hücreleri ile ko-kültüre edilen fibroblast hücreleri grubunda FAP- α salgısının tespit edilmesi ise, kanser kök hücreleri varlığında fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast benzeri özellikler kazandığını düşündürmektedir. Heterojen COLO-741 kanser hücrelerinin ve CD133-COLO-741 hücrelerinin, TGF- β 1 ve FAP- α üzerinde aynı etkiyi sağlayamaması kanser gelişimi ve kanser mikroçevresi çalışmalarında kanser kök hücrelerinin önemini göstermektedir.

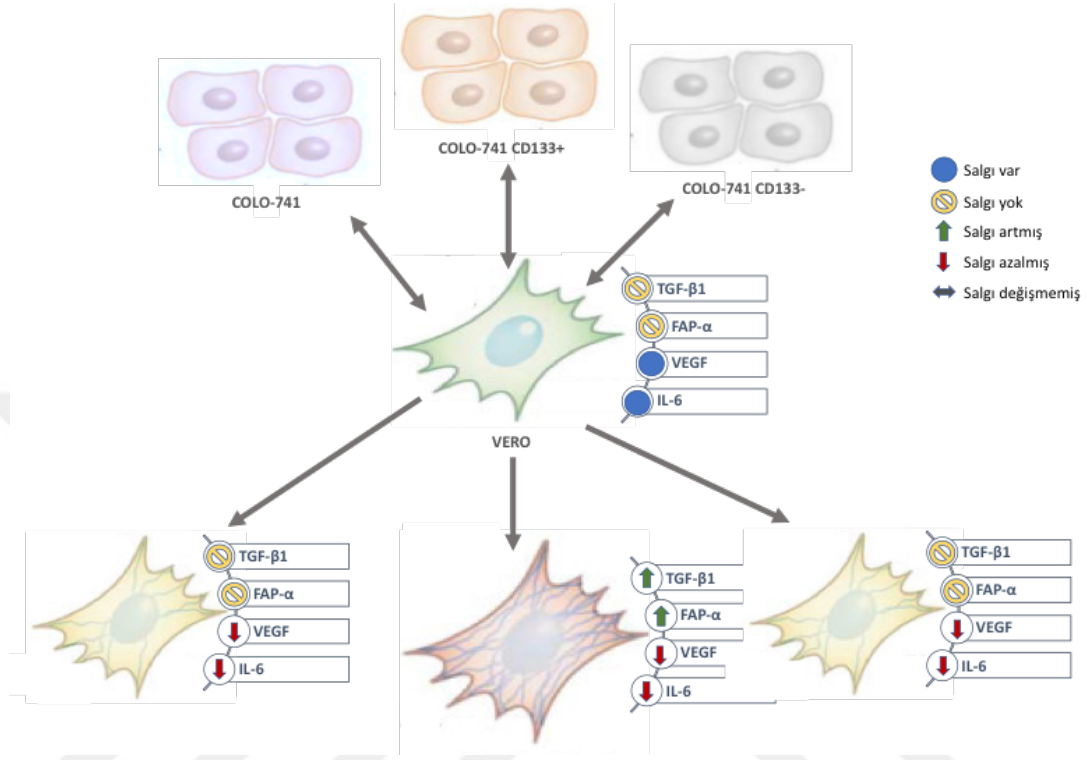
ELISA analizi ile çalışmada tüm gruplara ait kültür vasatlarında VEGF varlığı gösterildi. Kontrol grubuna ait VEGF salgısının, kanser hücreleri ile ko-kültüre edilen gruplara göre fazla olduğu tespit edildi. VEGF, kanser hücrelerinden ve kanser ilişkili fibroblastlardan salgılandığı bilinen en önemli pro-anjiyogenik proteindir. Yapılan transgenik fare modeli çalışmalarında kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan VEGF'in anjiyogenezi sağladığı bildirilmektedir (Takebe ve ark. 2013). Çalışmada kontrol grubuna ait VERO hücrelerinin yüksek seviyelerde VEGF salgılaması beklenmeyen bir durumdur. Kanser hücreleri ile kültüre edilen

VERO hücreleri de VEGF salgılamış fakat salgının seviyesi kontrol grubundan düşük olarak gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçların VEGF'in indirekt ko-kültür sistemleri kullanan *in vitro* kanser ilişkili fibroblast çalışmaları için uygun bir belirteç olmadığını gösterdiği düşünülmüştür.

Çalışmada tüm gruplara ait IL-6 konsantrasyonunun varlığı ELISA analizi ile gösterildi. Kanser hücreleri ile birlikte kültüre edilen fibroblast hücrelerinin IL-6 konsantrasyonları ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Kanser ilişkili fibroblastlar tarafından salgılanan ve en kapsamlı incelenen sitokinler olan IL-6 ve IL-8'in, kanser invazyonu ve metastazının yanı sıra kanser kök hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalar IL-6'nın kanser kök hücre fenotipinin düzenlenmesine ve sürdürülmesine esas olarak STAT-3/NF- κ B sinyal yolağı aracılığı ile katıldığını göstermektedir. Meme kanser hücreleri üzerinde, IL-6 ekspresyonunun kanser kök hücre fenotipinin oluşumunda rol oynayan EMT fenotipini koruduğu bildirilmektedir. Meme kanserinde mezenkimal özelliklere sahip kanser kök hücrelerin indüklenmesinde IL-6 inflamatuvar döngüsünün rolü bulunmaktadır (Chan ve ark. 2019).

IL-6 hem kanser ilişkili fibroblastlar hem de kanser kök hücreler tarafından üretilmektedir (Najafi ve ark. 2019). Ayrıca tümör mikroçevresinde IL-6 salınımının kanser ilişkili fibroblast büyümesini otokrin olarak desteklediği bilinmektedir (Bai ve ark. 2018). Zhang ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladığı bir çalışmada, gastrik kanser doku örneklerinden vimentin ile α -SMA pozitif kanser ilişkili fibroblastlar izole edilmişlerdir. İzole edilen kanser ilişkili fibroblastlara östrojen tedavisi uygulayarak doza bağlı IL-6 salgılanmasının arttığı ELISA analizi ile gösterilmiştir. Gastrik kanser ilişkili fibroblastlardan salgılanan IL-6'nın ifadesinin artması ile kanser hücrelerinin çoğalma ve invazyon yeteneklerinin de arttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2020). Literatürde IL-6 salgısı ile VEGF arasında paralellik olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (Hanahan ve Coussens 2012; Najafi ve ark. 2019; Monteran ve Erez, 2019). Bu çalışmada da bütün gruplara ait kültür vasatlarında tespit edilen VEGF ve IL-6 konsantrasyon değerlerinin gruplar arasında anlamlılık oluşturacak bir veri sunmadığı gözlenmiştir. Fakat kanser ilişkili fibroblastlardan salgılandığı ve kanser gelişimini düzenlediği bilinen TGF- β 1 ve FAP- α konsantrasyonlarının varlığının sadece kanser kök hücreleri ile birlikte kültüre edilen fibroblast hücreleri grubunda tespit edilmesi, kanser kök hücreleri varlığında fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast benzeri özellikler kazandığını

düşündürmektedir. Bu sonuçlar TGF- β 1 ve FAP- α moleküllerinin kanser ilişkili fibroblast ve kanser kök hücre çalışmalarında önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır (Şekil 41).



Şekil 41. Kanser ilişkili fibroblastların salgıladıkları faktörlerin çalışma sonuçları.

Kanser ilişkili fibroblastların kanser biyolojisini şekillendirdikleri ve tümörün zayıf prognozu ve terapi direnci ile ilişkili oldukları bilinmektedir. Kanser kök hücrelerinin genel olarak kanser ilişkili fibroblastlara yakın bir mesafede lokalize oldukları ifade edilmektedir. Kanser ilişkili fibroblastlar muhtemelen TGF- β 1 salgılanması yoluyla kanser hücrelerinde dediferansiasyon meydana getirirler ve hücrelerin dış etkilerden korunması ve ilaç direnci özelliğinin elde edilmesi için kanser kök hücrelerine destekleyici bir mikroçevre sağlarlar. Tam tersi bir şekilde de kanser kök hücreleri kendilerini ya da etraftaki hücreleri kanser ilişkili fibroblastlara dönüştürme kapasitesine sahiptir. Bu dönüşüme aynı şekilde kanser ilişkili fibroblastlar salınan TGF- β 1 aracılık etmektedir (Najafi ve ark. 2019). Kanser ilişkili fibroblastların, kanser hücreleriyle ve kanser kök hücreleriyle parakrin olarak karşılıklı etkileşimleri akciğer kanser gelişiminde gösterilmiştir. Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kanser ilişkili fibroblastların akciğer kanseri

köklüğünü ve plastisitesini düzenleyebildiği ortaya konulmuştur. Çalışmada, IGFII/IGF1-R aktivasyonunun ardından, çok sayıda otokrin (LIF ve LIFR; TGFβ1 ve TGFβR1; Wnt ve Frizzled) ve parakrin (HGF ve HGFR/c-MET; SDF-1 ve CXCR4) sinyal moleküllerinin indüklendiği bildirilmiştir (Chen ve ark. 2014).

Çalışma sonuçları, kanser kök hücreleri ile birlikte kültüre edilen fibroblast hücrelerinde immünohistokimyasal olarak incelenen proteinler α-SMA, vimentin ve FSP-1'in artmış, CK19 ve CD31'un azalmış olduğunun görülmesi ve ELISA analizi ile de aynı grupta TGF-β1 ve FAP-α proteinlerinin kültür vasatı içerisinde tespit edilmesi CD133+ COLO-741 kanser kök hücreleri ile ko-kültüre edilen VERO hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast özellikleri kazandığını ortaya koymuştur. Diğer kanser hücreleri ile birlikte kültüre edilen VERO hücrelerinde de ifade edilen yüzey belirteçlerinin değiştiği gözlenmekle birlikte salgılanan faktörlerde bir değişikliğin olmaması bu gruplara ait fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblastlar olarak tanımlanamayacağını göstermektedir.

Çalışmada son olarak *in vitro* yara iyileşmesi modeli analizi ile, Grup 1 ve Grup 2'de yara alanlarının üçüncü günde, Grup 3'te dördüncü günde ve Grup 4'te ise beşinci günde kapandığı belirlendi. Fibroblastlar yara iyileşmesinin meydana gelmesinde rol oynayan temel hücre tipidir (Lacina ve ark 2015). Yara oluşumuna cevap olarak aktive olan fibroblastlar, hücre proliferasyonu, granüler dokunun oluşması ve kasılması aşamalarına kadar yara iyileşmesinin tüm önemli adımlarında yer alırlar. Kasılma özelliklerine sahip aktif fibroblastlar olan miyofibroblastlar; vimentin, desmin, α-SMA ve FAP ifade etmeleri ile tanımlanırlar ve fibroblastlardan ayırt edilirler. Özellikle stres koşullarında fibroblast hücrelerinde artan α-SMA ifadesi kasılabilme fenotipini doğrudan gösteren belirteçtir (Kuzet ve Gaggioli 2016). Bu nedenle bu çalışmada kontrol grubu fibroblast hücrelerinin kapanma zamanının kısa olması beklenen bir durum olarak ortaya çıkmıştır. Buna ek olarak *in vitro* yara iyileşmesi modeli analizinin bulgularına göre, kanser hücrelerinin varlığında α-SMA pozitif oldukları tespit edilmiş fibroblast hücre proliferasyonunun azalarak yara kapanmasının geciktiği tespit edilmiş, kanser hücreleri etkisinde fibroblast hücrelerinin diferensiasyon kapasitelerinde meydana gelen artışın proliferasyon kapasiteleri ile ters orantılı olarak düzenlendiği düşünülmüştür.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma *in vitro* in-direkt ko-kültür ortamında kanser hücrelerinin varlığında fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblastlara farklılaşabilme kapasitelerinin araştırılmasını amaçlamıştır. Kanser kök hücreleri ile kök hücre olmayan kanser hücrelerinin karşılaştırılmasının yapılması ile kanser mikroçevre çalışmaları için özgündür. CD133+ COLO741 kolon kanser kök hücreleri ile birlikte kültüre edilen fibroblastlarda α -SMA, vimentin ve FSP-1 dağılımlarının artmış, CK19 ve CD31 dağılımlarının azalmış ifadelerinin belirlenmesi ile bu hücrelerin kanser ilişkili fibroblastlara dönüştüğü düşünülmüştür. Ayrıca aynı grup fibroblast hücrelerinin TGF- β 1 ve FAP- α salgısı üretme özellikleri kazanmış olması da kanser kök hücrelerinin fibroblast hücrelerini kanser ilişkili fibroblastlara dönüştürmekte olduğu ifademizi güçlendirmiştir.

Sonuç olarak kanser ilişkili fibroblastların karakteristik ve moleküler özellikleri çok araştırılmış olmasına rağmen, literatürde kökenleri ile ilgili bir fikir birliğine varılamamıştır. Normal fibroblastlar en kuvvetli aday olarak gösterilirken ikinci sırada kanser hücrelerinin farklılaşması ile oluştukları hipotezi gelmektedir. Bu çalışma ile kanser kök hücrelerinin varlığında fibroblastların kanser ilişkili fibroblastlara dönüşebilecekleri gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular ile kanser kök hücresi olan ve olmayan hücrelerin fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblastlara dönüşme potansiyellerinin farklı olduğunu belirlenmiştir.

9. KAYNAKLAR

Alamgeer M, Ganju V, Szczepny A, Russell, PA, Prodanovic, Z, Kumar B, Wainer Z, Brown T, Schneider-Kolsky M, Conron M, Wright G, Watkins DN. 2013. The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax* 68, 1095–1104.

Alguacil-Núñez C, Ferrer-Ortiz I, García-Verdú E, López-Pirez P, Llorente-Cortijo IM, Sainz B Jr. Current perspectives on the crosstalk between lung cancer stem cells and cancer-associated fibroblasts. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 May;125:102-110.

Amornsupak K, Insawang T, Thuwajit P, O-Charoenrat P, Eccles SA, Thuwajit C. Cancer-associated fibroblasts induce high mobility group box 1 and contribute to resistance to doxorubicin in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2014 Dec 15;14:955.

Attieh Y, Vignjevic DM. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Eur J Cell Biol*. 2016 Nov;95(11):493-502.

Avgustinova A, Benitah SA. Epigenetic control of adult stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; 17:643–658.

Ba P, Zhang X, Yu M, et al. Cancer associated fibroblasts are distinguishable from peri-tumor fibroblasts by biological characteristics in TSCC. *Oncol Lett*. 2019;18(3):2484–2490.

Bai X, Ni J, Beretov J, Graham P, Li Y. Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat Rev*. 2018 Sep;69:152-163.

Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res*. 2016;56(5):403–413.

Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD, Rich JN. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*. 2006 Aug 15;66(16):7843-8.

Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J,

Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R, Clevers H. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*. 2010 Jan 8;6(1):25-36.

Batlle E, Clevers H. 2017. Cancer stem cells revisited. *Nat. Publ. Gr.* 23, 1124–1134.

Bhattacharya SD, Mi Z, Talbot LJ, Guo H, Kuo PC. Human mesenchymal stem cell and epithelial hepatic carcinoma cell lines in admixture: concurrent stimulation of cancer-associated fibroblasts and epithelial-to-mesenchymal transition markers. *Surgery*. 2012 Sep;152(3):449-54.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10356-61.

Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina HG, Schewe DM, Aguirre-Ghiso JA. TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling. *Nat Cell Biol*. 2013 Nov;15(11):1351-61.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.

Brennen W, Isaacs J, Denmeade S. Rationale behind targeting fibroblast activation protein- expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Mol Cancer Ther* 2012;11:257–66.

Brennen WN, Rosen DM, Wang H, Isaacs JT, Denmeade SR. Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:1320 –34.

Brody H. Colorectal cancer. *Nature*. 2015 May 14;521(7551):S1.

Cabezón T, Celis JE, Skibshøj I, Klingelhofer J, Grigorian M, Gromov P, et al. Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *Int J Cancer* 2007;121(7):1433–44.

Can A. Kök hücre: Biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımı. Asya Tıp Kitabevi, 2013.

Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Mar;37(1):1-24.

Ceelen W, Ramsay RG, Narasimhan V, Heriot AG, De Wever O. Targeting the Tumor Microenvironment in Colorectal Peritoneal Metastases. *Trends Cancer*. 2020 Mar;6(3):236-246.

Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.

Chan TS, Shaked Y, Tsai KK. Targeting the Interplay Between Cancer Fibroblasts, Mesenchymal Stem Cells, and Cancer Stem Cells in Desmoplastic Cancers. *Front Oncol*. 2019 Jul 31;9:688.

Chen WJ, Ho CC, Chang YL, Chen HY, Lin CA, Ling TY, Yu SL, Yuan SS, Chen YJ, Lin CY, Pan SH, Chou HY, Chen YJ, Chang GC, Chu WC, Lee YM, Lee JY, Lee PJ, Li KC, Chen HW, Yang PC. Cancer-associated fibroblasts regulate the plasticity of lung cancer stemness via paracrine signalling. *Nat Commun*. 2014 Mar 25;5:3472.

Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Feb;18(2):99-115.

Chi HC, Tsai CY, Tsai MM, Yeh CT, Lin KH. Roles of Long Noncoding RNAs in Recurrence and Metastasis of Radiotherapy-Resistant Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1903. Published 2017 Sep 5.

Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*. 2011 Mar;17(3):313-9.

Cortez E, Roswall P, Pietras K. Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2014 Apr;25:3-9.

Damaghi M, Tafreshi NK, Lloyd MC, Sprung R, Estrella V, Wojtkowiak JW, Morse DL, Koomen JM, Bui MM, Gatenby RA, et al. 2015. Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane. *Nat Commun* 6: 8752.

Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014;7:301–311. Published 2014 Nov 6.

De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15;123(10):2229-38.

Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, Clarke

MF. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):780-3.

Dourado RC, Porto LPA, Leitão ÁCGH, Cerqueira PSG, Dos Santos JN, Ramalho LMP, Xavier FCA. Immunohistochemical Characterization of Cancer-associated Fibroblasts in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018 Oct;26(9):640-647.

Du H, Chen D, Zhou Y, Han Z, Che G. Fibroblast phenotypes in different lung diseases. *J Cardiothorac Surg*. 2014 Sep 5;9:147.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986 Dec 25;315(26):1650-9.

Dvořánková B, Smetana K Jr, Říhová B, Kučera J, Mateu R, Szabo P. Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol*. 2015 May;143(5):463-9.

Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA. 2016. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5: e190.

Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell*. 2014; 54:716–727.

Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: *Gastrointestinal pathology an atlas and text*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999: 909-1068.

Foster DS, Jones RE, Ransom RC, Longaker MT, Norton JA. The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *JCI Insight*. 2018 Sep 20;3(18).

Fulawka L, Donizy P, Halon A. Cancer stem cells--the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biol Res*. 2014 Dec 10;47:66.

Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S, Kashiwagi S, Matsuoka J, Doi Y, Kato Y, Hasegawa T, Sawada T, Hirakawa K. Upregulation of cancer-associated myofibroblasts by TGF- β from scirrhous gastric carcinoma cells. *Br J Cancer*. 2011 Sep 27;105(7):996-1001.

Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell*. 2013; 153:17–37.

Gascard P, Tlsty T. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev* 2016;30:1002–19.

Gatenby RA, Gillies RJ. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891–899.

Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L, Chiarugi P. Reciprocal activation of 2117 prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res* 2010; 70: 6945-6956.

Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med*. 2016 Apr 29;5(5).

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140: 883–899.

Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukani- din E, et al. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res* 2005;65(9):3772–80.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):309-22.

Hanley C, Noble F, Ward M, et al. A subset of myofibroblastic cancer-associated fibroblasts regulate collagen fiber elongation, which is prognostic in multiple cancers. *Oncotarget* 2015;7: 6159–74.

Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, Wang Y, Guo P, Qian BZ, Oktay MH, Pollard JW, Jones JG, Condeelis JS. 2015. Real-time imaging reveals local, transient vascular permeability, and tumor cell intravasation stimulated by TIE2hi macrophage-derived VEGFA. *Cancer Discov* 5: 932 – 943.

Haydaroglu A, Vatansever S, Kitapçioğlu G. Meme Kanseri Moleküler ve Genetik Yaklaşım. 1. Basım. Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir; 2011.

Hirata E, Sahai E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Jul 5;7(7).

Huang M, Zhu H, Feng J, Ni S, Huang J. High CD133 expression in the nucleus and cytoplasm predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Dis Markers*. 2015;2015:986095.

Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Apr 1;99(Pt B):186-196.

Jiang J, Tang YL, Liang XH. EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther*. 2011 Apr 15;11(8):714-23.

Kang M, Kim S, Ko J. Roles of CD133 in microvesicle formation and oncoprotein trafficking in colon cancer. *FASEB J.* 2019 Mar;33(3):4248-4260.

Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res* 2012;10:1403–18.

Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T, Shimazu K, Morishita Y, Shimazaki M, Kii I, Horie H, Nagai H, Kudo A, Fukayama M. Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J Histochem Cytochem.* 2008 Aug;56(8):753-64.

Kim H, Ju JH, Son S, Shin I. Silencing of CD133 inhibits GLUT1-mediated glucose transport through downregulation of the HER3/Akt/mTOR pathway in colon cancer. *FEBS Lett.* 2019 Nov 17.

Kise K, Kinugasa-Katayama Y, Takakura N. Tumor microenvironment for cancer stem cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Apr 1;99(Pt B):197-205.

Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Mellody KT, Scheel C, Ben-Porath I, Onder TT, Wang ZC, Richardson AL, Weinberg RA, Orimo A. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107, 20009-20014.

Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomed Pharmacother.* 2014 Oct;68(8):911-6.

Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, Roberts EW, Magiera L, Jones JO, Gopinathan A, Tuveson DA, Fearon DT. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science.* 2010 Nov 5;330(6005):827-30. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell.* 2014; 14:275–291.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology, 10th Edition. Elsevier, 2018.

Kuşoğlu A, Avcı ÇB. Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene.* 2019 Jan 10;681:80-85.

Kuzet SE, Gaggioli C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizes soil. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):607-19.

Lacina L, Plzak J, Kodet O, Szabo P, Chovanec M, Dvorankova B, Smetana K Jr. Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct 12;16(10):24094-110.

Lee HO, Mullins SR, Franco-Barraza J, Valianou M, Cukierman E, Cheng JD. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*. 2011 Jun 13;11:245.

Lertkietmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016 May;23(3):253-9.

Li XY, Hu SQ, Xiao L. The cancer-associated fibroblasts and drug resistance. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(11):2112-9.

Liou GY. CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019 Jan;106:1-7.

Liu C, Li Y, Xing Y, Cao B, Yang F, Yang T, Ai Z, Wei Y, Jiang J. The Interaction between Cancer Stem Cell Marker CD133 and Src Protein Promotes Focal Adhesion Kinase (FAK) Phosphorylation and Cell Migration. *J Biol Chem*. 2016 Jul 22;291(30):15540-50.

Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, Zhang Y. Cancer-Associated Fibroblasts Build and Secure the Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Apr 24;7:60.

Liu ZQ, Fang JM, Xiao YY, Zhao Y, Cui R, Hu F, Xu Q. Prognostic role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Feb 15;8(2):2289-98.

Loktionov A. Biomarkers for detecting colorectal cancer non-invasively: DNA, RNA or proteins? *World J Gastrointest Oncol*. 2020 Feb 15;12(2):124-148.

Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012 Feb 20;196(4):395-406.

Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, Youn JI, Cheng P, Celis E, Pisarev V, Sherman S, Sporn MB, and Gabrilovich D. (2011). Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J. Clin. Invest*. 121(10):4015–4029.

Mak AB, Nixon AM, Kittanakom S, et al. Regulation of CD133 by HDAC6 promotes β -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep*. 2012;2(4):951–963.

Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 2012, 12:323–334.

Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 2010, 1805:105–117.

Mehrpouya M, Pourhashem Z, Yardehnavi N, Oladnabi M. Evaluation of cytokeratin 19 as a prognostic tumoral and metastatic marker with focus on improved detection methods. *J Cell Physiol.* 2019 Dec;234(12):21425-21435.

Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Perez Gracia JL, Haanen J. 2015. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer* 15: 457–472.

Mentlein R, Hattermann K, Hemion C, Jungbluth AA, Held-Feindt J. Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein- α (FAP- α) in astroglial tumors. *Biol Chem.* 2011 Mar;392(3):199-207.

Mezawa Y, Orimo A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell Tissue Res* 2016;365:675–89.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15(2):117–134. doi:10.1007/s10911-010-9178-9

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood.* 1997 Dec 15;90(12):5013-21.

Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW, Banerjee D, Carcinoma- associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008, 68, 4331-4339.

Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget.* 2015 May 10;6(13):10697-711.

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—Elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27: 16–25.

Mohammadi P, Saidijam M, Kaki A, Etemadi K, Shabab N, Yadegarazari R. A Pilot Study of CK19, CK20 and GCC mRNA in the Peripheral Blood as a Colorectal Cancer Biomarker Panel. *Int J Mol Cell Med.* 2016;5(1):30–36.

Monteran L, Erez N. The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2019 Aug 2;10:1835.

Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, Takahashi H, Sato M, Takeyama H. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer*. 2014 Jan 21;110(2):469-78.

Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol*. 2019 Jun;234(6):8381-8395.

Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 2012, 12:133–143.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016 Jun 30;166(1):21-45.

Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F, Haan S, Letellier E. In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int J Cancer*. 2020 Feb 15;146(4):895-905.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):106-10.

O'Connor ML, Xiang D, Shigdar S, Macdonald J, Li Y, Wang T, Pu C, Wang Z, Qiao L, Duan W. Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett*. 2014 Mar 28;344(2):180-7.

O'Malley G, Heijltjes M, Houston AM, Rani S, Ritter T, Egan LJ, Ryan AE. Mesenchymal stromal cells (MSCs) and colorectal cancer: a troublesome twosome for the anti-tumour immune response? *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):60752-60774.

Oliveira LR. Stem cells and cancer stem cells. In *Cancer Stem Cells - The Cutting Edge*. Edited by Shostak S. Rijeka: InTech; 2011:3–28.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335-48.

Orimo A, Weinberg RA. Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer Biol Ther*. 2007 Apr;6(4):618-9.

Otranto M, Sarrazy V, Bonté F, Hinz B, Gabbiani G, Desmoulière A. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr.* 2012;6(3):203–219.

Paltridge JL, Belle L, Khew-Goodall Y. The secretome in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Nov;1834(11):2233–41.

Papageorgis P. TGF β Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. *J Oncol.* 2015;2015:587193.

Pei D, Shu X, Gassama-Diagne A, Thiery JP. Mesenchymal-epithelial transition in development and reprogramming. *Nat Cell Biol.* 2019 Jan;21(1):44–53.

Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5-6):365–75.

Pérez-Sala D, Oeste CL, Martínez AE, Carrasco MJ, Garzón B, Cañada FJ. Vimentin filament organization and stress sensing depend on its single cysteine residue and zinc binding. *Nat Commun.* 2015 Jun 2;6:7287.

Phi LTH, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, Lee YK, Kwon HY. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int.* 2018 Feb 28;2018:5416923.

Pidsley R, Lawrence MG, Zotenko E, Niranjan B, Statham A, Song J, Chabanon RM, Qu W, Wang H, Richards M, Nair SS, Armstrong NJ, Nim HT, Papargiris M, Balanathan P, French H, Peters T, Norden S, Ryan A, Pedersen J, Kench J, Daly RJ, Horvath LG, Stricker P, Frydenberg M, Taylor RA, Stirzaker C, Risbridger GP, Clark SJ. Enduring epigenetic landmarks define the cancer microenvironment. *Genome Res.* 2018 May;28(5):625–638.

Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* 2010 May 1;316(8):1324–31.

Qian BZ, Pollard JW. 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141: 39–51.

Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B, Wang TC. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell.* 2011 Feb 15;19(2):257–72.

Rahman M, Jamil HM, Akhtar N, Rahman KMT, Islam R, Asaduzzaman SM. Stem Cell and Cancer Stem Cell: A Tale of Two Cells. *Progress in Stem Cell* 2016, 3(2): 97–108.

Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 13: 858 – 870.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):111-5.

Richardson AM, Havel LS, Koyen AE, Konen JM, Shupe J, Wiles WG 4th, Martin WD, Grossniklaus HE, Sica G, Gilbert-Ross M, Marcus AI. Vimentin Is Required for Lung Adenocarcinoma Metastasis via Heterotypic Tumor Cell-Cancer-Associated Fibroblast Interactions during Collective Invasion. *Clin Cancer Res*. 2018 Jan 15;24(2):420-432.

Rosai J. Gastrointestinal tract. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, Volume 1. 9th ed. Mosby, 2004: 776-855.

Roy A, Li SD. Modifying the tumor microenvironment using nanoparticle therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2016 Nov;8(6):891-908.

Saunders NA, Simpson F, Thompson EW, Hill MM, Endo-Munoz L, Leggatt G, Minchin RF, Guminski A: Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. *Embo Mol Med* 2012, 4:675–684.

Schneider M, Huber J, Hadaschik B, Siegers GM, Fiebig HH, Schüler J. Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer*. 2012;12:96. Published 2012 Mar 20.

Sell S. Stem cells and cancer: an introduction. In *Stem Cells and Cancer*. Edited by Majumder S. New York: Springer; 2009:1–31.

Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Oct;14(10):611-629.

Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2015 Dec 11;7(4):2443-58.

Shimoda M, Mellody KT, Orimo A, Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* 2010, 21, 19-25.

Shiozawa Y, Nie B, Pienta KJ, Morgan TM, Taichman RS: Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacol Ther* 2013, 138:285–293.

Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, St Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW,

Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*. 2008 Jun;118(6):2111-20.

Smetana K Jr, Dvoránková B, Lacina L, Cada Z, Vonka V. Human hair follicle and interfollicular keratinocyte reactivity to mouse HPV16-transformed cells: an in vitro study. *Oncol Rep*. 2008 Jul;20(1):75-80.

Sounni NE, Noel A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):85-93.

Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 2006 Dec;5(12):1640-6.

Sukowati CH, Anfuso B, Crocé LS, Tiribelli C. The role of multipotent cancer associated fibroblasts in hepatocarcinogenesis. *BMC Cancer*. 2015 Mar 27;15:188.

Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village. *Nat Rev Cancer*. 2015 Aug;15(8):473-83.

Takebe N, Percy I, Timmer W, Khan N, Schulz T, Harris PJ. (2013). Cancer-associated Fibroblasts and Therapies That Interfere with Their Activity. *Tumor Microenvironment and Therapy*. 1. 10.2478/tumor-2013-0001.

Tuveson D, Elyada E, Öhlund D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Cell Biol* 2014; 206:1503–23.

Tyan SW, Kuo WH, Huang CK, Pan CC, Shew JY, Chang KJ, Lee EY, Lee WH. Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis. *PLoS One*. 2011 Jan 13;6(1):e15313.

Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Jun;15(6):366-381.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029–1033.

Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G, Medema JP. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*. 2010 May;12(5):468-76.

Vincent A, Ouelkdite-Oumouchal A, Souidi M, Leclerc J, Neve B, Van Seuning I. Colon cancer stemness as a reversible epigenetic state: Implications for anticancer therapies. *World J Stem Cells*. 2019;11(11):920–936.

Vong S, Kalluri R. The role of stromal myofibroblast and extracellular matrix in tumor angiogenesis. *Genes Cancer*. 2011 Dec;2(12):1139-45.

Wald O, Izhar U, Amir G, Kirshberg S, Shlomain Z, Zamir G, Peled A, Shapira OM, Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: role in non-small cell lung cancer tumor proliferation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011, 141, 1503-1512.

Webber J, Steadman R, Mason MD. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Res* 2010; 70:9621-9630.

Wikberg ML, Edin S, Lundberg IV, Van Guelpen B, Dahlin AM, Rutegård J, Stenling R, Oberg A, Palmqvist R. High intratumoral expression of fibroblast activation protein (FAP) in colon cancer is associated with poorer patient prognosis. *Tumour Biol*. 2013 Apr;34(2):1013-20.

Wu H, Qi XW, Yan GN, Zhang QB, Xu C, Bian XW. Is CD133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Jun 18;9(6):e100168.

Xie J, Lin Y. Patient-derived xenograft models for personalized medicine in colorectal cancer. *Clin Exp Med*. 2020 Feb 25.

Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci* 2010;15:166 –79.

Xu D, Li XF, Zheng S, Jiang WZ. Quantitative real-time RT-PCR detection for CEA, CK20 and CK19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006 Jun;7(6):445-51.

Yap NY, Ong TA, Morais C, Pailoor J, Gobe GC, Rajandram R. Establishment of epithelial and fibroblast cell cultures and cell lines from primary renal cancer nephrectomies. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):715-725.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):5002-12.

Yoshida T, Akatsuka T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C and integrins in cancer. *Cell Adh Migr*. 2015;9(1-2):96-104.

Zeimet AG, Reimer D, Sopper S, Boesch M, Martowicz A, Roessler J, et al. Ovarian cancer stem cells. *Neoplasma* 2012;59:747–55.

Zhang Y, Cong X, Li Z, Xue Y. Estrogen facilitates gastric cancer cell proliferation and invasion through promoting the secretion of interleukin-6 by cancer-associated fibroblasts. *Int Immunopharmacol.* 2020 Jan;78:105937.

Zhao XP, Wang M, Song Y, Song K, Yan TL, Wang L, Liu K, Shang ZJ. Membrane microvesicles as mediators for melanoma-fibroblasts communication: roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the ERK1/2 signal pathway. *Cancer Lett.* 2015 May 1;360(2):125-33.

Zi F, He J, He D, Li Y, Yang L, Cai Z. Fibroblast activation protein α in tumor microenvironment: recent progression and implications. *Mol Med Rep.* 2015 May;11(5):3203-11.

10. EKLER

EK-1



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
29.05.2020	17	21

Karar 17- Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı 151348003 numaralı Melike ÖZGÜL ÖNAL'ın tez konusunun, etik kurul onayı ile birlikte (etik kurul onayı gerekli ise) "Kültür Ortamında Kanser Hücrelerinin Varlığında Fibroblast Hücrelerinin Olası Davranış Değişikliklerinin Araştırılması" olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

e-imzalıdır Prof. Dr. Ömer FETİK Enstitü Müdürü		
(Katılmadı) Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULULER Müdür Yardımcısı		e-imzalıdır Dr. Öğr. Üyesi Stüheyla RAHMAN Üye
e-imzalıdır Prof. Dr. Necip KUTLU Üye	e-imzalıdır Dr. Öğr. Üyesi Nursen BOLSOY Üye	e-imzalıdır Prof. Dr. Murat TAŞ Üye
e-imzalıdır Ayşe ERTİK Enstitü Sekreteri V.		

Ash Gibidi
01/06/2020

Ayşe ERTİK
Enstitü Sekreteri V.



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

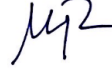
Tez Adı

"Kültür Ortamında Kanser Hücrelerinin Varlığında Fibroblast Hücrelerinin Olası Davranış Değişikliklerinin Araştırılması"

Tezime ilişkin 04/05/2020 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 8'dir.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
04.05.2020



Adı Soyadı : Melike ÖZGÜL ÖNAL
 Öğrenci No : 151348003
 Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
 Programı : Doktora



DANIŞMAN ONAYI
 UYGUNDUR.
 Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Melike	Soyadı	Özgül Önal
Doğum Yeri	Fatih	Doğum Tarihi	08.06.1989
Uyruğu	T.C	Tel	0(554)2091157
E-mail	melikeozgulonal@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2020
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi	2016
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2012
Lise	Dalaman Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Araştırma Görevlisi	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2018-Halen
Araştırma Görevlisi	Manisa Celal Bayar Üniversitesi (35.madde ile görevlendirme)	2013-2018

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE
73.75		81.25						

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office	İyi
Os X iWork	İyi