

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTEL HÜCRELERİ VE LARİNKS KANSERİ
HÜCRELERİNİN KARŞILIKLI KONUŞMALARININ HÜCRE
ÇOĞALMASI, İNVAZYON VE METASTAZA ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Zeynep Betül SARI

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülün ÇORA

KONYA-2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTEL HÜCRELERİ VE LARİNKS KANSERİ
HÜCRELERİNİN KARŞILIKLI KONUŞMALARININ HÜCRE
ÇOĞALMASI, İNVAZYON VE METASTAZA ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Zeynep Betül SARI

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülün ÇORA

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 1710209 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2019

ONAY FORMU SAYFASI

ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Zeynep Betül SARI tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda Doktora Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

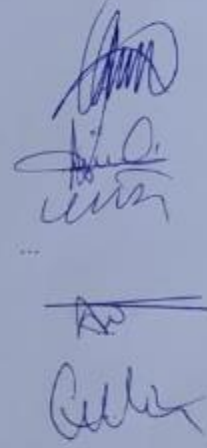
Jüri Başkanı : Dr. Öğretim Üyesi Oğuz ÇILINGİR
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Danışman : Prof.Dr. Tülin ÇORA
Selçuk Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Nadir KOÇAK
Selçuk Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Bahar KELEŞ ÇOLPAN
Selçuk Üniversitesi

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Şenol ÇITLI
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir..

Prof.Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktoram esnasında bana katkıda bulunan ve destek veren rehberliği, yardımları, şefkati, anlayışı ve nahifliği için danışman hocam Prof. Dr. Tülün ÇORA'ya ve tez çalışmam esnasında beni yönlendiren, problemlerimi sabırla dinleyip çözüm bulmamda yardımcı olan hocam Doç. Dr. Nadir KOÇAK'a en içten saygı ve sevgilerimi sunmak isterim.

Ayrıca yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca danışman olarak ilminden ve tecrübelerinden faydalandığım, hoşgörü ve sabrını ve de genetik ilmine tutkusunu örnek aldığım; hakkını ödeyemeyeceğim değerli hocam Prof. Dr. Hasan ACAR'a en içten sevgi ve hürmetlerimi sunarım. Üzerimdeki emeği paha biçilemezdir; her zaman minnettar olacağım.

Tanıştığımız günden beri beni her anlamda olumlu yönde etkileyen ve geliştiren, tezimle ilgili maddi ve manevi desteklerini, bilimsel önerilerini esirgemeyen akıl hocalığı için manevi ablam Öğr. Gör. Dr. Emine YAVUZ'a; hem yüksek lisans hem doktora eğitimlerim esnasında beni şevklendiren, yüreklendiren Tıbbi Genetik ailesinden diğer manevi ablam yüksek biyolog Gülsüm TÜRKÖĞLU'na; güzel dostluğu ve ayrıca real time qPCR metodundaki destekleri için Uz. Dr. Büşra ÇAVDARTEPE'ye; yoldaşlığı ve heyecanlı arkadaşlığı için bölümümüzün eski çalışanlarından master öğrencisi Emine GÖK'e; taze çayı ve hoş sohbetiyle bölümümüzün Şerife Ablası'na (AYDOĞDU), dostluğu ve muhabbeti için çalıştığım kurumdaki (İLTEK) Öğr. Gör. Dr. Hande YÖNDEMLİ'ye; her sohbetimizde yeni ve ilginç şeyler öğrendiğim ufuk açıcı dostluğu için Arş. Gör. Zahide TOSUN'a çok teşekkür ederim. Ömür boyu olmasını ümit ettiğim dostluğunuz paha biçilemez.

Hem arkadaşlığı hem de özellikle real time qPCR metodundaki desteği ve her takıldığımda yolumu açması vesilesiyle Dr. Öğr. Üyesi Mustafa HİTİT'e; -özellikle kritik ve inatçı bir deney grubumda bir türlü RNA'daki üç bantı göremediğimde RNA izolasyonunda bana yardımcı olan ve ayrıca lisansüstü eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Süleyman NERGİZ'e; beni GraphPad yazılımı ile tanıştıran istatistiklerimi kendim yapmama vesile olan Dr. Ali AZZAWRİ'ye; Tümör Mikroçevresiyle alakalı Nature'daki bir makaleyi bana göndererek bu konuya yönelmeme vesile olan kardeşim gibi sevdiğim adaşım Öğr. Gör. Zeynep GÜL'e; tezim için HUVEC hücre hattı teminine yardımcı olan ve dostluğunu gördüğüm Dr.

Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI ve hücre hattını hediye eden Dr. Öğr. Üyesi Timuçin AVŞAR'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca maddi manevi desteklerinden dolayı tüm Tıbbi Genetik Anabilim dalı arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezi, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem rahmetli Lamia ERCOŞKUN BULUT'a; babam Mehmet Ali BULUT'a ve özellikle tezimin, aslında hayatımın hiçbir aşamasında yardımını ve desteğini esirgemeyen, 'her şeyi değerli kılan şartsız sevgi'nin anlamını gösteren sevgili kocam Muhammed Emin SARI ve ilham kaynağım oğulcuğum Selman Yusuf SARI'ya ithaf ediyorum.



İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser ve İnflamasyon	2
1.2. Tümör Mikroçevre.....	4
1.2.1. Tanım.....	4
1.2.2. Tümör Mikroçevre Şartları.....	5
1.2.3. Tümör Mikroçevre Elemanları	7
1.2.4. Tümör Mikroçevredeki Geri Dönüşümsüz Değişimleri Tetikleyenler	11
1.3. Baş Boyun Kanseri	12
1.3.1. Baş Boyun Kanseri ve Patogenezi	12
1.3.2. Baş Boyun Kanseri ve İnvazyonu	14
1.3.3. Baş Boyun Kanseri ve Metastazı	15
1.3.4. Baş Boyun Kanseri ve Mikroçevresi.....	16
1.3.5. Baş Boyun Kanserinin Mikroçevresinde Sitokinlerin Etkisi	18
1.3.6. Baş Boyun Kanserinin Mikroçevresinde MMP'lerin Rolü.....	21
1.3.7. Baş Boyun Kanserinde Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)	23
1.4. Ko-Kültür.....	24
1.5. <i>In Vitro</i> Migrasyon ve İnvazyon.....	26
1.6. Ekspresyon Analizi için Seçilen Genler	27
1.6.1. N-cadherin (Cadherin-2-CDH2):	27
1.6.2. CXCL8 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 8).....	28
1.6.3. CCL21 (Chemokine (C-C motif) ligand 21)	28
1.6.4. MMP2 ve MMP9 (Matris Metalloproteinaz)	28
1.6.5. ITGB1 (Integrinler ve Integrin Beta-1)	29
1.6.6. VIM (Vimentin)	29
1.7. Projenin Amacı	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	31
2.1. Hücre Kültürü ve Stoklama	31
2.2. Hücre Sayımı	32
2.3. Ko-kültür Sistemleri	33
2.3.1. Direkt ko-kültür.....	33
2.3.2. İndirekt ko-kültürler	34
2.4. Morfoloji Analizi	35
2.4.1. Puromisin Seleksiyonu	36
2.4.2. Morfoloji Analizi için Direkt Ko-Kültür.....	36
2.4.3. Morfoloji Analizi için İndirekt Ko-kültür	37
2.5. Proliferasyon Deneyleri	38
2.5.1. MTT Deneyi	38
2.5.2. Tripan Mavisini Deneyi.....	39
2.5.3. XTT Deneyi.....	40

2.5.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi.....	40
2.6. Migrasyon Deneyi	42
2.7. İnvazyon Deneyi	44
2.7.1. Matrijel Hazırlanması.....	44
2.8. Hedef Genlerin Ekspresyon Analizleri	48
2.8.1. CM Muamelesi	48
2.8.2. RNA İzolasyonu	48
2.8.3. RNA Miktarı ve Kalitesinin Belirlenmesi.....	48
2.8.4. Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması.....	49
2.8.5. Reverz Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu (cDNA Sentezi).....	49
2.8.6. Primerlerin Seçimi ve Dizaynı	50
2.8.7. Primerlerin Sulandırılması	51
2.8.8. Referans Gen Seçimi	51
2.8.9. Primer Dilüsyonları ile Primer Etkinliğinin Belirlenmesi.....	51
2.8.10. Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR)	52
2.9. İstatistiksel Analizler	53
3. BULGULAR.....	55
3.1. Hücre Kültürü	55
3.2. Morfoloji Analiz Sonuçları.....	56
3.2.1. Puromisin Seleksiyon Sonuçları.....	56
3.2.2. Hücrelerin Ko-kültür Sonrası Konfokal Mikroskop Görüntüleri.....	57
3.3. Proliferasyon Deney Sonuçları	60
3.3.1. MTT ve XTT Deney Sonuçları	60
3.3.2. Tripan Mavisı Deney Sonuçları	63
3.3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Sonuçları	64
3.4. Migrasyon Deney Sonuçları	69
3.5. İnvazyon Deney Sonuçları.....	75
3.6. Gen Ekspresyon Sonuçları.....	77
3.6.1. Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu	77
3.6.2. cDNA Eldesi ve Kontrolü	78
3.6.3. Primer Etkinlikleri	79
3.6.4. Referans Gen Seçimi Sonuçları:.....	79
3.6.5. Hedef Genlerin mRNA Ekspresyonunun Optimizasyonu ve Analizi	81
4. TARTIŞMA	86
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
6. KAYNAKLAR	102
7. EKLER	111
8. ÖZGEÇMİŞ	113

SİMGELER VE KISALTMALAR

2B	: İki Boyutlu
3B	: Üç Boyutlu
ACTB	: Aktin Beta
APC	: Antijen sunan hücre
ATP	: Adenozin Trifosfat
B2M	: Beta-2-Mikroglobulin
BBSHK	: Baş boyun skuamöz hücre karsinomu
CAF	: Kanserle İlişkili Fibroblast
CCR7	: C-C motif kemokine reseptör 7
CDH2	: Kaderin-2
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKN2A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
cDNA	: Komplementer DNA
CM	: Kondisyon Medyumu
Cq	: Siklus Eşik
CSF-1	: Koloni Uyarıcı Faktör-1
CXCL	: C-X-C kemokin ligand
CXCR4	: C-X-C kemokin reseptör tip 4
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGF	: Epitelyal Growth Faktör
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz.
FBS	: Fetal sığır serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
gDNA	: Genomik DNA
GFP	: Yeşil Floresan Protein
GM-CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HEp-2	: Human epitelyal karsinoma
HIF	: Hipoksi İndükleyici Faktör
HIF-1a	: Hipoksi İndükleyici Faktör-1a
HPRT1	: Hipoksantin Fosforibosiltransferaz
HUVEC	: Human umbilical vein endotelial hücre
IDT	: Integrated DNA Technology
IFN	: İnterferon
ITGB1	: Integrin Beta-1
miRNA	: Mikro RNA
MMP	: Matriks metalloproteinaz

MTT	: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NK	: Doğal katil hücreler
O₂	: Oksijen
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
RNA	: Reoksibonükleik Asit
RTCA	: Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR
SHK	: Skuamöz Hücre Karsinomu
TAM	: Tümörle İlişkili Makrofaj
TCGA	: Kanser Genom Atlası
TGF	: Tümör Büyüme Faktörü
TMÇ	: Tümör Mikroçevre
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
VIM	: Vimentin
XTT	: 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5 carboxanilide
YWHAZ	: Tirozin 3-Monooksijenaz/Triptofan 5- Monooksijenaz Aktivasyon Protein Zeta

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Endotel hücreleri ve Larinks Kanseri Hücrelerinin Karşılıklı Konuşmalarının Hücre Çoğalması, İnvazyon ve Metastaza Etkilerinin incelenmesi

Zeynep Betül SARI

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2019

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (BBSHK), halk sağlığı açısından önemli bir sorundur ve dünyadaki en yaygın altıncı kanserdir. Ancak BBSHK'lerinin karsinogenezi hala net olarak ortaya konulamamıştır. Yapılan çalışmalar, kanser hücreleri ve mikroçevresindeki stroma arasındaki etkileşimin, tümör büyümesinde kritik bir faktör olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı larinks kanser hücre hattı HEp-2 ve tümör mikroçevre elemanlarından endotel hücre hattı HUVEC hücreleri arasındaki resiprokal ilişkiyi araştırarak tümörün progresyonunun aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır.

Bu çalışmada HEp-2 hücrelerinin, HUVEC hücrelerine ve HUVEC hücrelerinin HEp-2 hücrelerine etkileri hücresele düzeyde (morfolojik analiz, proliferasyon, migrasyon, invazyon testleriyle) ve moleküler düzeyde kanser progresyonunda ilişkili genlerin (CDH2, CLC21, CXCL8, ITGB, MMP2, MMP9, VIM) ekspresyon analiziyle araştırılmıştır. Konfokal mikroskop ile ko-kültürdeki hücrelerin morfolojileri mono-kültürlerine göre kıyaslandı. Mono-kültürde GFP-HEp-2 hücreleri yuvarlak bir formda olup koloni halinde çoğalmayı seçerken; HUVEC ile ko-kültürde ise GFP-HEp-2 hücreleri tek tek çoğalmayı seçmiş ve mekik şekline dönüşmüşlerdir. Proliferasyon için xCELLigence sisteminin 72. saatteki cell indeks sonuçlarına göre, %10 HUVEC-CM (CI: 6,553, $p < 0,05$) ile ko-kültürü yapılan HEp-2 hücreleri, mono-kültür HEp-2 hücreleri (CI:7,299) ile kıyaslandığında daha yavaş bir proliferasyon söz konusudur. %10 HEp-2-CM (CI: 8,342, $p > 0,05$) ile ko-kültürü yapılan HUVEC hücreleri, mono-kültür HUVEC hücrelerinden (CI: 8,411) daha az çoğalmıştır. HUVEC-CM'de kültüre edilen HEp-2 hücrelerinin, kontrole kıyasla, göç ve hareketlilik için daha fazla kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde HEp2-CM'de kültüre edilen HUVEC hücrelerinin ise kontrole kıyasla, göç ve hareketlilik için daha fazla kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir. İnvazyon deneyleri için HUVEC ile ko-kültürü yapılmış HEp-2 hücreleri (%17,01), mono-kültür HEp-2 hücrelerine (%33,24) kıyasla daha az invazyon yapmıştır ($p > 0,05$). Buna karşılık, HEp-2 ile ko-kültürü yapılmış HUVEC hücreleri (%25.64), monokültür HUVEC hücrelerine (%14,80) kıyasla daha fazla invazyon göstermiştir ($p > 0,05$). Gen ekspresyonu için HEp-2 hücresi ve bunun HUVEC-CM'si ile uzun süreli (U) ve kısa süreli (K) indirekt ko-kültür grupları karşılaştırılmıştır. Buna göre Ko-kültür-U'daki CDH2, ITGB ve MMP2 ekspresyonları ($p < 0,0001$), CCL21 ve CXCL8 ekspresyonları ($p < 0,01$), MMP9 ve VIM ekspresyonları ($p < 0,05$) kontrole kıyasla önemli derecede azalmıştır. Ayrıca, HUVEC hücresi ve bunun HEp-2-CM'si ile uzun süreli ve kısa süreli indirekt ko-kültür grupları karşılaştırılmıştır. Buna göre hem Ko-kültür-U hem de Ko-kültür-K'daki CDH2, CXCL8 ve ITGB ekspresyonları kontrole kıyasla azalırken; hem Ko-kültür-U hem de Ko-kültür-K'daki CCL21, MMP2, MMP9 ve VIM ekspresyonları kontrole kıyasla artmıştır.

Sonuç olarak; kanser hücreleri, mikroçevre elemanlarından endotel hücrelerini kanser lehine etkilerken; endotel hücreleri ise, kanser hücrelerinin kısmen agresifliğini azaltmaktadır.

Anahtar Kelimeler: baş boyun skuamöz hücre karsinomları; endotel hücre; kokültür; tümör mikroçevre.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of The Effects of Interactions Between Endothelial Cells and Laryngeal Cancer Cells on Cell Proliferation, Invasion and Metastases

Zeynep Betül SARI

Department of Medical Genetics

PhD THESIS / KONYA-2019

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are major problem in terms of public health and is the sixth most common cancer in the world. However, the carcinogenesis of HNSCC has not been clearly understood. Studies have shown that the interaction between cancer cells and the surrounding stroma is a critical factor in tumor growth. Therefore, the aim of this study is to investigate the reciprocal relationship between endothelial cell line HUVEC cells and the laryngeal cancer cell line HEP-2 due to highlight of contribution of tumor progression.

In this study, the mutual effects of HEP-2 cells and HUVEC cells are investigated at the cellular level (morphological analysis, proliferation, migration, invasion tests) and at the molecular level (cancer related genes -CDH2, CLC21, CXCL8, ITGB, MMP2, MMP9, VIM- expressions). The morphology of the cells in the co-culture was compared according to their monocultures by light and confocal microscopes. After co-culture, HEP-2 cells became elongated like a shuttle and spread-out while in mono-culture they were rounded and non-spread (collective) form. According to the results of xCELLigence system, the HEP-2 cells co-cultured with %10 HUVEC-CM (CI:6.553, $p < 0.05$) proliferated slowly in comparison with control HEP-2 cells (CI: 7.299). And also, the HUVEC cells cocultured with %10 HEP-2-CM (CI:8.342, $p > 0.05$) proliferated less than control HUVEC cells (CI:8.411). When compared to controls both HEP-2 cells cultured in HUVEC-CM and HUVEC cells cultured in HEP 2-CM showed a greater capacity for migration and mobility. According to the results of invasion assays, the HEP-2 cells co-cultured with HUVEC (%17.01) in transwell chamber did not show more invasion capacity than HEP-2 cells alone (%33.24, $p > 0.05$). By contrast, HUVEC co-cultured with HEP-2 cells (%25.64) in transwell chamber were observed invading compared with the HUVEC cells alone (%14.80, $p > 0.05$). For gene expression analysis, HEP-2 cells co-cultured with HUVEC-CM in long-term (L) and short-term (S) indirect co-culture groups were compared. Accordingly, CDH2, ITGB and MMP2 expressions ($p < 0.0001$), CCL21 and CXCL8 expressions ($p < 0.01$), MMP9 and VIM expressions ($p < 0.05$) in co-culture-L were significantly reduced compared to control. And HUVEC cell co-cultured with HEP-2-CM in long-term and short-term indirect co-culture groups were compared. According to this result, both CDH2, CXCL8 and ITGB expressions in both coculture-L and co-culture-S decreased compared to control; the expressions of CCL21, MMP2, MMP9 and VIM in both co-culture-L and co-culture-S were increased compared to control.

As a conclusion, while cancer cells affect endothelial cells in favor of cancer, endothelial cells partially reduce the aggressiveness of cancer cells.

Key words: coculture; endothelial cell; head and neck squamous cell carcinoma; tumor microenvironment.

1. GİRİŞ

Kanserin başlangıcı ve ilerlemesi boyunca mikroçevrenin rolü, ilerlemiş moleküler tanı ve tedavi için kritik bir önem kazanmıştır. Tümör mikroçevresi farklı hücre tiplerinin birbirleriyle konuşmasının ürünüdür (Mbeunkui ve Johann Jr 2009). Dolayısıyla biyolojik ortamda kanser hücreleri, farklı hücreler ile komşuluk yapmakta ve bunlarla etkili iletişimi olması beklenmektedir. Ancak, kanser hücre hatlarıyla yapılan pek çok *in vitro* çalışma tümör mikroçevresini hesaba katmadan yapılmaktadır; bu durum şu anki mevcut çalışmaları, kanser hücrelerinin biyolojisine ve tedaviye dirençlerine destek olan stroma hücrelerinin etkilerini de araştırmaya yönlendirmiştir (Mraz ve ark 2011). Tümörün mikroçevresinin karsinogenezde önemli bir düzenleyici olduğu fikri ilk defa Paget tarafından ünlü 'seed and soil' hipoteziyle önerilmiştir. Belirli kanser tipleri (tohum), sıklıkla orijinal bölgelerindeki mikroçevreyle benzerliği olan belirli yerlere (toprak) metastaz yapma eğilimindedir (Paget 1889). Yeni veriler de bu hipotezi desteklemekte ve tümör mikroçevresindeki primer fonksiyon kaybının kanser oluşumunda önemli olduğunu belirtmektedir. Bu bulgular, bilimadamlarını kanser kemopreventifinde (bir hastalığın oluşumunu önlemek veya azaltmak için ilaçların, kimyasal maddelerin, vitaminlerin veya diğer maddelerin kullanılması) mikroçevreyi hedefleyen çalışmalar yapmaya zorlamaktadır. Devam eden pandemik kanser ölümleri kanserin doğası ve bunun nasıl kontrol edileceği hakkındaki temel kabullenmelerimizi tekrar gözden geçirmeyi gerektirmektedir. Tümör mikroçevresine dair yapılan çalışmalardan gelen veriler karsinoma teriminin yeniden revize edilmesini önermekte ve kanseri kontrol etmek için kanser oluşumunu ve karsinomları tek tek kanser hücrelerinde olan değil, dokularda olan bir fenomen olarak değerlendirmektedir. Bu bakış açısına göre mikroçevre, kanserin önemli bir parçasıdır (Albini ve Sporn 2007).

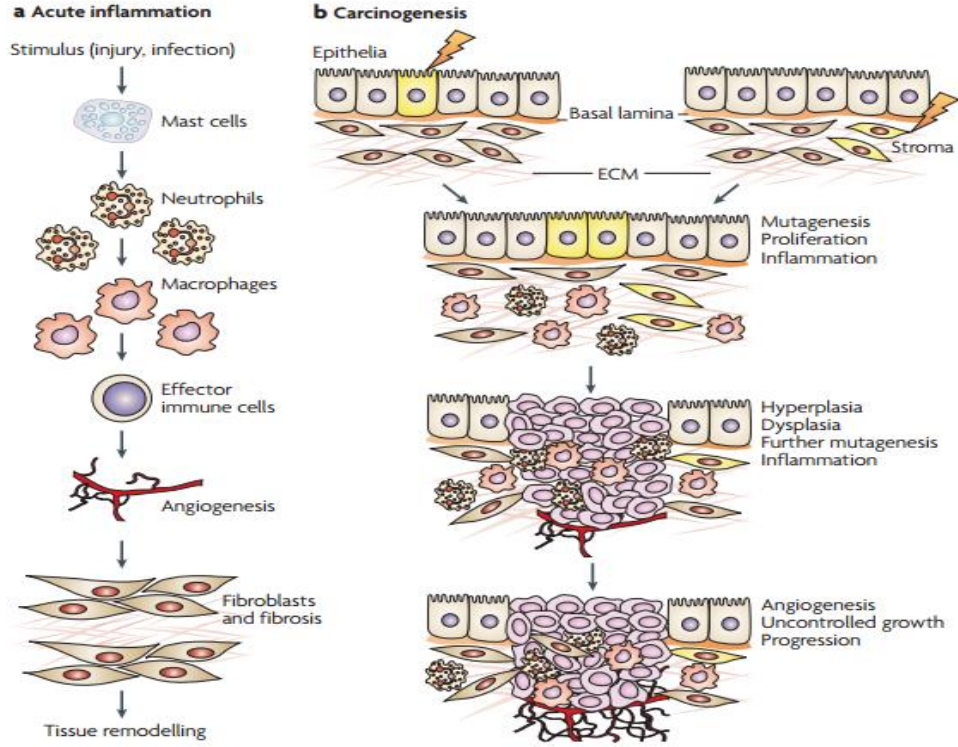
Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (BBSHK), halk sağlığı açısından önemli bir sorundur ve dünyadaki en yaygın altıncı kanserdir (Parkin ve ark. 2005). BBSHK ile ilişkili morbidite ve mortalite oranları son 30 yılda çok az bir değişiklik gösterdiğinden, hastalığın erken saptanması veya önlenmesi çok önemlidir. Bu nedenle, BBSHK ile ilgili temel araştırmalar artmakta, doğası ve agresifliğinin tanımlanması için spesifik biyobelirteçlerin belirlenmesine odaklanılmaktadır (Arellano-Garcia ve ark 2008).

BBSHK'nın tümör mikroçevresindeki hücrelerle ilişkisine dair Yapılan çalışmalar, kanser hücreleri ve çevresindeki stroma arasındaki etkileşimin, tümör büyümesinde kritik bir faktör olduğunu göstermektedir (Anton ve Glod 2009). BBSHK için hem tümör hem de sağlıklı hücrelerde mikroçevrenin etkisi analiz edildikçe, ayrıca BBSHK'nın tümör mikroçevresindeki hücrelerin birbirleriyle olan moleküler ilişki ağı açıklığa kavuşturulduğunda, bu kanserin patogenezi daha iyi anlaşılacaktır. Tümör mikroçevresinin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılması antikanser terapinin geliştirilmesinde kritik bir anahtardır.

1.1.Kanser ve İnflamasyon

Kanser hücresi yalnız bir ada ya da solo performans değil, daha ziyade bir koronun ürünüdür (Şekil 1.1). Tümör hücreleri, malin ilerleyişi durdurmayı amaçlayan normal hücrelerin arasında lider kötü adamı oynar (Albini ve Sporn 2007).

Tümör mikroçevresine getirilen immün sistem hücrelerini dost olarak biliniz ancak; immün sistem hücrelerinin karanlık bir yanı vardır (Hanahan ve Weinberg 2000). Kanser, hücrelerin yaralanmaya karşı verdikleri cevap olan inflamasyonla ilişkisinin ilk kanıtı 1863'te Rudolf Virchow tarafından tümörlerde lökositlerin bulunduğunu rapor ederek tanımlanmıştır (Balkwill ve Mantovani 2001). Kronik inflamasyon, obezite, alkol tüketimi, yağlı diyetler gibi faktörler, çoğu kanser türü için majör risk faktörüdür. Çünkü tüm bu risk faktörleri inflamasyonla ilişkilidir. Ancak hücrelerin akut inflamasyon cevabı koruyucudur. Bununla beraber inflamasyona sebep olan ajanla uzun zaman muhatap olunursa, hücrenin buna cevabı kronik inflamasyon şeklinde olacaktır (Hanahan ve Weinberg 2000). Tabiri caizse yavaş yavaş küllenen ateş (kronik inflamasyon), aniden parlayan ateşten (akut inflamasyon) daha fazla zarar verir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Akut inflamasyon ve karsinogenez arasındaki korelasyon ve zıtlıklar. a) Akut inflamasyon ve doku tamirindeki olayların sırası. b) inflamasyon ve tamirin kaotik disorganizasyonu olarak karsinogenez (Albini ve Sporn 2007).

Neoplastik progresyonun erken evrelerinden önce vuku bulan inflamatuvar lezyonlar kanser gelişimine katkıda bulunurlar. Örneğin Crohn's hastalığı ve ülseratif kolit gibi veya Barrett Sendromunda kronik reflüks özofat gibi kronik inflamatuvar bağırsak hastalıklarında sırayla kolorektal veya özofegal kanser gelişme riski artmıştır (Van der Woude ve ark 2004). Enfeksiyon etiyojisi kanserleri de kronik inflamasyonla ilişkilidir. Örneğin Hepatit B ve hepatit C virüsleri karaciğer kanseriyle, *Schistosoma hsematobium* mesane kanseriyle, *Helicobacter pylori* mide kanseriyle ilişkilidir (Karin ve ark 2006).

Fizyolojik akut inflamasyon ve tamirdeki olaylarda belirli bir sıra vardır (Kumar ve ark 2009). Ancak kronik cevapsız inflamasyon ve karsinogenez boyunca bu olaylar kaotik olarak düzensizleşecektir. Bu kaotik lokal mikroçevre, tümörleri 'iyileşmeyen yara' olarak tanımlamaktadır (Albini ve Sporn 2007).

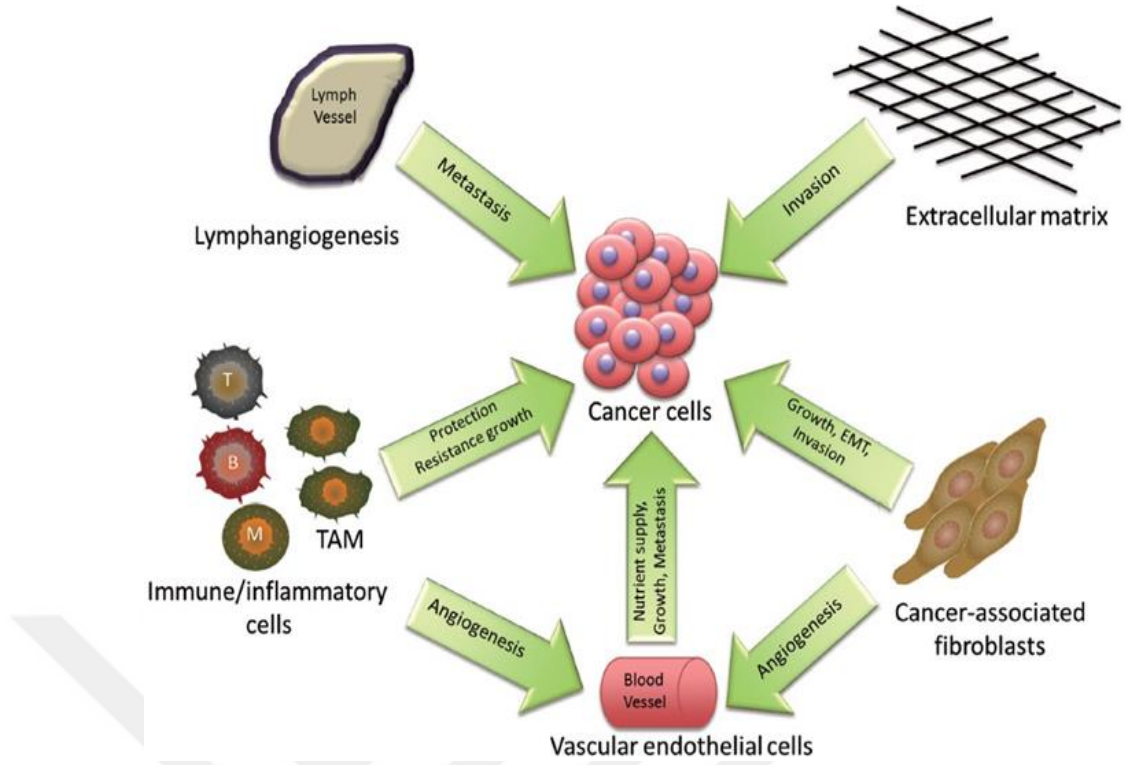
Ayrıca inflamasyon, kandaki mikrodamarları düzenleyen endotel hücrelerinde meydana gelen değişikliklere bir cevap olarak düşünülmektedir. Kronik inflamasyon, anjiyogenez gibi endotel hücre yanıtlarını içermektedir. Bu endotel hücre davranışlarının her biri büyük oranda spesifik mediyatör sınıflarıyla ilişkilendirilse de,

aynı mediatörler endotel hücre cevabının farklı aşamalarına katkıda bulunabilir (Pober ve Sessa 2007).

1.2.Tümör Mikroçevre

1.2.1. Tanım

Bir hücrenin davranışı, onu saran çevreye bağlıdır; bu da mikroçevre olarak adlandırılır. Bir kanserin mikroçevresi, kanserin anatomisi, fizyolojisi ve fonksiyonunun bir parçasıdır ve bu mikroçevre, kanser hücrelerinden tamamıyla ayrılamaz (Albini ve Sporn 2007). Normal dokuda, hücreler kompleks bir etkileşim ağı boyunca haberleşirler; fiziksel olarak direkt veya hücre dışı matriks (ECM) ile, biyokimyasal olarak hem çözünen hem çözünmeyen sinyal molekülleri aracılığıyla ilişki kurarlar (Bissell ve Radisky 2001). Devamlı olan inflamatuvar şartlar altında stromal fibroblastlar tarafından salgılanan matriks metalloproteinaz (MMP) gibi enzimlerin daimi upregülasyonu ECM'yi dağıtabilir, immün hücrelerin istilası anormal gen ekspresyonunu artıran faktörlerin fazla üretilmesine sebep olabilir. Bu şartlar normal olarak geri dönüşümlüdür, fakat inflamasyon devam ederse hücrelerin normal organizasyonu sağlıklı hücrelerin içinde gen ekspresyon instabilitesine ve tümörojenik potansiyel kazanmasına neden olabilir. Bu kronik inflamasyon şartları proliferatif sinyal ağlarını tamamen bozan çoğunlukla inflamatuvar hücreler tarafından orkestra edilen tümör mikroçevrenin kurulmasına yardımcı olur. Özetle tümör mikroçevresi, çeşitli hücre türleri içeren heterojen bir komplekstir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Kanserin mikroçevredeki dostları (Leyva-Illades ve ark 2012).

1.2.2. Tümör Mikroçevre Şartları

Tümör mikroçevresi hipoksiya, düşük pH ve gıda yetersizliği ile karakterizedir (Williams ve ark 2001).

Hipoksiya

Moleküler oksijen, çoğu ökaryotlarda hücre sel solunumun terminal elektron alıcısı olarak kullanılır. Hücrelere oksijen taşınımı, talebi karşılamıyorsa hipoksi (alt-fizyolojik doku oksijenasyonu) oluşur. Hipoksiya, tümör mikroçevrenin kritik özelliğidir. Tümörler, bozulmuş anjiyogenezis sonucunda hipoksiya geliştirirler (Harris 2002). Tümör çeşidine bağlı olarak kısmi O₂ basıncı değişmektedir (Çizelge 1.1.). Düşük oksijen basıncı gösteren tümörler, kötü prognoz ve tedaviye dirençli gösterilmiştir. Hipoksiya ayrıca metabolik yeniden programlanma, epitel-mezenkimal geçiş (EMT) ve tedaviye dirençle ilişkilidir.

Hipoksi uyarımlı faktörler (*HIF*), hücrelerin düşük oksijen çevre şartlarına uyum kazanmasını sağlayan birçok genin ekspresyonundan sorumlu olan transkripsiyon faktörleri olup kanser hücrelerinde metabolik değişim mekanizmasından sorumludur (Harris 2002). Tümörler düşük oksijen basınçlı bölgeler

geliştirirler ve bu da HIF aracılığıyla hipoksik stres cevabını aktifleştirir. HIF'in sadece düşük oksijende değil, ayrıca radyasyon indüklü DNA hasarı, büyüme faktörlerinden gelen sinyaller ve piruvat varlığında da indüklendiği rapor edilmiştir. HIF aktifleştğinde aerobik glikolizi ve bunu destekleyen genleri aktifleştirir; ayrıca normal solunumdaki genleri baskılar (Hanahan ve Weinberg 2000).

Çizelge 1.1. Solid tümörler ve onu çevreleyen sağlıklı dokulardaki kısmi O₂ basıncı (Brown ve Wilson 2004).

Tümör Tipi	Ortalama hastalık pO₂	Ortalama sağlık pO₂
Glioblastom	4,9-5,6	-
Baş boyun kanseri	12-15	40-51
Akciğer kanseri	7,5	38
Meme kanseri	10	-
Pankreas kanseri	2,7	52
Rahim ağzı kanseri	3-5	51
Prostat kanseri	2,7	52
Yumuşak doku sarkomu	6,2-18	-

Warburg Etkisi

Kanser kontrolsüz hücre bölünmesi olduğuna göre kanser hücreleri bu çılgın büyümeye ayak uyduracak enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Enerji solunumdan elde edilip bu enerji adenozin trifosfat (ATP) olarak depolanmaktadır. Solunum iki yolla olmaktadır; birincisi normal hücreler normal şartlarda O₂ gerektiren metabolik yolak olan oksijenli solunum yaparlar. Glikozu piruvata dönüştürüp 32 mol ATP elde edilir ve karbondioksit (CO₂) atık olarak atılır. İkincisi, yeterli oksijen (O₂) yoksa hücreler oksijensiz solunum yapar; fakat 2 mol ATP elde edilir. Kanser hücrelerinin değişen şartlara uyum göstermesi için hücrelerde enerjinin yeniden programlanması gerekmektedir. Kanser hücreleri, hızlı büyümesi esnasında artmış oranda glikoliz

yapar. Buna Warburg Etkisi denir. Kanser hücreleri normal hücelere göre 20 kat daha fazla glikoz tüketir ve glikoliz ile CO₂ yerine laktik asit salgılar ve yalnızca 2 mol ATP elde eder. Kanser hücrelerinin bu etkisiz metabolik yolu kullanmalarının iki sebebi vardır. İlki, kanser hücrelerinin ATP'yi, normal hücelere göre 100 kat daha hızlı üretebilmesidir. İkincisi ise meselenin sadece ATP üretmek olmayıp glikoliz esnasında üretilen ara biyosentetik prekürserlere ihtiyaç duymasıdır. Kanser hücreleri, ayrıca glikozun hücelere giriş yolu olan yüzey membranındaki glikoz transportörleri üretir ve daha fazla glikoz girişini sağlar. Aslında normal hüceler de bu yolağı yara iyileşmesi ve immün cevapta da kullanmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000).

Asidik Ortam

Ortamdaki glikoz ve diğler besinlerin azalması, yukarıda anlatılan sebeplerden dolayı kanser hücelerinde enerji yeniden programlanması ve bunun sonucunda ortamda biriken laktik asit gibi metabolik atıklar ve toksikler etkisiyle çevrede düşük pH-asidozis oluşmaktadır. Bu da deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonunda görevli helikaz ve polimeraz gibi enzimlerin yapı ve fonksiyonunun değışmesine sebep olmaktadır (Eckert ve Kunkel 1993). Bir başka çalışmada ise ortamdaki besin eksikliği ve asidozisin metastazı artırdığı bildirilmiştir (Cuvier ve ark 1997).

1.2.3. Tümör Mikroçevre Elemanları

Tümör mikroçevresi (TMÇ); endotelial hüceler ve perikürsörleri, perisitler, düz kas hüceleri, fibroblastlar, kanser ilişkili fibroblastlar (CAF'lar), miyofibroblastlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, mast hüceleri, T ve B lenfositleri, doğal katil hüceler (NK'lar) ve makrofaj ve dendritik hüceleri içeren antijen sunan hüceler (APC'ler) gibi birçok farklı hücre tipini içermektedir (Coussens ve Werb 2002).

Epitelyanın stroması tarafından epitelin kontrolü, normal dokularda varsayılan bir durumdur. Mikroçevre ciddi olarak bozulduğunda epitel hüceleri fonksiyonunu kaybedebilir. Bundan dolayı, kanser hücelesine pasif bir tepki olmak yerine, fonksiyonunu kaybeden epitel hücelerinin büyümeye devam edip etmeyeceğini ve belli bir alana invaze olup olmayacağını veya tümüyle mikrohiperplazi olup olmayacağı veya tamamen elimine olup olmayacağına karar vermede mikroçevre primer aktif rol olabilir (Albini ve Sporn 2007).

TMÇ'nin hücreselelemları genelde tümörle birlikte evrim geçirir. Stromal fibroblastlar, T hücreleri, makrofajlar ve diğere hücre tipleri, kanser hücrelerine kontrolsüz yanıtlarla anormal fenotipler geliştirirler. Bu kanserli olmayan hücreler, kanser hücrelerinin pleiotropik yeteneklerini geliştirmek için gerekli olan birçok parakrin sinyal sağlar (Weinberg 2008). Örneğın, fibroblastlar CAF haline gelerek MMP'ler gibi faktörlerin salgılanmasına neden olur ve tümörün invazyon kapasitesine katkıda bulunur. Ayrıca, sitotoksik T hücrelerinin apoptozisi ve baskılayıcı T hücrelerinin aktivasyonu gibi adaptif immün yanıta değışiklikler meydana gelir (Cavallo ve ark 2011). Tümörler, yüksek enerji ve anabolik ihtiyaçlarını karşılamak için metabolik olarak verimli bir ortam oluşturarak çevrelerini yeniden programlar (Paget 1989).

Tümör mikroçevresinin elemları ve bunların tümör mikroçevredeki fonksiyonları şunlardır;

Endotel hücreler: Son zamanlarda yapılan çalışmalar, tümör hücreleri ile tümör büyümesini destekleyen endotel hücreleri arasındaki karşılıklı konuşmayı (*cross-talk*) göstermiştir. Hücre temasına bağı etkileşimlerde, skuamöz hücreli karsinom (SHK) hücreleri tarafından eksprese edilen Jagged1, bitişik endotel hücrelerinde Notch sinyalini aktive eder ve tümör büyümesini artırır (Zeng ve ark 2005). Hücre temasından bağımsız bir sistemde SHK hücrelerinde, tümörle ilişkili endotel hücreleri tarafından salgılanan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), büyümeyle ilişkili onkogen; chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) ve chemokine (C-X-C motif) ligand1 interlökin-8 (CXCL8) ekspresyonunu indükler. Özellikle, endotel hücre tarafından başlatılan bu sinyaller *in vivo* olarak tümör büyümesini önemli ölçüde arttırmıştır (Kaneko ve ark 2007). Ayrıca endotel hücrelerinin kanser patobiyolojisindeki etkisinin, tümör hücresi tarafından başlatılan sinyallere cevap olarak anjiyogenik kan damarları yapmakla sınırlı olmadığı gösterilmektedir (Neiva 2009).

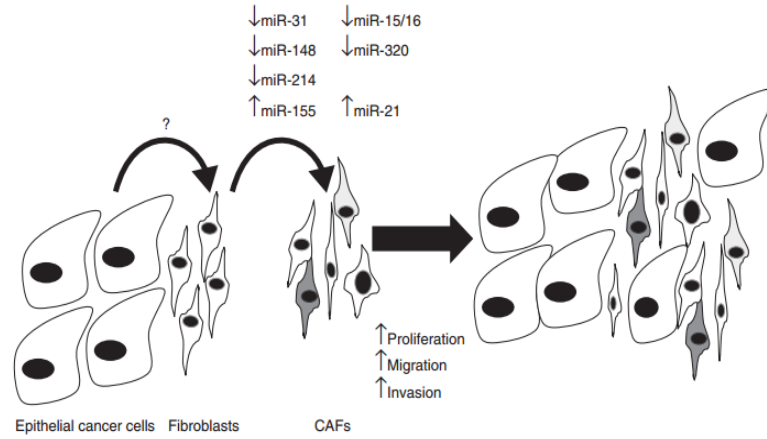
Makrofajlar: Tümör ilişkili makrofajların fenotipi (M2/TAM), normal makrofajlardan (M1) farklı olabilir (Lewis ve Pollard 2006). M2 makrofajları tümör hücrelerini direkt etkileyebilir ve agresifliğı artırabilir. Örneğın makrofajların prostat kanser hücrelerini androjen bağımlılığından kurtaran anahtar rolü olabilir ki malin ilerlemede önemli bir adımdır (Zhu ve ark 2006). TAM'lar, tümör hücrelerinin yarısını

içerirler ve kötü prognozla ilişkilidir. Antikanser savunma mekanizmalarının bir kısmını dört mekanizmayla atlatarak tümör hücrelerine yardımcı olurlar. Tümörler, dolaşımdaki monositleri etkileyecek kemokinleri salgılar. Monositler tümörlü alana girdiğinde TAM'lara farklılaşır. Tümörün hipoksik alanlarında TAM'ları çeken vasküler endotelial growth faktörü (VEGF) salgılanır. TAM'lar da VEGF salgılayarak daha fazla TAM'ı tümörlü alana çeker. TAM'lar tümör hücrelerine kontrolsüz büyümelerini sağlayacak olan önemli büyüme faktörleri ve sitokinler sağlar. TAM'lar özellikle Epidermal Büyüme faktörü (EGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ve interleokin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü (TNF) sağlamaktadır. Tümör mikroçevresine VEGF ve Platelet Derive Büyüme Faktörü (PDGF) salgılayarak anjiyogenezi artırır. VEGF aynı zamanda TAM'ların tümörleşmesini de sağlamaktadır. Metastaz için ECM'nin yıkılması gereklidir. TAM'lar metalloproteinaz salgılayarak bunun yıkımını sağlar ve metastazı uyarırlar. İmmün sistemin kanser öldürücü aktivitesini nötralize ederek immün sistemi baskılar. İmmünsüpresif molekülleri üreterek tümörün immün sistemden kaçmasını sağlar (Hanahan ve Weinberg 2000).

Nötrofiller: Nötrofil, mikroçevredeki önemli diğer hücre tipidir. Bunlar tümör yapısını düzenleyebilir; tümör hücrelerinin büyümesini artırabilir (Albini ve ark 2005). *C-X-C chemokine receptor type 2 (CXCR2)* reseptöründe etkili çeşitli kemokinler tümör içinde üretilen anjiogenik faktör olarak bilinmektedir ve bu, *VEGF*'nin nötrofil bağımlı salınımını içermektedir (Benelli ve ark 2002). *VEGF*'yi takiben nötrofil görevlendirmesi ve *MMP9* salınımını içeren olaylar kaskadı sırayla endotel hücre invazyonu ve damar oluşumuna yönlendiren bu kemokinlerle uyarılmaktadır (Cassatella 2003). Deneysel olarak Ras transformasyonunun bu kaskadı artırdığı gösterilmiştir (Sparmann ve Bar-Sagi 2004).

Fibroblastlar: Tümördeki fibroblastların tümörogenezi artırabileceği bildirilmiştir (Kalluri ve Zeisberg 2006). Bunlar tümör büyümesi ve *C-X-C chemokine receptor type 12 (CXCL12)* ekspresyonuyla damar oluşumunu artıran kanserle ilişkili fibroblast (CAF) gibi tümör fibroblastlarını içerir. *C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)*'ün ligandı olan *CXCL12*, damar gelişimine katkıda bulunan kemik iliği kökenli öncülerini (*prekürsörler*) görevlendirerek anjiyogenezi artırır. Tümör makrofaj örneğinde olduğu gibi CAF'ların normal fibroblastlardan farklı bir fenotipi vardır. Ne *CXCL12* üretirler ne de damar oluşumunu uyarırlar, yalnızca tümör

büyümesine katkıda bulunurlar (Orimo ve ark 2005). CAF'ların orijini tam olarak tanımlanmamış olup çeşitli hücrelerden dönüşebildiği düşünülmektedir. CAF'ların %40'ından fazlası dolaşımın neoplastik büyüme bölgesinden etkilenen kemik iliği *prekürsör* hücrelerinden köken alırlar (Ishii ve ark 2003). CAF'lar ayrıca EMT'ye maruz kalan epitelial kanser hücrelerinden köken alabilir (Petersen ve ark 2003). Stromal fibroblastlar neoplastik hücrelerden köken aldığı için onların tamamen davranışlarını etkileyen ortak genetik lezyonları sürükleyeceği düşünülmektedir. Ayrıca CAF'lar, miyofibroblast diferansiyasyon programına maruz kalan resident/yerleşik fibroblastlardan köken alabilir. Miyofibroblast diferansiyasyon programı, düz kas aktinin yeni ekspresyonunu gösteren ve kanserle ilişkili olduğuna dair bir işareti temsil eder (Petersen ve ark 2003). Güncel deliller spesifik mikroRNA (miRNA)'ların, parakrin aktivitesinin ve fibroblastların kanserle ilişkili duruma geçişinde majör regülatörü olduğunu ortaya koymuştur. miR-31, -214 ve -155 normal fibroblastların CAF'lara farklılaşmasında önemli rolleri vardır (Mitra ve ark 2012) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. miRNA'ların tümör mikroçevresine etkilerinin diagramatik görünümü. (Soon ve Kiaris 2013).

Miyofibroblastlar: Diğer önemli mezenkimal hücresi farklı organlarda farklı görevleri olan miyofibroblastlardır. Miyofibroblastlar epitel veya salgı hücrelerine bitişik dururlar ve çeşitli büyüme faktörü, sitokin, kemokin ve ECM bileşenleri üretir. Birçok reseptör eksprese ederler, ayrıca çözünen mediatörlerin hedefi ve kaynağıdır. Miyofibroblastlar doku bütünlüğü tehlikeye girdiğinde aktif olurlar ve tümör

büyümesini ve genişlemesini özellikle kolon ve karaciğerde aktif bir şekilde artırabilirler (Shao ve ark 2006).

Adipositler: Adipositler tümör mikroçevrenin önemli bileşeni olarak son olarak tanımlanmıştır. Amerika’da obezite hakkındaki endişe, yağ hücreleri ve kanser arasındaki ilişkinin farkındalığını artırmıştır. Obezite birçok kanser türünde bağımsız risk faktörü, özellikle güçlü inflamasyonla birlikteyse, oluşturmaktadır (Calle ve ark 2003). Adipositler, inflamasyonu ve damar oluşumunu etkileyen çeşitli biyolojik olarak aktif molekülleri üretir. Adiposit dokusu çeşitli spesifik sitokinleri (leptin, adiponektin, resistin ve visfatin) ve aynı şekilde inflamatuvar işlemi ve damar oluşumunu artıran *MMP*’leri salgılayan endokrin ve parakrin bir organdır (Wellen ve Hotamisligil 2005).

1.2.4. Tümör Mikroçevredeki Geri Dönüşümsüz Değişimleri Tetikleyenler

Epitel hücreler mi yoksa mikroçevre mi disfonksiyonel hale gelmiştir ya da ‘tümör mikroçevredeki geri dönüşümsüz değişimleri tetikleyen nedir?’ anahtar sorusu hala netlik kazanmamıştır (Comoglio ve Trusolino 2005). Sonuçta onkogenik dönüşüme sebep olan olaylar zincirini tetikleyen mekanizmanın olası ilk ihtimali kronik inflamasyonlar, sonra fibroz, tekrarlayan travmalar kanser başlangıcı için risk faktörleri olabilir. Bu, bazı tümörler için gösterilmiştir; ancak genel bir kural olarak alınmamalıdır (Coussens ve Werb 2002). Alternatif olarak sunulan diğer sebep ise tümör mikroçevresinin subliminal olarak hücrelerdeki prekanseröz modifikasyonları algılayıp buna, hücreleri transformasyona sebep olup maliniteye doğru sürükleyecek ek sinyallerle cevap vermesidir (Comoglio ve Trusolino 2005). Stromal hücrelerdeki genetik değişikliklerin, stroma hücrelerinin meme kanseri hücreleriyle bitişik olması sebebiyle olduğu pek çok yayında belirtilmiştir (Allinen ve ark 2004). Hem meme hem de kolon kanserlerinden köken alan klinik materyallerle yapılan yeni çalışmalar stromada insan kanser gelişiminin erken evreleri boyunca genetik değişmelerin olduğunu göstermiş ve genetik olarak kararsız stromanın ileride epitelyumun genetik kararsızlığını kolaylaştırabileceğini ileri sürmektedirler (Ishiguro ve ark 2006). B hücre lenfomalarının mikrovasküler endotel hücrelerindeki lenfoma spesifik genetik anomalileri gösteren klinik histopatolojik veriler bu bulguları desteklemektedir (Streubel ve ark 2004). Ayrıca hayvan çalışmaları, akciğer tümörlerinin endoteliumunda sitogenetik anomaliler göstermiştir (Hida ve Klagsbrun 2005).

Bununla beraber, sigara içenlerde alveolar kapiller endotel hücreleri mutasyon geçirirse, maruz kalan akciğer alveollerindeki kapillerin anatomik lokasyonundan ötürü bu durum sürpriz olmayacaktır. Buna ilaveten, murin çalışmaları, gastrointestinal bölgenin stromal kısmıyla sınırlı olan başlangıç genetik lezyonların epitel karsinomları uyarmada yeterli olduğunu göstermiştir (Kim ve ark 2006). En provakatif hipotez, tümör mikroçevre içindeki kronik doku hipoksiyasının, yakınındaki epitelyumda daha sonra ileriki mutasyon oluşumunu ve genetik kararsızlığı artıracak olan stromal mutagenezi kolaylaştırdığını önermektedir (Bindra ve Glazer 2005). Tüm bu bulgular, karsinoma oluşumunda stromanın ikinci bir rolü olduğu gibi önceki yaygın görüşün yeniden değerlendirilmesini gerektirmektedir.

1.3.Baş Boyun Kanseri

1.3.1. Baş Boyun Kanseri ve Patogenezi

Skvamöz hücreli karsinoma, baş ve boyun bölgesinin en sık görülen malinitesidir. BBSHK; ağız boşluğu, farinks, gırtlak, paranasal sinüs ve burun boşluğunun epitelyal malinitelerini tanımlar ve halk sağlığı açısından önemli bir sorundur ve dünyadaki en yaygın altıncı kanserdir (Parkin ve ark. 2005). BBSHK, oldukça değişken tümör bölgeleri ve biyolojik davranışları olan ölümcül bir heterojen hastalıktır (Walter ve ark 2013). Kanser Genom Atlasında (TCGA), oral boşluktan (n=172/279, %62), orofarinks'ten (n=33/279, %12) ve gırtlak bölgeleri (n=72/279, %26) şeklinde profilleme yapılmıştır (Network 2015). Diğer kanser türlerinin önlenmesinde ve tedavisinde birçok ilerlemeye rağmen, BBSHK için tanı sonrası beş yıllık sağkalım oranı yaklaşık %50'dir; bu, çoğu kanser için oldukça düşüktür (Jemal ve ark 2008). Evre I hastalığı olan çoğu hasta tedavi edilebilse de, %10 civarındadır, nüks eder ve ölür. Daha ileri aşamalar için, relaps olan hastaların oranı evre II için %30, evre III için %50 ve evre IV için %70'den fazladır (Prince ME 2008). BBSHK hastalarının sınırlı sağkalımı, ileri hastalık evreleri ile başvuran, erken teşhis için uygun belirteçlerin bulunmamasından ve mevcut kemoterapiye cevap veremeyen hasta oranının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (Mao L 2004). Genetik değişikliklerin yanı sıra çevresel faktörler arasında bilinen en önemli risk faktörleri tütün/sigara tüketimi, alkol tüketimi ve kimyasal ve viral ajanlara maruz kalmaktır (Argiris ve Eng 2004). Bu nedenle, BBSHK'nin gelişmesine ve ilerlemesine yol açan

karmaşık moleküler olaylara ilişkin bilgi, BBSHK hastalarının erken teşhis, tedavi ve prognozu için önemli etkilere sahip olacaktır.

Genel olarak, BBSHK, daha önce Hanahan ve Weinberg tarafından ifade edildiği gibi kanserle ilgili fenotiplerin oluşumuna sebep olan genetik ve epigenetik değişikliklerin ve kanserle ilişkili sinyal yollarındaki anormalliklerin birikmesinden kaynaklanır. Bu, tümörlerin sınırsız çoğalma potansiyelini, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterliliği, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlığı, apoptozdan kaçınma kabiliyetini, artan anjiyogenez ve invazyon ve metastazı içerir (Hanahan ve Weinberg 2000).

Baş ve boyun kanserinin başlaması ve ilerlemesi; genetik ve epigenetik değişikliklerin aşamalı olarak kazanılmasını gerektiren kompleks, çok aşamalı bir süreçtir. Allelik dengesizliklerin mikrosatellit analizine dayanan erken bir baş ve boyun tümörigenez modeli, p53 geninin BBSHK'de neredeyse evrensel olarak bozulduğunu göstermiştir (Califano ve ark 1996). Aslında, BBSHK'li hastaların %40 ila %60'ı, p53 genindeki bir mutasyona sahiptir (Somers ve ark 1992). p53 fonksiyonunun kaybı, premaliniteden invaziv hastalığa ilerlemeyle ilişkilidir (Forastiere A (2001) ve daha fazla genetik progresyon olasılığını artırır (Boyle ve ark 1993). Hücre döngüsü ilerlemesini temelde aktive eden onkojen siklin D1'in amplifikasyonu, BBSHK'li hastaların %30 ila %50'sinde bulunur ve genellikle invaziv hastalık, erken nüks ve azalan ömür ile ilişkilidir (Callender ve ark 1994). Kromozomal bölgenin kaybı 9p21, en yaygın genetik değişikliklerden biridir ve BBSHK'nin ilerlemesinde erken meydana gelir (Van Der Riet ve ark 1994). Bu kaybın ana etkisi, hücre döngüsünü düzenlemede önemli olan bir siklin bağımlı kinazın (CDK) bir inhibitörü olan Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A) (eski adıyla p16) geninin etkisizleştirilmesidir (Reed ve ark 1996). Bu erken inaktivasyon, kültürdeki keratinositlerin sıklıkla p16 fonksiyonunu kaybettiği ve hücre yaşlanmasından (senesens) kaçtığı bulguları ile tutarlıdır (Munro ve ark 1999). Daha yakın zamanlarda, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR), BBSHK'nin %95'inden fazlasında yüksek oranda eksprese edildiği bulundu. Özellikle, protein ve ligandının ekspresyonunun artması kötü prognoz ile ilişkilidir (Kalyankrishna S (2006).

1953 yılında alan kanserleşmesi (*field cancerization*) terimi, BBSHK'nin tedaviden sonra lokal nüks geliştirme eğilimini ve baş ve boyun bölgesinde çok sayıda bağımsız tümörün gelişebileceği ihtimalini açıklamak için önerilmiştir (Slaughter ve ark 1953). Alan kanserleşmesi, genellikle baş ve boyun, akciğerler, yemek borusu veya BBSHK hastalarının %10-40'ının diğer bölgelerinde gelişen, malin öncesi veya malin hastalığın lateral yayılımını tanımlamak için kullanılmaktadır (Ha ve Califano 2003). Alan kanseri kavramına göre, çoklu hücre grupları bağımsız olarak bölgesel kanserojen aktivite stresi altında neoplastik dönüşüm geçirir. Moleküler genetik yaklaşımlar, BBSHK'li hastaların epitelinde bağımsız transformasyon olaylarının yaygın olduğu fikrini değiştirmiştir. Aslında, primer BBSHK, solunum sisteminde başka bir yerde bulunan ikinci bir tümör ile karşılaştırıldığında, eşleşmiş tümörler genellikle genetik değişikliklerin özdeş yapılarını barındırır (Bedi ve ark 1996). Muhtemelen, tek bir hücrede kritik bir genetik değişiklik, komşu hücelere göre bir büyüme avantajı sağlar. Transformasyondan sonra bir noktada, bu erken genetik değişiklikleri barındıran hücreler; diğer değişiklikleri biriktirmek, ek büyüme avantajları elde etmek ve en sonunda zaman ve boşlukla ayrılmış agresif subklonlara dönüşmek üzere göç eder (Califano ve ark 2000). Morfolojik olarak sağlam fakat genetik olarak hasar görmüş hücrelerin varlığı, sadece alan kanserleşmesi fenomenini açıklamakla kalmaz; aynı zamanda tam cerrahi rezeksiyon sonrası lokal tümör nüksü gibi bazı tümör davranış şekillerini de açıklar, çünkü malin öncesi veya malin klonlar göç etme yeteneğine sahiptir. Bu lezyonlar arasındaki ilişkiyi geliştirmeye yönelik gelecekteki çalışmalara, tedavi için hedef olarak kullanılacak anahtar moleküler değişiklikleri tanımlamak için ihtiyaç duyulmaktadır (Ha ve Califano 2003).

1.3.2. Baş Boyun Kanserleri ve İnvazyonu

İnvazyon; tümör hücresi adezyonu, ECM'nin proteolitik bozunması ve tümör hücrelerinin proteolitik olarak değiştirilmiş bir ECM'ye göçü gibi değişiklikler içeren üç aşamalı bir işlem olduğu genel olarak kabul edilir. Bu, ECM'nin temel fonksiyonunun, hücrelerin belirli dokularda organizasyonunu desteklemek için bir iskelet (scaffold) sağlamak olduğu düşüncesi ile tutarlıdır. Bazal membran gibi ECM yapıları, invazyon ve metastazlara karşı fiziksel bir engel sağlar. Bu kavram, hücreleri ECM'ye bağlayan mekanizmalara ilişkin araştırmalar neticesinde büyük ölçüde gelişti. ECM'nin hücrelerin bağlandığı iskeletten daha fazlası olduğu ve ECM'nin hücre

fonksiyonu ve davranışı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu açıktır (DeClerck 2000).

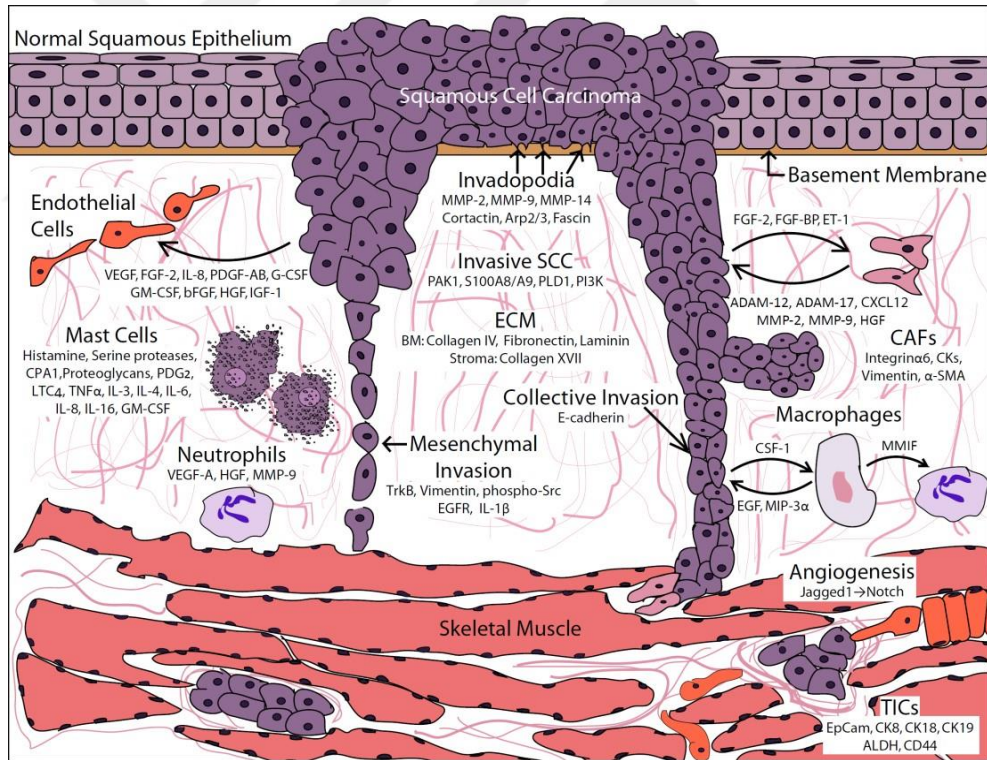
Ko-kültür çalışmaları; tip I kolajenin, birincil ve metastatik BBSHK hücrelerinde *IL-1a*, *IL-1*, *IL-6*, *TNF-a* ve *Tümör büyüme faktörü-y (TGF-y)* ekspresyonunu belirgin şekilde uyardığını gösterdi. Bununla birlikte, tip I kollajen, metastatik kanser hücrelerinde, primer kanser hücrelerinininki ile karşılaştırıldığında belirli sitokinleri belirgin şekilde uyarmıştır (Koontongkaew ve ark 2009). Metastatik BBSHK hücre hatlarında, tip I kollajene bağlandığında *MMP2* aktivitelinde bir artış gözlemlendi. Buna karşılık, bazal membran bu kanser hücre hatlarının *MMP2* aktivitelerini açıkça arttırmamıştır. Ayrıca, primer ve metastatik BBSHK hücreleri tip I kollajen üzerinde kültürlendiğinde *p-ERK* ve *p-p38*'de bir artış, ancak *ERK* ve *p38*'de bir artış gözlenmedi. Bu bulgular, *MAPK*'ların fosforilasyonunun ECM'nin indüklediği *MMP*'lerde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Koontongkaew ve ark 2012).

1.3.3. Baş Boyun Kanserleri ve Metastazi

Metastaz, kanserin primer bir bölgeden yayılmasının ardından uzak organlarda yeni tümörlerin oluşumunu sağlar. Lokal olarak ilerlemiş BBSHK'li hastaların en az %50'si, genellikle tedavinin ilk 2 yılında tespit edilen, lokal veya uzak metastazlar geliştirir (Argiris A 2008). Kanser erken bir aşamada tespit edildiğinde, yayılmadan önce, cerrahi veya lokal ışınlama ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir ve hasta sıklıkla tedavi edilir. Bununla birlikte, kanser metastaz olduğu anda tespit edilmişse, tedaviler daha az başarılı olmaktadır. Ayrıca, ilk tanılar sırasında metastaz kanıtı bulunmayan birçok hasta için, metastazlar daha sonra tespit edilebilir. Metastatik işlem bir dizi adımdan oluşur. Birincil tümör büyüdükçe, anjiyogenez adı verilen bir işlemle metabolik ihtiyaçlarını destekleyebilecek bir kan temini geliştirmesi gerekir (Folkman 1971, 2002). Bu yeni kan damarları ayrıca hücrelerin tümörü terk edip dolaşım sistemine girebileceği bir kaçış yolu da sağlayabilir (Wyckoff ve ark 2000). Tümör hücreleri ayrıca kan dolaşım sistemine dolaylı olarak lenfatik sistem yoluyla da girebilir (Stacker ve ark 2002). Hücreler, yeni bir organa yerleşene kadar dolaşımında hayatta kalmaya, dolaşımdan çevre dokuya ekstrasvazyona ihtiyaç duyarlar. Yeni bölgeye girdikten sonra hücreler, preanjiyogenik mikrometastazlar oluşturmak için büyümeyi başlatır ve sürdürür. Bu büyüme, makroskopik bir tümörün oluşması için yeni kan damarlarının gelişmesiyle sağlanır (Chambers ve ark 2002).

1.3.4. Baş Boyun Kanseri ve Mikroçevresi

BBSHK'nın tümör mikroçevresindeki hücrelerle ilişkisine dair birçok çalışma mevcuttur. Artan kanıtlar, kanser hücreleri ve çevresindeki stroma arasındaki etkileşimin, tümör büyümesinde kritik bir faktör olduğunu göstermektedir (Anton ve Glod 2009) (Şekil 1.5). Kanser biyolojisi anlayışı devam ettikçe, tümörleri; dinamik ve birbirine bağımlı bir şekilde etkileşime giren çeşitli hücre tipleri ve moleküllerden oluşan fonksiyonel bir organ olarak ele alma eğilimi artacaktır. Tümörün kompleks bir organ olarak tanınması, toksisiteyi en aza indirgeyen ve hastanın sağkalımını artırabilen kanser tedavisi için daha spesifik ve mükemmel yöntemlere kaynaklık edebilir (Hanna ve ark 2009). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, tümör stromasının sadece pasif bir destek yapısı olarak bulunmadığını, bunun yerine tümör ilerlemesinde aktif bir rol oynadığını göstermiştir (Blavier ve DeClerck 2005) (Derynck ve ark 2001, Shekhar ve ark 2001).



Şekil 1.5. BBSHK invazyonunu destekleyen tümör ve stromal hücrelerin diyagramı. Stroma ve kas dokusuna giren invazif bir BBSHK tümör hücresi kütleli tasvir edilmektedir. Spesifik hücre tipleri ve bunların salgıladığı protein katkıları, sonrasında hücresel tepkileri ve parakrin sinyal ağları gösterilmektedir (Markwell ve Weed 2015).

Endotel hücreleri, büyüyen tümör kitlesinin vaskülarizasyonunda önemli bir rol oynarken, ortaya çıkan kanıtlar, endotel hücreleri için tümör hücresi invazyonunun

kolaylaştırılmasında yeni bir rol olduğunu ortaya koymaktadır. Kemotaktik faktörler *VEGF*, *TNF-a* ve *TGF-β*, invaziv tümör cephesi boyunca endotel hücrelerinde podozom oluşumunu indüklemektedir (Spinardi ve ark 2004). Bu, endotel hücrelerinin, hipoksik tümör bölgelerine ulaşmasını sağlayarak, primer tümörü kaplayan bazal membranın parçalanmasını kolaylaştırır. Endotel hücreleri tümör hücreleriyle doğrudan temas ettikten sonra, BBSHK'dan türetilmiş Notch ligandına yanıt olarak endotel hücresi Notch aktivasyonu Jagged1, genişleyen tümör kitlesinin kılcal benzeri filiz oluşumunu ve neovaskülarizasyonunu sağlar (Zeng ve ark 2005). Endotel hücre aracılı mikroçevrenin yeniden düzenlenmesi, tümör hücresinin vasküler ağa erişimini artırma çabası, endotel hücrelerinin BBSHK tümör ilerlemesine önemli katkılarda bulunmasını sağlar.

Neoplazilerde, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar) lökositlerin ana bileşenini temsil eder. Bu hücrelerin varlığı tümörün büyümesi için faydalı olabilir ve bazen kanser hücrelerinin ölümüne neden olabilir. TAM'lar BBSHK'de daha yüksek seviyelerde bulunur ve tümör ilerlemesi sırasında anjiyogenezi modüle eder (Li ve ark 2002). TAM infiltrasyonunun yüksek olduğu primer BBSHK tümörü, lenf nodu metastazı, hücre dışı kapsüler yayılma ve ileri BBSHK evrelerinin güçlü bir belirleyicisidir (Marcus ve ark 2004). Ayrıca, makrofaj enflamatuar protein-3a'nın ekspresyonunun oral kanser hücre göçünü ve invazyonunu desteklediği gösterilmiştir (Chang ve ark 2011). TAM'lar, tümör hücreleri tarafından koloni uyarıcı faktör 1'in (CSF-1) lokal salgılanması nedeniyle tümör hücreleri ile ilişkili kan damarlarının yakınında birikirler (Wang ve ark 2005). TAM'lar, tümör hücrelerini kemotaksi ile damarlara çeken *EGF*'yi salgırlar. Çeşitli çalışmalar, TAM'ların anjiyogenez ve BBSHK'nin tümör ilerlemesinde etkili olduğunu göstermiştir. Oral skuamöz hücreli karsinomda TAM sayısı ile vasküler yapının bütünlüğü arasında yakın bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca, bu tümör tipinde TAM sayısı ile lenf nodu tutulumu arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlendi (Horst ve Horny 1991).

HIF-1α ekspresyonu ve TAM'lar kanser hücresi davranışını değiştirerek daha invazif ve agresif davranışlara neden olabilir. Tümör hücre kaynaklı damarların, *HIF-1α*'nın ve yüksek TAM oranlarının varlığının oral skuamöz hücreli karsinomlu hastaların prognozu için potansiyel belirleyici olabileceği öne sürülmüştür (Liu ve ark 2008). TAM'ların tümör agresifliği üzerindeki etkisi daha önce bir dizi oral kavite veya

orofaringeal skuamöz hücreli karsinomda incelenmiştir. Ayrıca, BBSHK'nin agresif davranışı ile primer tümördeki makrofajların infiltrasyon seviyesi arasında bir ilişki olduğu da gösterilmiştir (Marcus ve ark 2004).

Aktif fibroblastlar; yara iyileşmesi, fibroz, skar doku oluşumu ve inflamatuvar reaksiyonun düzenlenmesinden sorumludur. Aktivasyon sonrasında fibroblastlar, myofibroblastlara dönüşür. Tümörler, genelde iyileşmeyen yaralar olarak kabul edilmekte ve tümörlerin CAF'larla ilişkili olduğu gösterilmiştir. CAF'lar hem primer hem de metastatik BBSHK'de gözlenmektedir. BBSHK stroması, tümör boyunca dağılmış CAF'lar bakımından zengindir ve BBSHK tümörlerinin veya tümör adalarının çevresinde yoğun CAF seviyeleri mevcuttur (Bello ve ark 2011). CAF'ların, BBSHK tümör hücresinin invazyonu için ECM'nin proteaz ve mekanik yeniden şekillendirmesini kullandığını gösteren kanıtlar vardır (Gaggioli ve ark 2007).

Tümör-stroma etkileşimlerini hedeflemenin nihai amacı, BBSHK hastaları için uzun süre hayatta kalmayı amaçlayan iyileştirilmiş tedaviler geliştirmektir (Hanna ve diğerleri, 2009).

1.3.5. Baş Boyun Kanserlerinin Mikroçevresinde Sitokinlerin Etkisi

Sitokinler ve büyüme faktörleri; immün yanıt, hematopoez, nörogenez, embriyogenez ve onkogenez dahil olmak üzere çeşitli biyolojik cevaplarda önemli rol oynar (Hirano 1998). Bu protein ailesi, *IL'ler*, *interferonlar (IFN'ler)*, *TNF'ler* ve diğer büyüme faktörlerini içerir. Kemokinler, enflamatuvar reaksiyonlarda yer alan farklı hücre tipleri için kemoatraktan ve aktivasyon özelliklerine sahip küçük, sitokin benzeri proteinlerin süper ailesidir. Sitokin ve kemokinler, TMÇ'de tek tek hücreler içinde ve arasında otokrin veya parakrin iletişimini kontrol eden anahtar moleküllerdir (Wilson ve Balkwill 2002). Sitokinler, tümör hücreleri ve stromal hücreler arasındaki karşılıklı konuşmayı kontrol eder. Tümör hücreleri; ECM'nin yeniden şekillenmesini, bazal membran bozulmasını, tümör hücresi çoğalmasını ve anjiyogenezi indükleyen sitokinleri serbest bırakır. TMÇ'deki fibroblastlar ve endotel hücreleri, tümör kaynaklı sitokinlere yanıtta önemli bir rol oynamaktadır. Stromal hücreler sadece tümör hücrelerinden gelen sinyallere yanıt vermekle kalmaz, aynı zamanda stromal hücrelerin kendileri de tümör büyümesini indükleyebilir. Tip I kollajenin, primer kanser hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında metastatik BBSHK hücre hatlarında sitokin

ekspresyonunu belirgin bir şekilde uyardığı bulunmuştur. Ayrıca, BBSHK hücrelerinin oral fibroblastlarla ko-kültürleri, BBSHK hücre hatlarının invazyon özelliklerini artırabilen sitokin ekspresyonunda bir artışa neden olmuştur (Koontongkaew 2013).

Sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin değişmiş ekspresyonu, BBSHK de dahil olmak üzere birçok kanserin malin dönüşümünde büyük rol oynar. Bu gibi bir dizi faktör, BBSHK hücre hatlarında, ayrıca hastanın tümör numunelerinde ve serumunda bulunur. Bunlar, *IL-1a*, *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *TNF-a*, *TGF-P*, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (*GM-CSF*) ve *VEGF*'yi içerir. Serumdaki belirli sitokin ve büyüme faktörü seviyelerinin azaltılması, tedaviye cevap ile ilişkiliyken artan seviyeler kanserin ilerlemesi ve nüksü ile ilişkilidir (Lathers ve Young 2004).

Kemokinlerin; kanser ilerlemesinin, neovaskülarizasyonun, immün gözetim ve metastazın düzenlenmesinde veya uyarılmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Kemokin reseptörleri birçok farklı hücre tipinde bulunur. Aslında, bu reseptörler başlangıçta lökositler üzerinde tanımlanmıştır ayrıca bu tür hücrelerin iltihaplanma bölgelerine yönlendirilmesinde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. (Zlotnik 2004).

CXCR4 ekspresyonunun up-regulasyonu BBSHK hücrelerinde ve neoplastik dokularda gözlenmiştir (Lee ve ark 2009). Ayrıca, hipoksinin oral skuamöz hücreli karsinomda *HIF-1a*'yı aktive ederek *CXCR4* ekspresyonunu arttırdığı bildirildi (Ishikawa ve ark 2009).

CXCR4 ve *CXCL12* etkileşimi, BBSHK hücrelerinde EMT'yi indükler. *CXCL12* ve reseptörü arasındaki karşılıklı konuşmanın, BBSHK hücrelerinin lenf nodu metastazı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Onoue ve ark 2006). *CXCL12*'ye ek olarak, senkronize bir primer tümörden kaynaklanmayan, lenf nodu metastazından oluşan BBSHK'nin, *CXCL5* salgıladığı bildirilmiştir (Miyazaki ve ark 2006). *CXCL5* ayrıca hücre proliferasyonunu ve metastatik BBSHK hücrelerinin *in vitro* invazyonunu uyarmaktadır. Sadece *CXCR4-CXCL12* etkileşimleri değil aynı zamanda *CCL5 / CCR5* de dahil olmak üzere diğer kemokin karşılıklı konuşmalarının BBSHK hücrelerinin motilitesine de katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (Chuang ve ark 2009).

Endotel kaynaklı faktörler, BBSHK hücrelerinde anahtar sinyal moleküllerinin aktivasyonunu harekete geçirir ve bunların hareketliliğini artırır ve anoikisi inhibe eder (Campos ve ark 2012). BBSHK hücrelerinin endotel hücrelere doğrudan bağlanması, penetrasyon ve metastaz için ön şarttır. Ayrıca, BBSHK hücreleri ile endotel hücreleri arasındaki doğrudan etkileşim, endotel hücrelerinde kılcak tübül oluşumunu teşvik eden Notch-1 sinyalini tetikler (Zeng ve ark 2005). BBSHK hücreleri ve stromal hücreler; *VEGF*, *PDGF* ve *IL-8*'i indükleyen anjiyogenezi içeren sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgılar (Ninck ve ark 2003).

VEGF, endotelial sağkalımda önemli bir rol oynar. Endotelial hücre kaynaklı *VEGF*, *VEGFR1* aracılığıyla sinyal verir ve BBSHK hücrelerinde *Bcl-2* ve proanjiojenik kemokinler, *CXCL1* ve *CXCL8* ekspresyonunu indükler (Kaneko ve ark 2007) ve *CXCL8*, endotel hücrelerinin çoğalmasını ve yeni kan damarlarının oluşumunu kolaylaştırır (Karl ve ark 2007). Yeni kan damarlarının oluşumuna ek olarak, endotel hücreleri, skuamöz hücreli karsinom hücreleriyle bir *cross-talk* halindedir ve tümör hücresinin hayatta kalması ve göçünde önemli bir artışa neden olur. Spesifik olarak *IL-8*, *IL-6* ve *EGF* içeren endotel hücreleri tarafından salgılanan bazı çözünebilir faktörler, BBSHK'de sinyal transdüktörlerinin ve transkripsiyon-3 aktivatörlerinin, hücre dışı regüle edilmiş kinaz ve AKT'nin fosforilasyonunu uyarır (Neiva ve ark 2009).

Gen ekspresyon profili, BBSHK'nin ya yüksek seviyelerde *VEGF/FGF-2* ve düşük seviyelerde *IL-8/CXCL8* veya düşük seviyelerde *VEGF/FGF2* ve yüksek *IL-8/CXCL8* eksprese ederek anjiyogenezi sağladığını göstermiştir. Ayrıca, tümör hipoksisi de anjiyogenik büyüme faktörünün serbest bırakılmasında önemli bir rol oynar (Brennan ve ark 2005). Hipoksik şartlar altında, *HIF-1 α* tümör hücrelerinde anjiyogenezi yer alan genlerin transkripsiyonuna izin verir (Sun ve ark 2009). *HIF-1 α* 'nın aşırı ekspresyonu, BBSHK hücre hatları ve tümör dokularında gösterilmiştir (Beasley ve ark 2002). Bununla birlikte, *HIF-1 α* ekspresyonunun prognoz üzerinde etkisi yoktur, *VEGF* ekspresyonu BBSHK'lı hastaların ters prognozu ile anlamlı olarak koreledir (Kyzas ve ark 2005).

1.3.6. Baş Boyun Kanserlerinin Mikroçevresinde MMP'lerin Rolü

Doku matriksi, tek tek hücreleri destekleyen interstisyel bağ veya stromal matriks ve bazal membran olarak adlandırılan sürekli bir tabaka oluşturan çok özel bir yapı olarak sınıflandırılabilir. Bu membran, epitel ve endotel gibi hücre katmanlarını destekler. ECM ise fibronektin, lamininler, kollajenler, proteoglikanlar ve tenascin dahil olmak üzere birleştirilmiş özel fibröz protein ailelerinin hücreler arası materyallerini ifade eder (Bourboulia ve Stetler-Stevenson 2010). ECM'nin MMP'ler ile yeniden biçimlenmesi, kanser progresyonu ve TMÇ oluşumu için en önemli adımlardan biridir. Normal fizyolojik şartlar altında, MMP'ler ve bunların inhibitörleri arasındaki denge (doku metaloproteinaz inhibitörleri/TIMP'ler), ECM'yi iyi organize edilmiş bir şekilde tutar. Farklı MMP'ler büyük bir ECM kompleksini ve ECM olmayanları parçalayabilir. Bunlar; büyüme faktörleri ve reseptörleri, hücre adezyon molekülleri, sitokinler, kemokinler, apoptotik ligandlar ve anjiyogenik faktörler dahil olmak üzere spesifik substratların son derece seçici ve sınırlı bir şekilde ayrılmasını sağlayan enzimler olarak işlev görürler. MMP'lerin kanser gelişimindeki rolünü destekleyen veriler hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalardan elde edilmiştir.

Bununla birlikte, MMP işlevleri başlangıçta beklenenden çok daha karmaşıktır. MMP'lerin pro-tümörigenik enzimler olarak düşünülmesinden sonra, MMP'lerin kanserdeki rolleri yeniden değerlendirilmiştir. Aslında, bazı MMP'lerin tümör ilerlemesinde paradoksal bir koruyucu rolü varken, diğerleri kanserin ilerlemesi evresine bağlı olarak zıt işlevler sergilerler. Genomik ve proteomik teknolojilerdeki son gelişmeler; tümör gelişimi, anjiyogenez, invazyon ve iltihaplanma gibi tümör gelişimi ile ilgili farklı süreçlere MMP katkıları konusundaki bilgilerimizi arttırmıştır. ECM'nin yeniden şekillenmesi ve anjiyogenezi destekleyen ve tümör gelişimini artıran büyüme faktörü sinyalindeki etkilerine rağmen, bazı MMP'ler tümör gelişimini yavaşlatan koruyucu etkiler gösterir (Noël 2012).

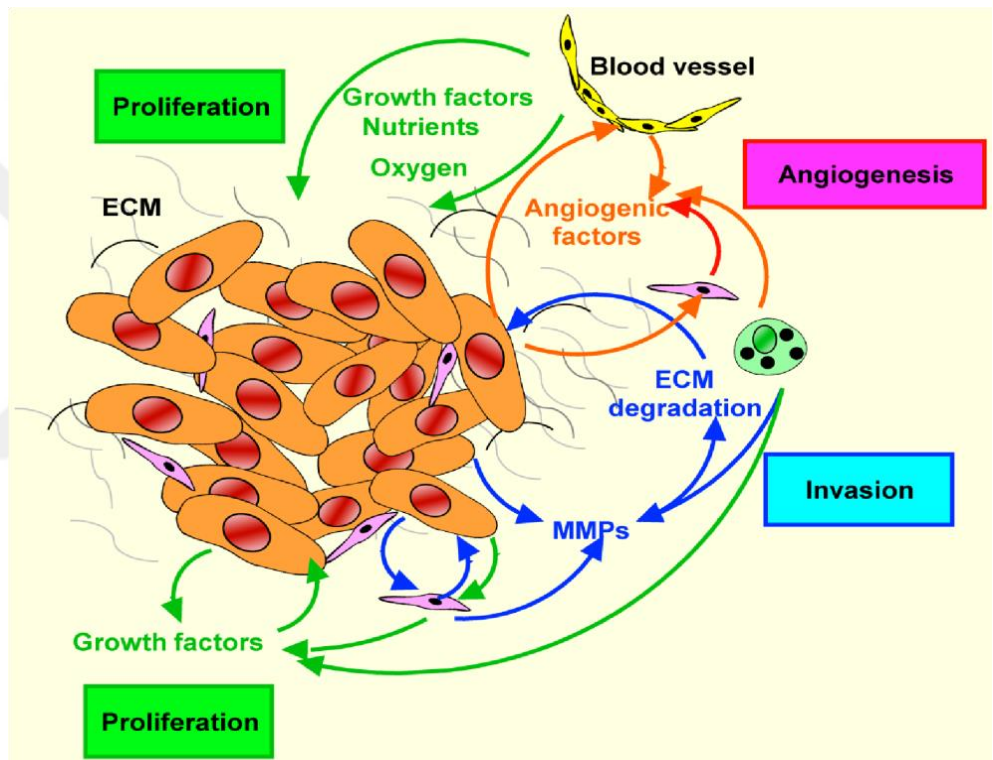
Bazal membranın bozulması, invazyon ve metastaz yolunda ilk adımdır. Tip IV kollajen, bazal membranın ana bileşenidir ve bu yapısal proteinin imhası, iki MMP, yani jelatinaz A (*MMP2*) ve jelatinaz B (*MMP9*) tarafından tercih edilmektedir. Bu MMP'lerin, tümör hücrelerinin malin potansiyeli ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Björklund ve Koivunen 2005).

MMP2 ve *MMP9*'un bazal membran yıkımını başlatma ve ECM'nin kolajen ve kolajen olmayan bileşenlerini daha da bozma kabiliyeti, jelatinlerin invazyon ve metastazda önemli olduğunu göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı, bazı çalışmalarda BBSHK'li hastalarda *MMP2* ve *MMP9*'un klinik önemi üzerinde durulmuştur. Bu jelatinlerin ekspresyonu ile tümör agresifliği arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (de Vicente ve ark 2005). *MMP2* ve *MMP9*'un gizli, aktif ve toplam formları ve aktivasyon oranları, komşu normal dokulara kıyasla malin dokularda anlamlı şekilde yükselmiştir. *MMP2*'nin aktivasyon oranları (aktif form/toplam form) lenf nodu metastazı olan hastaların malin dokularında anlamlı olarak daha yüksekti. Ayrıca, plazma *MMP9* düzeyleri, tedaviye yanıt verenlerde tedavi öncesi seviyelere kıyasla anlamlı derecede düşüktü (Patel ve ark 2007).

CXCL12-CXCR4 sinyali, proteazların ekspresyonunun up-regülasyonu BBSHK progresyonuna katkıda bulunur. MMP'lerin *CXCL12-CXCR4* etkileşimleri ile modüle edildiği bulundu. *CXCL12*, bir metastatik BBSHK hücre hattında *ERK-1/2*'nin hızlı fosforilasyonunu indüklemiştir. Bu kemokin, BBSHK hücrelerinin fibronektin ve kollajene yapışmasına aracılık edebilir ve bu etkileşim *MMP9* aktivasyonunu artırır (Samara ve ark 2004). *CXCL12* ayrıca primer ve metastatik BBSHK hücrelerinin invazyonunu da teşvik eder. Bu nedenle, *CXCR4-CXCL12* kemokinlerinin karşılıklı konuşmasının, BBSHK hücrelerinin *MMP9* aktivitelerinin yanı sıra hücre hareketliliğinde bir artışa neden olması mümkündür (Koontongkaew ve ark 2012). Bununla birlikte, bu etkiler, tüm BBSHK hücre hatları için tutarlı değildir; bu, diğer hücreye özgü faktörlerin, *CXCL12*'ye yanıtı değiştirebileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık, *CXCL12*, hipofarengeal skuamöz hücreli karsinom tümör hücrelerinde *MMP2* ve *MMP9* ekspresyonunu etkilemediği, ancak *MMP13* ekspresyonunu indüklediği bulundu (Tan ve ark 2008). Ayrıca, *CXCR4* ve *CXCL12* etkileşimleri, *IL-6* üretiminin up-regülasyonu ile BBSHK hücrelerinin invazyonunu artırabilir (Tang ve ark 2008). Lipopolisakkaritlerin, *CXCR4*'ün ekspresyonunu arttırdığı ve BBSHK'nin *CXCL12*'ye bağlı bir şekilde morfolojisi ve invazif kabiliyetini düzenlediği bildirilmiştir (Takabayashi ve ark 2009).

CAF'lar, hem hücre-hücre teması hem de pro-invaziv faktör sekresyonu yoluyla kanser hücresi invazyonunu etkiler. Ayrıca kanser metastazında önemli rol oynayan MMP üretimine en önemli katkılardan birini sunmaktadır (Şekil 1.6).

MMP'lerin stromal hücre ekspresyonunun BBSHK ilerlemesine katkıda bulunduğu mekanizmalar yoğun ilgi alanıdır. Ko-kültürler kullanılarak, hem tümör hücrelerinde hem de fibroblastlarda *MMP2* ve *MMP9* sekresyonunu aktive etmek için BBSHK hücreleri ve fibroblastlar arasında doğrudan temasın gerekli olduğu gösterilmiştir. Dahası, ko-kültürde artan *MMP2*'den fibroblastların sorumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca, fibroblastlar veya tümör hücrelerinin kondisyon medyumuna, BBSHK hücrelerinde *MMP2* ve *MMP9*'un up-regülasyonunu sağlamıştır. Bu nedenle, bu bulgular otokrin ve parakrin faktörlerinin MMP'lerin TMC'de tümör ve/veya stromal hücrelerin salgılanmasını artırdığını göstermektedir (Koontongkaew ve ark 2012).



Şekil 1.6. BBSHK'da tümör-stromal etkileşimler. Tümör-stromal 'cross-talk', tümör büyümesini sağlayan büyüme faktörlerinin, anjiyogenezi teşvik eden anjiyogenik faktörlerin ve hücre dışı matrislerin bozulmasını artıran proteolitik enzimlerin aşırı ekspresyonuna yol açar. Bu otokrin ve parakrin faktörleri, tümör hücresi invazyonunu ve nihayetinde metastazı kolaylaştırır (Koontongkaew 2013).

1.3.7. Baş Boyun Kanserlerinde Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)

EMT, epitelyal hücrelerin hücre polaritesini ve hücre hücre adezyonunu kaybettiği ve migratif ve invazif özellikler kazandığı bir adım olarak kabul edilir (Wang ve Shang 2013). EMT, mezenkimal fenotipe ait karakteristik bir protein paterninin ekspresyonu yoluyla artmış motilite ve invazyona katkıda bulunur. EMT;

epitel hücre bağlantılarının bozulması, aktin hücre iskeletinin yeniden yapılandırılması ve vimentin ve fibronektin gibi mezenkimal markörlerin düzenlenmesi yoluyla uyarılır. *TGF- β* , BBSHK'de EMT'yi tetikleyen birincil faktördür (Prime ve ark 2004). *TGF- β* yolağı ve inflamatuvar sitokinler *TNF- α* ve *IL-6* tarafından tetiklenenlerin yanı sıra, onu düzenleyen *STAT3* üzerinde birleşir. *STAT3* proteinleri genel olarak BBSHK'de aşırı eksprese edilir. *STAT3*, çeşitli kanserlerde EMT'ye katkıda bulunan transkripsiyon faktörleri olan *Twist*, *Snail* ve *Slug* (*Snail2*) ile etkileşime girer (Na ve ark 2013). *Twist*, mezenkimal motilite fenotipinin bir belirteci olan *N-cadherinin* ekspresyonunu artırır ve bir epitel fenotipi olan *E-cadherinin* ifadesini azaltır. *Slug* ayrıca *E-cadherin* ekspresyonunu azaltır. *E-cadherin* kaybı ve *N-cadherinin* kazancı ifadesi, invazyon için kritiktir ve kadherin değişimi (*cadherin switching*) olarak adlandırılır (Nguyen ve ark 2011).

1.4.Ko-Kültür

Tümör mikroçevre etkisini içeren çalışmalar için çeşitli ko-kültür (beraber kültür) modelleri kullanılmaktadır. Genel olarak, ko-kültür modelleri, iki veya daha fazla hücre popülasyonunun, birbirleriyle doğrudan veya dolaylı iletişim/temas sağlayacak şekilde eşzamanlı olarak kültüre edilmesi olarak tanımlanabilir (Roeder ve ark 2011). Birçok farklı çalışmada, ko-kültür sistemlerinin *in vivo* yanıtı nispetle daha gerçekçi reaksiyon verdiği ve daha öngörücü/tahmin edilir olduğu kanıtlanmıştır (Antunes ve ark 2013). Ayrıca ölümsüzleştirilmiş insan hücre hatları ile oluşturulan ko-kültür modelleri; az maliyetli olması, manipülasyon kolaylığı ve benzer genotiplere ve fenotiplere sahip sınırsız sayıda hücre tedariki gibi birçok avantaj sunmaktadır (De Simone ve ark 2017).

Kırk yıl önce, sıçan granuloza hücreleri ve miyokard hücreleri arasındaki etkileşimlerin gap junction yoluyla gerçekleştiğini gösteren ilk ko-kültür çalışması yayınlandı (Lawrence ve ark 1978). Ko-kültür sistemleri, hücre popülasyonları arasındaki etkileşimleri incelemek için uzun zamandır kullanılmaktadır ve her türlü hücre-hücre etkileşimi çalışmaları için temeldir. Son zamanlarda, bu tür sistemler tümör mikroçevreyi tanımlamak ve karmaşık çok hücreli sentetik sistemleri incelemek ve çalışmak için ilgi çekici hale gelmiştir. Bu tür hücre kültür modelleri geliştirmenin genel amacı biyomimetik bir kültür ortamı sağlamaktır. Genel kullanma amaçları olarak ise şunlar sıralanabilir; popülasyonlar arasındaki doğal etkileşimleri incelemek,

belirli populasyonlar için kültür başarısını arttırmak veya populasyonlar arasında sentetik etkileşimler kurmaktır (Goers ve ark 2014).

Sofistike *in vitro* modellerin kullanılmasının önemli bir nedeni de hayvan deneylerini azaltma çabasıdır. Hastaya mahsus gereksinimleri daha iyi ele almak için, ilgili insan hücrelerinden oluşan bir hücre model, mantıksal olarak daha net veriler üretebilir ve hayvanların ilaç geliştirmedeki kullanımını azaltmaya yardımcı olabilir (Roth ve Singer 2014). Ayrıca, Avrupa Birliği'nde tüketici ürünler ve kozmetik testler için daha önce olduğu gibi, hayvan deneylerinin gelecekte mevzuatla daha kısıtlı hale gelmesi beklenmektedir (Suter-Dick ve ark 2015).

Ko-kültür modelleri ilk zamanlar iki boyutlu (2B) olarak gerçekleştirildi. Bu şekilde, 2B tek hücre kültürleri için oluşturulan birçok yöntem ko-kültürlere kolayca adapte edilebilmiştir (Lindström ve Andersson-Svahn 2012). Bu 2B ko-kültür modelleri iki çeşittir: direkt hücre-hücre etkileşimi ve indirekt ko-kültür (Lindström ve Andersson-Svahn 2012). İndirekt ko-kültür modeli, hücre tiplerini kültür rezervuarında birbirinden ayıran, ancak aralarında salgılanan faktörlerin değişimini sağlayan bir tür geçirgen bariyer gerektirir. Bu geçirgen bariyer, çıkarılabilir bir geçirgen ayırıcı (Bogdanowicz ve Lu 2013) veya bir transwell sistemi (Boanini ve ark 2012) olabilir. Bir hücre tipinin başka bir hücre tipi üzerindeki etkisi fizyolojik geri bildirim olmadan incelendiğinde, kondisyon medyumunun (CM) bir hücre tipinden diğerine aktarılması uygun bir seçenektir (Ehnert ve ark 2016). Mevcut çalışmamızda direkt ko-kültür sistemini kullanmakla beraber indirekt ko-kültür modelinden hem transwell chamber ile olan modeli hem de CM ile oluşturulan model kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları genellikle, hücreleri yapay olarak düz ve sert yüzeylere ayarlamaya iten cam veya plastik gibi sentetik substratlar üzerinde gerçekleştirilir. Bu iki boyutlu *in vitro* hücre kültür sistemleri, uygun ve hızlı bir biyokimyasal analiz aracı sağlasa da, *in vivo* doku mikroçevrelerindeki uygun sinyal ve yapılardan yoksundur. Buna karşılık, üç boyutlu (3B) hücre kültürü modelleri, *in vivo* ortamlara benzeyen bir ortamda biyolojik işlemlere yönelik çalışmalara izin verir ve böylece daha fizyolojik bir ortam sağlar. Üç boyutlu model sistemler, dokuların normal işlevini düzenleyen sinyalleri ve kanser gibi hastalık durumlarında nasıl bozulabileceğini anlamak için kullanılmaktadır (Nelson ve Bissell 2005).

Geleneksel 2B ko-kültür sistemleri, hücreler arasındaki duyarlılığı göstermek için kullanıldığında, bu modellerin canlı organizmadaki şartları minimum taklit ettiği unutulmamalıdır (Hess ve ark 2010). 1968'den beri, 3B hücre kültürleri kavramı ilk

sunulduğunda (Boiron ve ark 1968), birçok araştırmacı 3B kültürlerden faydalandı. Tüm 3B modellerin temel amacı mümkün olduğu kadar *in vivo* olarak bulunan doğal ortamı temsil etmektir. Bu, 3B sistemlerin hücrelerin yalnızca 3B matris üzerinde hayatta kalmasını sağlamayacağını, aynı zamanda çoğalmalarına ve içine sızmalarına da izin verdiğini gösterir. Bu nedenle, kullanılan 3B matris, doğal ortamın malzemesini ve yapısını mümkün olduğu kadar yakından temsil etmelidir. Mekanik özellikler, geometri ve yüzey kimyasının optimal bir kombinasyonu, hücrenin iyice yapışmasına, yeterli oksijen kaynağına ve yeterli miktarda besin ve atık ürün dağılımına izin vermelidir (Zhu ve ark 2018).

1980'lerde ECM proteinleri alanındaki araştırmalar, fare tümör dokusundan köken alan ve yeniden oluşturulmuş bazal membran proteinlerinin bir karışımını ihtiva eden "matrijel" in icadına vesile olmuştur (Kleinman ve ark 1982). Ticari olarak temin edilebilen bu maddeler; gözenekli, yumuşak ve büyük ölçüde saydam hidrojellerde çeşitli hücre tiplerinin kültürde kullanımını mümkün kılmıştır. Bu 3B matrijen veya skafold yapılarında; hücreler proliferere olabilir, hareket edebilir, farklılaşabilir ve vasküler yapılar gibi daha büyük hücresel ağları oluşturabilir. ECM'den türetilen, metastaz ve anjiyogenezin incelenmesi ve kök hücre araştırmalarında, toksikoloji ve doku mühendisliği dahil olmak üzere, eksplante edilmiş organların gelişimini araştırmak için çok önemli bir adım olmuştur (Novakovic ve ark 2014).

1.5. *In Vitro* Migrasyon ve İnvazyon

Migrasyon, biyolojide, vücuttaki herhangi bir yönlendirilmiş hücre hareketini tanımlamak için genel bir terim olarak kullanılır. Migrasyon yeteneği, hücrelerin dokular içindeki veya farklı organlar arasındaki konumlarını değiştirmelerine izin verir. Patolojide, karsinomların invazyonu; malin tümör hücrelerinin bazal membrandan geçip interstisyel dokulara infiltrasyonu ve dokuya penetrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Örneğin, bağırsak kanserleri, bazal membranı geçtiğinde ve submukozal kas katmanına girdiği için invazif olarak sınıflandırılır. Epitelyal olmayan kanserlerdeki invazyonun tanımlanması daha zordur, çünkü örneğin mezenkimal hücrelerin bazal bir membran ile kesin bir şekilde ayrılması söz konusu değildir. Migrasyonun invazyondan açık bir şekilde ayırt edilmesi, yönlendirilen hücre hareketinin *in vivo* açıklaması ile ilgili birçok bilgi biyoloji alanında yapılmamıştır.

Migrasyon ve invazyon, deneysel hücre biyolojisinde açıkça ayrı terimlerdir. Migrasyon; bazal membranlar, ECM fiberleri veya plastik plakalar gibi bir substrat üzerindeki hücrelerin yönlendirilmiş hareketi olarak tanımlanır. Bu nedenle, 2B yüzeylerde herhangi bir engelleyici ağ olmadan migrasyon meydana gelir. İnvazyon, 3B ortamda bir 3B matris boyunca hücre hareketi olarak tanımlanır. Bir hücrenin matris boyunca ilerleyebilmesi için şeklini değiştirmesi ve bir yandan hücreye yapısal destek sağlayan bir yandan da hücre hareketine karşı engel oluşturan ECM ile etkileşime girmesi gerekir. İnvazyon; adezyon, hücre dışı matriks bileşenlerinin proteolizi ve migrasyon gerektirir, bu nedenle invazif hücreler ECM'yi yeniden şekillendirir (Friedl ve Wolf 2010). Migrasyon kabiliyetinin invazyon için bir ön şart olduğu gerçektir; bir hücre migrasyon yapmadan invazyon yapamaz; ama invazyon olmadan hareket edebilir. Analojide migrasyon, bir kaldırımda yürümeye benzetilebilir, invazyon ise bir dikenli çit boyunca hareket etmeye karşılık gelir (yürüme kabiliyeti de dahil olmak üzere mücadele için gerekli tüm araçları gerektirir) (Kramer ve ark 2013).

1.6.Ekspresyon Analizi için Seçilen Genler

'Kanser hücrelerinin (HEp-2) mikroçevresi, sağlıklı hücreleri (HUVEC) kanser genotipine doğru evriltiyor; ayrıca sağlıklı hücrelerin (HUVEC) mikroçevresi, kanser hücrelerinin (HEp-2) agresifliğini azaltıyor' hipotezini sorgulamak için proliferasyon, migrasyon, invazyon, metastaz ve EMT ile ilgili genler seçilmiştir. Bu genlerin literatürdeki fonksiyonları aşağıda açıklanmıştır:

1.6.1. N-cadherin (Cadherin-2-CDH2):

Kaderinler, Ca^{2+} bağımlı hücre-hücre yapışmasına aracılık eden bir transmembran protein ailesidir. Kaderin ailesinin üyeleri arasında, *E-cadherin* geniş bir şekilde dağılmıştır ve epitelyal hücrelerde en önemli hücreler arası adezyon molekülüdür. *E-cadherin* kanser hücreleri için invazif bir baskılayıcı olarak tanımlanmış olsa da, anormal şekilde eksprese edilmiş *N-cadherin*in epitel hücrelerinde rolü daha net bir şekilde tanımlanmıştır. *E-cadherin*den farklı olarak normalde nöroektodermal ve mezodermal türevli dokularda eksprese edilir ve hücre-hücre yapışması, farklılaşma, embriyogenez, göç, invazyon ve sinyal iletimi gibi birçok işlemde bulunur. *N-cadherin*in anormal artışı, belirli kanserlerde artan tümör

ilerlemesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Derycke ve Bracke 2004). *N-cadherin* ayrıca insan endotel hücrelerinde de eksprese edilir, ancak anjiyogenezdeki işlevi tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır (Diamond ve ark 2008). Özellikle, *N-cadherin*'in artmış ekspresyonu ve birlikte *E-cadherin*'in down-regülasyonunun kanserde EMT'nin bir özelliği olduğu öne sürülmektedir (Yılmaz ve Christofori 2009).

1.6.2. CXCL8 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 8)

Aslen bir nötrofil kemotaktik faktörü olarak tanımlanan *CXCL8* veya *İnterlökin-8 (IL-8)* (Xie 2001)'in ekspresyonu, tümör gelişimiyle ilgili olarak hipoksi gibi faktörlerin neden olduğu çevresel stres ile kuvvetli bir şekilde uyarılır (Shi ve ark 1999).

CXCL8'in, tümör hücresi proliferasyonunu arttırmak için otokrin ve parakrin şeklinde çalışabileceği gözlenmiştir (Schadendorf ve ark 1993). Ayrıca, *CXCL8*'i, G-protein aktivasyonu, MMP, epidermal büyüme faktörü (*EGF*) yoluyla proliferasyonu uyarabildiğini göstermiştir (Itoh ve ark 2005).

Tümör büyümesini, doku invazyonunu ve metastatik yayılmayı teşvik etmek için üretildikleri ileri sürülmüştür. *IL-8*, çeşitli tümörlerde inflamasyon, tümör ilerlemesi ve anjiyogenezde önemli bir role sahiptir (Sarvaiya ve ark 2013).

1.6.3. CCL21 (Chemokine (C-C motif) ligand 21)

CCL ailesinin önemli bir kemokini olan *CCL21*, *C-C motif chemokine receptor 7 (CCR7)* için iki liganddan biridir (diğeri *CCL19*'dur) (Förster ve ark 2008). *CCR7*, saf B ve T hücreleri, dendritik hücreler ve T düzenleyici hücreler dahil çeşitli lenfosit tipleri ile eksprese edilir (Förster ve ark 2008). Ayrıca, *CCR7* ekspresyonunun, baş ve boyun kanseri ile beraber çeşitli kanserlerde kanser hücresinin metastazını desteklediği bildirilmiştir. Bu nedenle, *CCR7* ve ligand(ları) çeşitli organ kökenli kanser hücrelerinin proliferasyonuna, ilerlemesine ve metastazına katılabilir (Wang ve ark 2005)

1.6.4. MMP2 ve MMP9 (Matris Metalloproteinaz)

BBSHK için MMP ekspresyonunun prognostik değere sahip olduğu gösterilmiştir. Pek çok kanserin progresyonuna katkısı olduğu düşünülen çeşitli

MMP'lere rağmen, çeşitli malin kanserlerde aşırı eksprese edildiklerinden ayrıca sıklıkla tümör derecesi ve kötü hasta prognozu ile ilişkili olmasından ötürü *MMP2* ve *MMP9*'a odaklanılmaktadır (Uloza ve ark 2011). Daha ayrıntılı bilgi yukarıda 1.6.1.1'de verilmiştir.

1.6.5. ITGB1 (Integrinler ve Integrin Beta-1)

İntegrinler, en çok çalışılan matriselüler reseptör ailesinden birine aittir. Bu heterodimerik aβ hücre yüzeyi reseptörleri, hücre dışı matrisi yüksek hassasiyette algılar (Hohenester 2014), böylece hem fizyolojik hem de patofizyolojik durumlarda spesifik cevapları tetikler. İntegrinlerin, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışma; kanserin kök hücre, metastaz ve ilaç direncini düzenleme yeteneklerini vurgulamıştır (Seguin ve ark 2015). İntegrinler fizyolojik ve patolojik durumlarda hücre döngüsü ilerlemesine katkıda bulunur (Moreno-Layseca ve Streuli 2014). ECM'ye hücre adezyonu, migrasyon/invazyon/metastaz süreçlerinin merkezinde yer alır (Naci ve ark 2015). İntegrinlerin MMP'leri (matris metalloproteinazlar) düzenlediği ve ECM'nin bozulmasını ve yeniden şekillenmesini kolaylaştırdığı uzun zamandır bilinmektedir (Schlomann ve ark 2015).

ITGB1, kolajen, laminin ve fibronektin gibi geniş bir arginin-glisin-aspartik asit içeren hücre dışı matriks dizisine bağlanan 12 potansiyel integrin reseptörü oluşturmak için a alt birimleri ile ortaklaşır (Elias ve ark 2014). Hücrel reseptörlerle çapraz konuşmayla birlikte, hücre adezyonu, hayatta kalma, farklılaşma ve çoğalmada kritik rol oynadığı gösterilmiştir (Miranti ve Brugge 2002) Birkaç çalışma, *ITGB1*'in tümörlerin başlatılması, ilerlemesi ve metastazında önemli rollerini vurgulamıştır (Kaplan-Türköz ve ark 2012).

1.6.6. VIM (Vimentin)

Pankreas öncü hücreleri, Sertoli hücreleri, nöronal öncü hücreler, trofoblast dev hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri, kan damarlarını kaplayan endotel hücreleri, renal tübüler hücreler, makrofajlar, nötrofiller, mezangiyal hücreler, lökositler ve renal stromal hücrelerinde vimentin ekspresyonu rapor edilmiştir (Carter ve ark 2005). *Vimentin*, epitelial hücrelerin şeklinin dramatik bir şekilde değiştirmelerine ve artmış motilite göstermelerine neden olan bir mezenkimal fenotip

kazanmasına sebep olan hücrenel bir yeniden programlama işlemi olan EMT standart bir markörü olarak kabul edilir (Thiery ve Sleeman 2006). Buna göre, mezenkimal-epitelyal geçiş olarak bilinen EMT'nin ters prosesi sırasında (MET), hücreler bir epitelyal fenotip sergilemeye başlar ve düşük motilite oranları ile azalmış vimentin ekspresyonu göstermeye başlar (Chaffer ve ark 2006).

1.7.Projenin Amacı

Mevcut projenin temel amacı, larinks kanser hücre hattı HEp-2 ile tümör mikroçevre elemanlarından endotel hücre hattı HUVEC hücreleri arasındaki ilişkiyi araştırarak tümörün progresyonunun aydınlatılmasına katkıda bulunmaktır. Hem tümör hem de sağlıklı hücrelerdeki hücrenel ve moleküler değişiklikleri resiprokal olarak araştırarak mikroçevrenin etkisini analiz eden bu çalışma, literatür bilgisine göre şimdiye kadar hiç çalışılmamıştır. Bu çalışmada, endotel hücrelerinin tümör hücrelerine; tümör hücrelerinin de endotel hücrelerine etkileri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

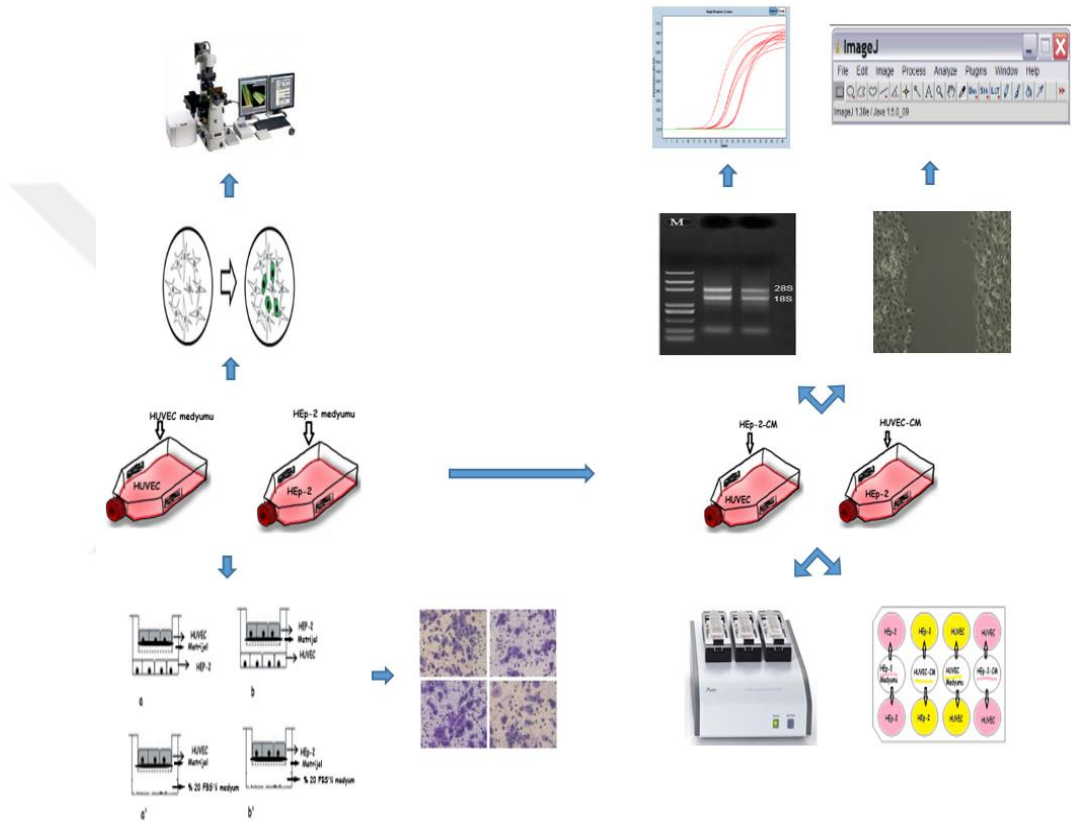
Çalışmanın amaçları:

- HEp-2 hücrelerinin, HUVEC hücrelerine etkisini hücrenel düzeyde (proliferasyon, migrasyon, invazyon testleriyle) göstermektir.
- HUVEC hücrelerinin, HEp-2 hücrelerine etkisini hücrenel düzeyde (proliferasyon, migrasyon ve invazyon testleriyle) göstermektir.
- GFP-HEp-2 ve HUVEC hücrelerinin ko-kültür ortamında oluşan morfoloji farklılıklarını, mono-kültürlerine kıyasla konfokal mikroskopta göstermektir.
- HEp-2 hücre ortamının, HUVEC hücrelerine etkisini mRNA seviyesinde belirli gen ekspresyonlarıyla (*CDH2*, *CLC21*, *CXCL8*, *ITGB*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM*) göstermektir.
- HUVEC hücre ortamının, HEp-2 hücrelerine etkisini mRNA seviyesinde belirli gen ekspresyonlarıyla (*CDH2*, *CLC21*, *CXCL8*, *ITGB*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM*) göstermektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (İLTEK) gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın etik kurul onayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınmıştır (Ek-A).

Mevcut çalışmaya dair tüm metodlar, şekil 2.1’de özetlenmiştir.



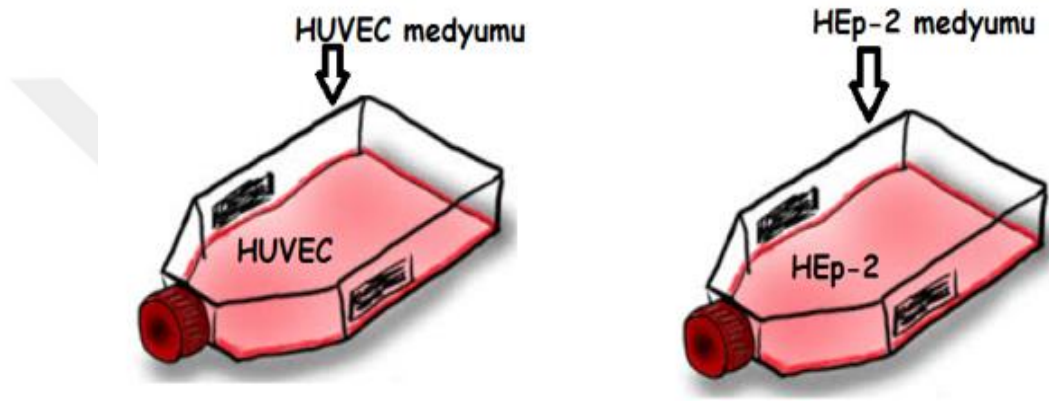
Şekil 2.1. Çalışmanın metotsal akış şeması.

2.1.Hücre Kültürü ve Stoklama

Çalışmamızda kullandığımız baş boyun kanseri larinks hücre hattı olan HEP-2 (human larynx squamous cell carcinoma) (Human epithelial type 2) hücre hattı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD'den temin edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız GFP-HEP-2 hücre hattı ise Prof. Dr. Hasan Acar ve ark.'nın TÜBİTAK 1001 112S498 no'lu projedeki çalışmalarında yeşil floresan protein (GFP) konstraktyla transfeksiyon yapılarak Tıbbi Genetik laboratuvarında elde edilmiştir. Tümör mikroçevrenin önemli elemanlarından olan endotel hücre hattı olarak HUVEC

(Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücre hattı ise Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'den Dr. Öğr. Üyesi Timuçin AVŞAR'dan temin edilmiştir.

Dondurulmuş hücreler önce 37 °C'de çözüldükten sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Bu hücreler, %10 Heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, ABD) ve %1 penisilin/streptomisin (100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) (Gibco, ABD) içeren DMEM (Gibco, ABD) kültür vasatı bulunduran farklı flasklara alınarak kültüre edildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. HEp-2 ve HUVEC hücre hatlarının mono-kültürleri.

Hücreler flaskta %80'lik alanı doldurduktan sonra steril olarak %0,25 tripsin (Gibco, ABD) solüsyonu muamelesi ile kaldırıldı; hücreler önce yaklaşık 5 ml steril fosfat buffer saline (PBS) (Gibco, ABD) ile yıkandı. T25 flaskına (Sarstedt, ABD) 2 ml ve T75 flaskına 5 ml steril %0,25 trypsin solüsyonu eklendi ve 5 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Sürenin sonunda hücreler 10× ışık invert mikroskopunda (Leica, Almanya) kalkıp kalkmadıkları gözlemlendi. Hücrelerin kalktığından emin olunduktan sonra tripsin inaktivasyonu için yarı hacimde tam bir kültür medyum (%10 FBS, %1 PS'li DMEM medyum) eklendi ve hücre solüsyonu 15 ml'lik falkonlara (Biosorfa, Çin) aktarıldı, ardından 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek üst kısım atıldı. Hücre peleti 5 ml tam bir kültür medyum içinde çözdürüldü ve hemositometri lamında (Hausser Bright-Line, ABD) hücre sayımı yapıldı.

2.2.Hücre Sayımı

Hücre süspansiyonu (100 µl), 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 100 µl %0,04 tripan mavisi boya solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı. Boyanmış hücre

süspansiyonu 5 dakika oda ısısında bekletildi, daha sonra hemositometri lamına 20 µl hücre süspansiyonundan yüklendi ve ışık invert mikroskop altında (10× büyütme) 3 farklı bölge sayıldı. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül uygulanarak hesaplandı:

$$(\text{Hücre sayısı/ ml} = \text{Sayılan bölgelerin ortalaması} \times \text{Dilüsyon faktörü} \times 10^4)$$

Dilüsyon faktörü aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\text{Dilüsyon Faktörü} = \frac{\text{Son medyum hacmi}}{\text{Başlangıçtaki medyum hacmi}}$$

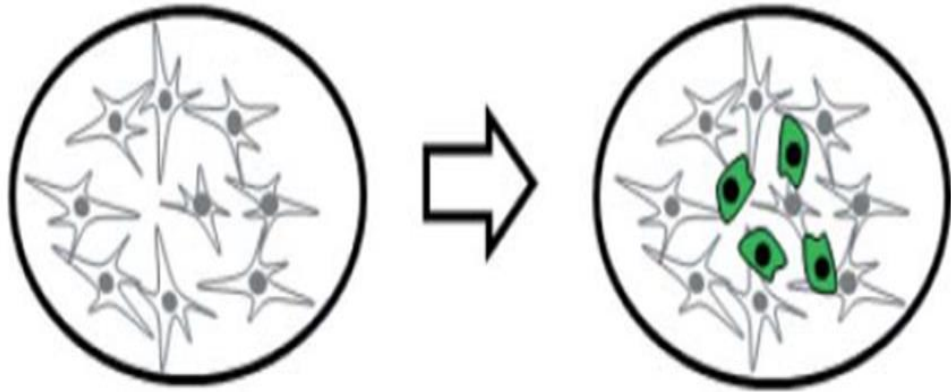
Gelecekteki çalışmalar için hücreler ayrı ayrı çoğaltıldı ve %10 DMSO (Applichem, Almanya) ve %90 FBS içeren 1 ml dondurma medyumunda içinde en az 2×10^6 /ml hücre, kriyotüplerde (İsolab, Türkiye) -80 °C’de muhafaza edildi.

2.3.Ko-kültür Sistemleri

Deneylelerin amaçlarına ve şartlarına uygun olarak üç çeşit ko-kültür sistemi kuruldu.

2.3.1. Direkt ko-kültür

İki hücre tipinin (endotel hücreleri ve kanser hücreleri) fiziksel olarak bağlantılı olduğu sistemlerdir (Şekil 2.3). Bu ko-kültürün amacı, endotel hücreleri ve kanser hücreleri aynı ortamda iken birbirlerini nasıl etkilediklerini morfolojik olarak gözlemlemektir.

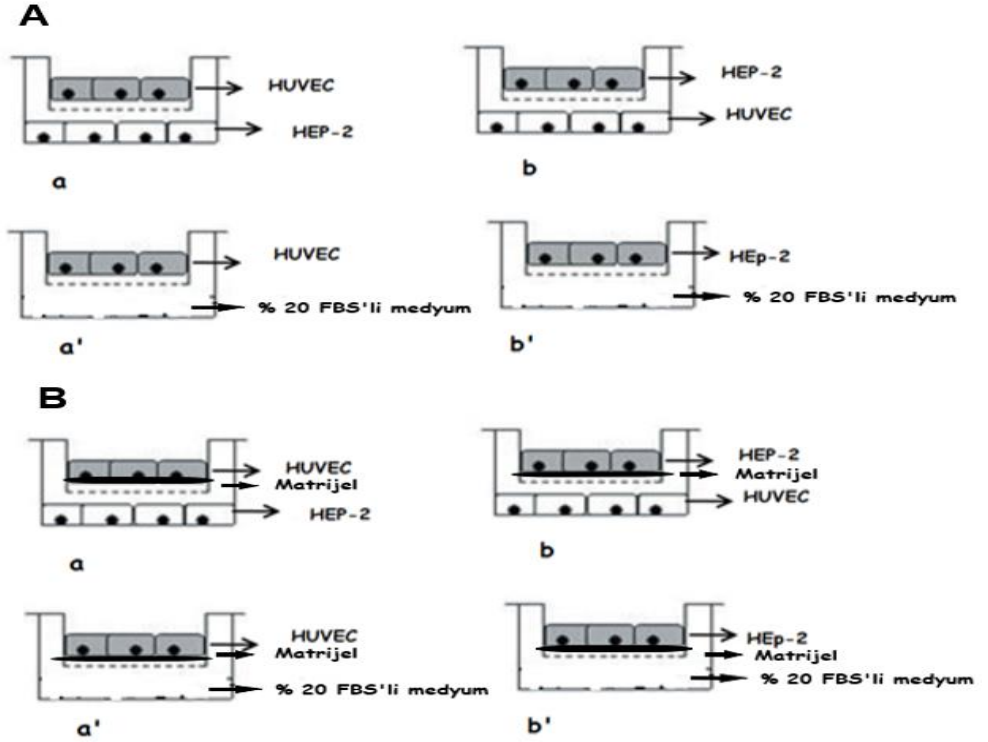


Şekil 2.3. HEP-2 ve HUVEC’in direkt ko-kültürleri; HUVEC hücresi üzerine GFP-HEP-2 hücresi ekilmiştir.

2.3.2. İndirekt ko-kültürler

Membranla indirekt ko-kültür

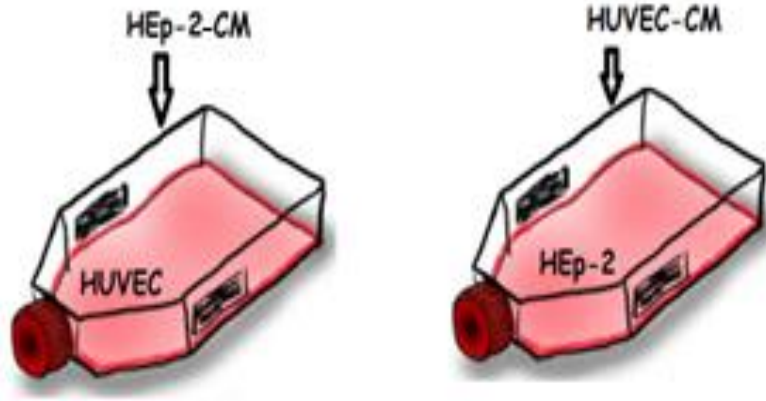
Endotel ve kanser hücrelerinin bir membran kullanılarak ayrı ayrı ekildiği kültürlerdir, ancak parakrin faktörler yoluyla dolaylı olarak etkileşime girerler (Şekil 2.4). Bu ko-kültürün amacı, hem invazyon deneyini hem de proliferasyon deneyini gerçekleştirmektir.



Şekil 2.4. Membranla indirekt ko-kültürler; HEp-2 ve HUVEC hücrelerinin transwell chamber invazyon deneyi için deney düzenineğin temsili görüntülenmesi. (A) Migrasyon deneyi için matrijelsiz deney düzeni. (B) İnvazyon deneyi için matrijelli deney düzeni. Kuyulardaki indirekt ko-kültürleri (a ve b); kontrol hücre kültürleri (a' ve b').

Kondisyon Medyumu (CM) ile İndirekt ko-kültür

İndirekt ko-kültür sisteminin bir diğer çeşidi ise CM ile hazırlanan ko-kültürdür (Şekil 2.5). Bu ko-kültürün amacı, migrasyon deneyini yapmaktır.



Şekil 2.5. CM ile hazırlanan indirekt ko-kültürler.

CM Hazırlanışı:

Üç zaman diliminde (24-48-72 saat) iki hücre hattından da CM şu şekilde hazırlanmıştır; HEp-2 ve HUVEC hücreleri ayrı ayrı, 12'şer ml DMEM besiyeri içeren T75 kültür flasklarda 24/48/72 saat ayrı ayrı kültüre edilmiştir. Kültür sonunda her bir flasktan süpernatantlar toplanıp 1200 RPM 5 dk santrifüj edilip üstü temiz bir falkon tüpe alınmıştır. HEp-2'den elde edilen CM'ler 24s-HEp-2-CM; 48s-HEp-2-CM ve 72s-HEp-2-CM olarak adlandırılmıştır. Aynı şekilde 24 saatlik kültür sonunda HUVEC'ten elde edilen 24s-HUVEC-CM; 48 saatlik kültür sonunda HUVEC'ten elde edilen 48s-HUVEC-CM; 72 saatlik kültür sonunda HUVEC'ten elde edilen 72s-HUVEC-CM olarak adlandırılmıştır. Bu CM'ler hemen kullanılacaksa +4 °C'de, daha sonra kullanılacaksa -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.Morfoloji Analizi

Ko-kültürün hücreler üzerindeki etkisini morfolojik olarak incelemek için direkt ko-kültür kuruldu. GFP transfekte edilmiş HEp-2 hücreleri (GFP-HEp-2) GFP sinyali taşıdığından konfokal mikroskopta (Nikon; A1R1) direkt incelendi. Ayrıca hücreler, hem sadece çekirdek boyası DAPI (İnvitrogen, Amerika) ile boyandı hem de F-aktine bağlanan Alexa Fluor 680 Phalloidin (İnvitrogen, Amerika) ve DAPI ile birlikte boyanıp konfokal mikroskopta incelendi.

2.4.1. Puromisin Seleksiyonu

Direkt ko-kültürden önce konfokal mikroskopta daha önce GFP transfeksiyonu yapılmış GFP-HEp-2 hücrelerinin GFP sinyal yüzdesi değerlendirildi. Buna göre hücrelerin yaklaşık %70'inde yeşil sinyal gözlemlendi. Bu oran, transfeksiyonun yetersizliğini göstermektedir. HEp-2 hücrelerine GFP geni taşıyan plazmidler viral transfeksiyon metoduyla transfekte edilmiş ve bunda da %90 başarı olarak kabul edilmiş olduğundan %10 sinyali almayan hücre grubu pasajlar boyunca sayılarını artırmış olabilir. Bu sebeple GFP-HEp-2 hücre hattına puromisin seleksiyonu yapılmıştır.

Puromisin (Sigma, Almanya), hem ökaryotik hem de prokaryotik hücreler üzerinde etkili olan bir seleksiyon antibiyotığıdır. *Streptomyces alboniger* tarafından üretilen bir aminonükleosit antibiyotiktir. Prokaryotik ve ökaryotik ribozomlar üzerinde spesifik olarak peptidil transferini inhibe eder. Puromisin, pac geni içermeyen ökaryotik hücreleri hızla öldürür. Memeli hücre hatları için puromisin çalışma konsantrasyonları 1 ila 10 µg/ml arasındadır. Başlangıç denemesinde, optimum antibiyotik konsantrasyonları yukarıda adı geçen TÜBİTAK projesinde belirlenmiştir. Bu çalışmada ise 2 µg/ml konsantrasyonu kullanılmıştır. Bu uygulama ile transfekte olmayan hücrelerin eliminasyonu hedeflendi. Puromisin uygulamasının ardından hücre ölümü azalan hücreler konfokal mikroskop ile kontrol edildi ve GFP oranı %90'ı geçen hücre hatlarında puromisin uygulaması sonlandırıldı. Puromisin seleksiyonu sonrası GFP-HEp-2 ve HUVEC hücreleri ile morfoloji analizine devam edildi.

2.4.2. Morfoloji Analizi için Direkt Ko-Kültür

Morfoloji analizi için HUVEC hücreleriyle beraber GFP-HEp-2 hücrelerinin direkt ko-kültürü yapılmıştır. Bunun için 6 well plakadaki dört kuyuya HUVEC hücreleri (2×10^5 /1,5 ml) ekilirken, diğer iki kuyuya GFP-HEp-2 hücreleri (2×10^5 /1,5 ml) ekildi. Ertesi gün HUVEC ekilen kuyulardan ikisinin üzerine 4:1 oranında (5×10^4 /1,5 ml) GFP-HEp-2 ekildi. Her örnek (HUVEC mono-kültür, GFP-HEp-2 mono-kültür ve HUVEC/GFP-HEp-2 ko-kültür) iki tekrarlı hazırlandı. Ekimden sonra 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde hem ışık mikroskobunda hem de konfokal mikroskopta

fotoğraflar çekilerek ko-kültürdeki hücrelerin morfolojileri mono-kültürlerine göre kıyaslandı.

Hücrelerin Yalnızca DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) ile Boyanması

Ana stok DAPI (5 mg/ml), ara stoğa (1 mg/ml) düşürüldü. Ara stoktan 1 mg/ml'den 5µl alınıp 495 µl PBS koyularak 1 µl/ml son stok hazırlanarak bu solusyon kullanıldı. Hücreler plakalara tutununca 24 saat sonra besiyeri çekildi ve PBS ile yıkama yapıldı. Hücreler, CM ile muamele edildi ve 24 saat inkübe edildi. Sürenin sonunda PBS ile 2 defa yıkama yapıldı. Hücreler, %4 Paraformaldehitte (Merck, Almanya) (250 µl/kuyu) 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Sürenin sonunda 2 defa PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamadan sonra 1 µl/ml DAPI ile boyama yapıldı (500 µl/kuyu) ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile 2 defa yıkandı. Hücreler, konfokal mikroskopta 358 nm eksitasyon ve 461 nm emisyonunda görüntülendi.

Hücrelerin DAPI ve Alexa Fluor® 680 Phalloidin ile Beraber Boyanması

Hücreler, %0,5 TritonX 100 (Merck, Almanya) ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 2 defa PBS ile yıkandı. Ana stok Phalloidinden (200 ünite/ml) 5 µl alınıp 195 µl PBS koyularak çalışma konsantrasyonu (5 ünite/ml) hazırlandı ve hücrelere (200 ul/kuyu) uygulandı. Hücreler, 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 2 defa PBS ile yıkandı. Sonra DAPI ile yukarıdaki protokole göre boyandı. DAPI ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 2 defa PBS ile yıkandı. Hücreler, konfokal mikroskopta DAPI için 358 nm eksitasyon ve 461 nm emisyonunda; Alexa Fluor® 680 için 679 nm eksitasyon ve 702 nm emisyonunda görüntülendi.

2.4.3. Morfoloji Analizi için İndirekt Ko-kültür

CM Muamelesi

Ko-kültürlerin kanser ve sağlıklı hücrelerin morfolojilerine olan uzun süreli (21 gün) ve kısa süreli (24 saat) etkilerini araştırmak için uygun deney düzeneği kurulmuştur.

CM ile Uzun Süreli Muamele

HEp-2 ve HUVEC hücrelerinin T25 flasklarda hücre kültürü bölümünde anlatıldığı gibi tam kültür medyumunda kültürü yapılmıştır. Bu kültürler kontrol

olarak kullanılmıştır. Diğer iki T25 flaska ise HEp-2 ve HUVEC hücreleri tam kültür medyumunda ekildikten ve hücreler flaskın %80-90'ını kapladıktan yaklaşık 24 saat sonra HEp-2 hücreleri %10 HUVEC-CM'si; HUVEC hücreleri %10 HEp-2-CM'siyle muamele edilerek hücreler 21 gün boyunca 3 güne bir pasaj yapılarak kültüre edilmiş ve 2 güne bir invert mikroskopta (Leica, Almanya) fotoğrafları çekilmiştir.

CM ile Kısa Süreli Muamele

HEp-2 ve HUVEC hücrelerinin T25 flasklarda hücre kültürü bölümünde anlatıldığı gibi tam kültür medyumunda kültürü yapılmıştır. Diğer iki T25 flaska ise HEp-2 ve HUVEC hücreleri tam kültür medyumunda ekildikten ve hücreler flaskın %80-90'ını kapladıktan yaklaşık 24 saat sonra HEp-2 hücreleri %10 HUVEC-CM'si; HUVEC hücreleri %10 HEp-2-CM'siyle 24 saat muamele edilmiştir. Sürenin sonunda hücrelerin invert mikroskopta fotoğrafları çekilmiştir.

2.5.Proliferasyon Deneyleri

Proliferasyon deneyi için kalorimetrik deneyler olan tiazolil tetrazolium blue (MTT) (Applchem, Almanya), tripan mavisi (Sigma, Almanya) deneyi ve 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) (BI, ABD) kullanılmıştır. Ayrıca hücre proliferasyonunu, morfoloji değişimini ve tutunma özelliğini gerçek zamanlı olarak değerlendirmek için non-invaziv elektriksel empedans izleme tekniğini kullanan gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA) de kullanılmıştır. Deneyi gerçekleştirebilmek için indirekt ko-kültürler kurulmuştur.

2.5.1 MTT Deneyi

Uygun zamanda toplanacak (24-48-72 saatlik) CM'yi belirleyebilmek ve bu CM'den uygun konsantrasyonu (%10, % 25, % 50, %75, %100) tayin etmek ve belirlenen konsantrasyon ve zamanlı CM'yi diğer deneylerde kullanabilmek için MTT yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakaların (Sarstedt, ABD) kuyucuklarına 5000 hücre/100 µl monokültür HEp-2, monokültür HUVEC, HEp-2-CM medyumundaki HUVEC hücreleri, HUVEC-CM medyumundaki HEp-2 hücreleri (belirli konsantrasyonlardaki CM'lerle) 6 tekrarlı (n=6) ekilerek üç zaman periyodunda (24, 48, 72 saatler için) üç ayrı plaka hazırlanmıştır. Plakalardan biri 37 °C'de %5 CO₂ etüvünde 24 saat, bir diğeri 48 saat, sonuncusu 72 saat inkübe edilmiştir. MTT, DMEM ile çözünerek 5 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 24 saatlik sürenin sonunda,

her bir kuyuya, hazırlanan MTT solüsyonundan 20 µl koyulmuştur. MTT solüsyonunda 37 °C’de hücreler mavi renge dönüşüp kristal form oluşana kadar dört saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda plaka, kağıt havluya boşaltılmıştır. Her bir kuyucuğun üzerine 150 µl DMSO (Sigma, Almanya) eklenmiştir. Plaka, rotorda 20 dakika boyunca tüm kristaller çözünene kadar çalkalanmıştır. Sürenin sonunda spektrofotometre (Biotek-Epoch, ABD) ile plakaların optik yoğunluğu 540 ve (parmak izlerini, lekeleri düzeltmek için) 650 nm’de ölçülmüştür. 48 ve 72 saat sürelerin sonunda diğer plakalar da aynı işlemlerden geçirilerek absorbansları tespit edilmiştir.

2.5.2. Tripan Mavisi Deneyi

HEp-2 ve HUVEC hücrelerine uygulanan CM etkisi sonucundaki canlılık oranlarını belirlemek için tripan mavisi deneyi yapılmıştır. HEp-2/HUVEC hücrelerine (30×10^4 hücre/ 2 ml) kendi medyumlarında 6 well-plakalara ekildi ve 24 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. Hücreler, tabana tutunduktan sonra eski medyum atıldı ve HEp-2 hücrelerine HUVEC-CM; HUVEC hücrelerine ise HEp-2-CM’ler eklendi. HEp-2/HUVEC hücrelerine bir kuyu kendi medyumunda kontrol olarak, diğer iki kuyudaki HEp-2/HUVEC hücrelerine ise %10 ve %100 CM eklendi ve 24 saat aynı inkübasyon şartlarında kültür edildi. Süre sonunda eski medyum steril 15 ml’lik falkonda toplandı. Kuyular, PBS ile yıkandıktan sonra her kuyu için 1 ml %0,25 tripsin enzimi eklenerek hücreler kaldırıldı. Her kuyuya 1 ml kültür medyumunu eklenerek tripsin nötralizasyonu yapıldı. Hücre süspansiyonu, önceki kullandığımız falkonlara aktarıldı ve 1500 RPM’de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürüldü. Supernatant atıldı ve hücre peletine 400 µl medyum eklendi ve pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Hücre süspansiyonu 1,5 ml’lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 200 µl %0,04 tripan mavi boyası eklendi ve canlı ve ölü hücre sayısı hesaplandı.

Boyanmış hücre süspansiyonu 5 dakika oda ısısında bekletildi, daha sonra hemositometri lamına 20 µl hücre süspansiyonundan yüklendi ve canlı hücreler ışık invert mikroskop altında (10× büyütme) 3 farklı bölgede sayıldı ve sayı ortalaması alındı. Toplam, canlı ve ölü hücre sayıları hücre sayımı kısmında anlatıldığı şekilde (2.2. bölüm) hesaplandı.

2.5.3. XTT Deneyi

MTT proliferasyon deney sonuçlarına göre 30 saatlik kültürlerin CM'lerinin toplanmasına ve %10 CM'nin deneylerde uygulanmasına karar verildi. XTT ile MTT deney şartlarına benzer deney sistemi kuruldu. 96 well plaka kuyularına 5000 hücre/100 µL monokültür HEp-2, monokültür HUVEC, Hep 2-CM 24 saat sonra eklenecek olan HUVEC hücreleri, HUVEC-CM 24 saat sonra eklenecek olan HEp-2 hücreleri 6 tekrarlı (n=6) ekilerek üç zaman periyodunda (24, 48, 72 saatler için) 3 ayrı plaka hazırlanmıştır. Bundan sonra XTT analizi yapıldı. XTT Reaktifi XTT Aktivatörü ile talimatlara göre birleştirilerek XTT çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Her kuyuya 50 µL hazırlanmış XTT Çalışma Solüsyonu eklenmiştir. Sürenin sonunda (5 saat) spektrofotometre ile plakaların optik yoğunluğu 460 ve (parmak izlerini, lekeleri düzeltmek için) 650 nm'de ölçülmüştür. 48 ve 72 saat sürelerin sonunda diğer plakalar da aynı işlemlerden geçirilerek absorbanları tespit edilmiştir.

2.5.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

'Kanser hücrelerinin (HEp-2) mikroçevresi, sağlıklı hücrelerin (HUVEC) proliferasyonunu ve morfolojisini nasıl etkiliyor?' ve 'Sağlıklı hücrelerin mikroçevresi, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve morfolojisini nasıl etkiliyor?' sorularının cevapları gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle (xCELLigence real-time cell analysis dual purpose (RTCA DP Analyser)) (Acea Biosciences, ABD) araştırıldı. XCELLigence RTCA cihazı (Şekil 2.6), her bir kuyucuktaki altın mikroelettrot biyosensörlerle hücre proliferasyonunu, morfoloji değişimini ve tutunma özelliğini gerçek zamanlı olarak değerlendirmek için non-invaziv elektriksel empedans izleme tekniğini kullanır. Yapışık hücre çoğalma oranı, hücre indeksinde (CI: Cell index) artış olarak kaydedilir.

A**B**

Şekil 2.6. (A) Real Time Cell Analiz (RTCA) Sistemi (B) E-Plaka-View

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde, deneyin uygulanması için hücre ekimi öncesi hücre plakalarını taşıyan istasyon (cradle), 37 °C etüvde en az 2 saat bekletildi. Süre sonunda her bir e-plaka view 16 (Acea Biosciences, ABD) (RTCA sistemine has elektronik 16 kuyuluk, invert mikroskopta incelemeye elverişli hücre kültür plakası) kuyusuna önceden ısıtılmış 50 µl DMEM besiyeri eklendi ve plakalar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Bu arada cihaza ait yazılım programı açıldı. Süre sonunda e-plaka, gerçek zamanlı hücre analiz istasyonuna yerleştirilerek arka plan okuması (Step 1) yapıldı. HEp-2 ve HUVEC hücreleri pasajlanarak 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Medyum kontrol (Blank) kuyuları hariç diğer kuyulara 100'er µl hücre süspansiyonu eklendi. Kuyulardan 6 tanesine HEp-2, 6 tanesine HUVEC hücreleri ekildi. Hücrelerin kuyu tabanına sağlıklı bir şekilde yapışabilmeleri için e-plakalar oda sıcaklığında 30-60 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra plakalar gerçek zamanlı hücre analiz istasyonuna yerleştirilerek 15 dakikada bir empedans ölçümü alındı (Step 2). Yaklaşık 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörün içinde hücreler plaka tabanlarına yapıştı. Kuyularda ölçülen hücre indeks değerleri yaklaşık 1 değerine ulaşınca kuyulardaki eski medyumlar boşaltılarak her hücreye uygun medyum; KM (kültür medyum) ya da CM (kondisyon medyum) koyuldu. HEp-2 hücresi ekilen kuyulardan 2 tanesine kültür medyum-hücre kontrolü olarak, 2 tanesine %10 HUVEC-CM'si, diğer 2 tanesine de %100 HUVEC-CM'si koyuldu. Aynı şekilde HUVEC hücresi ekilen kuyulardan 2 tanesine kültür medyum-hücre kontrolü olarak, 2 tanesine %10 HEp-2-CM'si, diğer 2 tanesine de %100 HEp-2-CM'si koyuldu. CM'ler eklenmeden önce Step 2 durduruldu ve plakalar gerçek zamanlı hücre analiz istasyonundan çıkarıldı. Kuyulardaki final hacim 150 µl olarak ayarlandı (100 µl hücre süspansiyonu + 50 µl medyum). Her bir deney grubu iki

tekrarlı çalışıldı. CM ekleme işlemi tamamlandıktan sonra e-plakalar tekrar istasyona geri kondu ve yaklaşık 130 saat boyunca her 15 dakikada bir ölçüm alınacak şekilde hücrelerin cell indeksi 1'in altına düşene kadar (hatta sıfırlanana kadar) kültüre devam edildi. Sonuçlar RTCA 2.0 programı ile analiz edildi. E-plakalar, aynı zamanda invert mikroskopunda hücreleri görüntülemeye imkan verecek şekildedir. Böylece hücre ekimi sonrası, CM ekleden hemen önce, CM ekledikten sonra 6 saatte bir 10x ve 40x'te foto çekildi.

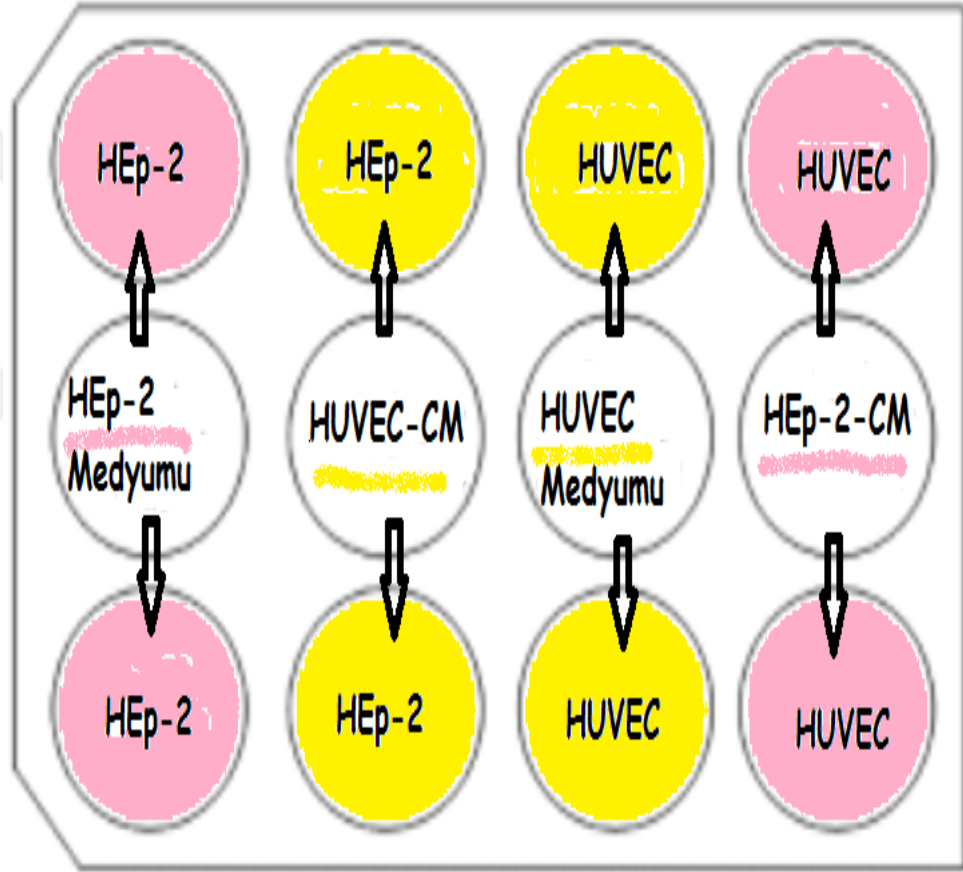
2.6.Migrasyon Deneyi

Migrasyon/Göç analizi için *wound healing (strach assay)* migrasyon deneyi kullanılmıştır. İlk önce 12 well plakalarda (Sarstedt, Almanya), daha sonra 24 well plakalarda (Sarstedt, Almanya) deneyler yapılmıştır. 12 well plakada ve az sayıda hücre ile çalışınca protokol gereği pipet ucuyla çizim sonrası, çizilen alana yakın hücrelerin strese girip kalktığı veya cansızlaştığı (mutsuzlaştığı) gözlenince, 24 well plakalarda ve daha fazla sayıda hücre ile deneylerin devamına karar verildi. Proliferasyon deneylerinden alınan sonuçların değerlendirmesine göre 30 saatlik kültür sonucunda toplanan CM'lerle deneyler yapılmıştır ve %0 FBS (dış kontrol), %100 KM (hücre kontrol), %10 CM, %25 CM, %50 CM, %100 CM'lerde optimizasyon yapılmıştır. Bu sonuçlara göre %10 CM ile deneye devam etme kararı alınmıştır.

Daha sonraki deneylerde ise proliferasyonu inhibe eden Mitomycin C (Sigma, Almanya) (1 mg/ml) kullanılmıştır. Mitomisin C, hücre kültürü sistemlerinde mitotik olarak aktif olmayan besleyici hücrelerin üretilmesi için kullanılır. Anti-mitotik etkinliği DNA sentezini engelleyerek olur. Yara kapanma deneyinde, açtığımız yara "hücre göçünden mi yoksa proliferasyondan dolayı mı kapanıyor" şüphesini ortadan kaldırmak için proliferasyon inhibitörü olarak kullanılmıştır. Mitomycin C ile hücrelerin proliferasyonunu baskılayıp yaranın kapanma tek sebebi olarak hücre göçünün olması hedeflenmektedir. Diğer deney grubunda ise Mitomycin C uygulanmayarak yara kapanma sebebi ise hem proliferasyon kaynaklı hem de göç kaynaklı olmuştur. Mitomisinli ve mitomisinsiz deney gruplarında fark gözlenmiştir.

HEp-2 ve HUVEC hücrelerinden uygun sayıda 12 veya 24 kuyucuklu plakalara ekim yapıldı. Plakaların hücrelerle tamamen dolması beklenip deneylere bundan sonra devam edilmiştir.

Hücreler, konfluent olduktan sonra Mitomycin C (1 mg/ml) ile 2 saat muamele edilip steril 10 veya 200 µl'lik pipet ucu yardımıyla hücelere '+' şeklindeki çizimlerle çizik/yara açılıp tek hücre tabakası kaldırılmıştır. Bu şekilde, yara yatağı (*wound bed*) oluşturuldu. Çizik oluşturulduktan sonra kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılıp, kalkmış hücreleri ortadan kaldırmak için kuyucuklar PBS ile 2-3 kere yıkanmıştır ve taze medyum ile bir kez yıkandıktan sonra taze medyum ilave edilerek kültüre devam edilmiştir. Plakalardaki kuyulardan biri, hücrelerin kendi medyumlarıyla (HEp-2, HEp-2 medyumuyla; HUVEC, HUVEC medyumuyla) kültüre edilirken diğeri ise CM'lerle (HEp-2 ise HUVEC-CM, HUVEC ise HEp-2-CM medyumuyla) kültüre edilmiştir (Şekil 2.7).



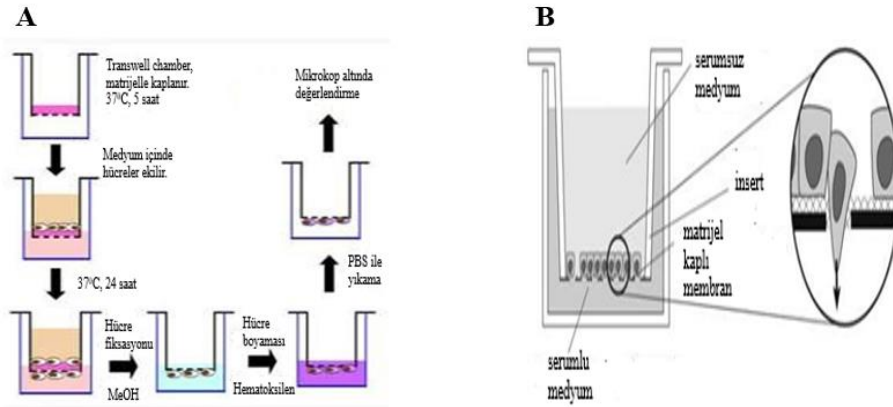
Şekil 2.7. Migrasyon deneyi için *HEp-2* ve *HUVEC* hücrelerinin mono-kültür ve indirekt ko-kültür şablonu (*HEp-2* kültür medyumunu pembe, *HUVEC* kültür medyumunu sarıyla gösterilmiştir).

Optimizasyon sürecinde wound healing deneyi için kültürler 72 saate kadar veya yara alanı tamamen kapanana kadar devam edilerek 0, 3, 6, 12, 24, 48 ve 72. saatlerde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu deney 9 kez tekrarlanmıştır. Deneylerdeki veriler tekrarlı ölçümlerin ortalaması alınarak belirlenmiştir.

Ancak hücrelerin doubling time'ları (hücre sayısının iki katına ulaşması için gereken süre) değişebileceğinden ölçüm saatleri modifiye edilmiştir. Her bir sürenin sonunda her bir kuyudaki belirlenen çizik alanlarından invert mikroskobun 4x objektifi ile fotoğraflar alınmıştır. Her iki hücre hattının her bir deney grubundan iki tekrarlı (n=2) deney düzeneği kurulmuştur. Her bir çizimin fotoğrafları belirlenen sürelerin sonunda çekilerek kayıt altına alınmış ve çizimin uzaklık farkı, referans noktası olarak "0." zamandaki görüntüler baz alınarak Image J yazılım programının yüzey alanı hesaplanmıştır.

2.7.İnvazyon Deneyi

İn vitro invazyon deneyi olarak "matrigel transwell chamber invasion assay" kullanılmıştır (Şekil 2.8). 24 well Transwell chamber insörtler (Corning, ABD), 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. İnvazyon deneyleri için matrijelli ve matrijelsiz plakalar hazırlanmıştır.



Şekil 2.8. (A) "Matrijel transwell chamber invazyon assay"ın, (B) Transwell chamber ve invazif/non-invazif hücrelerin şematik gösterimi. (http://www.sc.mahidol.ac.th/scbc/cholang_group.html)'den ve (N. Kramer vd. Mutation Research 752;2013)'den uyarlanmıştır.

2.7.1. Matrijel Hazırlanması

Matrijelin (Corning, Amerika) hazırlanması şu şekilde olmuştur; -20 °C'de muhafaza edilen matrijelin, buz üzerinde buzdolabında bir gece bekletilerek yavaşça erimesi sağlanmıştır. Ertesi gün, eriyen matrijel 2 ml'lik tüpler içinde buz üzerinde alikotlanmıştır. Alikotlanan matrijel, kullanılabildiği kadar -20 °C'de muhafazaya devam

edilmiştir. Kullanılacağı zaman gene buz üzerinde tutularak erimesi sağlanıp optimize edilen oranda DMEM medyumuyla seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.7.2. İnvazyon Deneyi Optimizasyonu

İnvazyon deneyi için transwell chamberların üstüne ekilen hücre sayısı, altına ekilen hücre sayısı, uygun matrijel hacmi ve konsantrasyonu, hücrelerin inkübasyon süresi ve kontrol grubundaki hücreler için gerekli kemoatraktanın konsantrasyonu için optimizasyonlar yapılmıştır. İnvazyon optimizasyon deneyleri sonucunda deneyi etkileyen parametreler, tablodaki değerler şeklinde optimize edilmiştir (Çizelge 2.1).

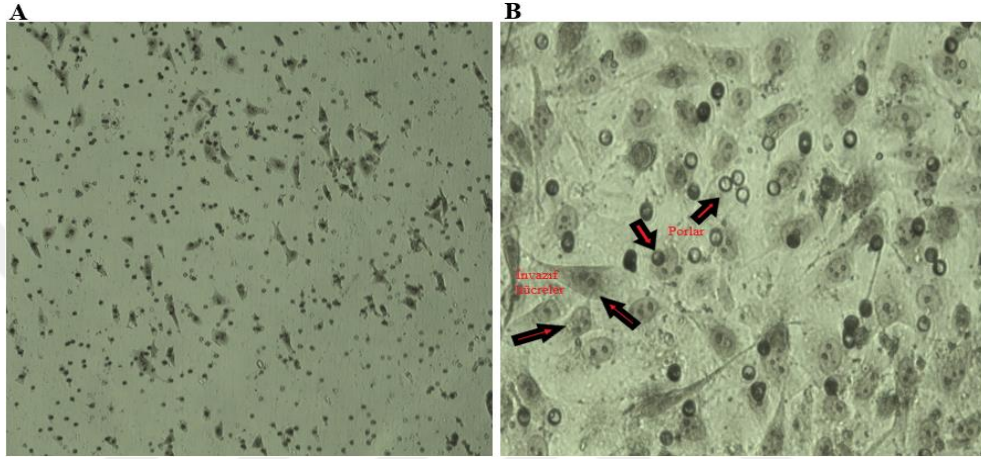
Çizelge 2.1. İnvazyon deneyinde optimize edilen parametreler ve değerleri.

İnsört'lere ekilen hücre sayısı (ml)	$4,5 \times 10^5$
Kuyulara ekilen hücre sayısı (ml)	4×10^4
Matrijel hacmi	50 μ l
Matrijel seyreltme oranı	1:10
Matrijel katılma süresi	5 saat
Hücre Inkübasyon süresi	24 saat
Kemoatraktan konsantrasyonu	%20 FBS

2.7.3. İnvazyon Deney Düzenegi

İnvazyon deneyi için ko-kültür sistemleri şu şekilde hazırlanmıştır (Şekil 2.9); 24 kuyulu transwell plakalarda 8 μ m gözenek boyutlu polikarbonat zar içeren insörtler içine HUVEC (optimize edilen sayıda) ekilmiştir. HEp-2 hücresi (optimize edilen sayıda), HUVEC hücre içeren transwell insörtlerin altındaki kuyulara ekilmiştir. Kontrol grubu olarak ise; 24 kuyulu transwell plakalarda 8 μ m gözenek boyutlu polikarbonat zar içeren insörtler içine HEp-2 (optimize edilen sayıda) ekilmiştir. Bu transwell insörtlerin altındaki kuyuya hiçbir hücre ekilmemiştir. %20 FBS içeren medyum ile alt kuyucuk doldurulmuştur. Ve diğer deney grubu için 24 kuyulu

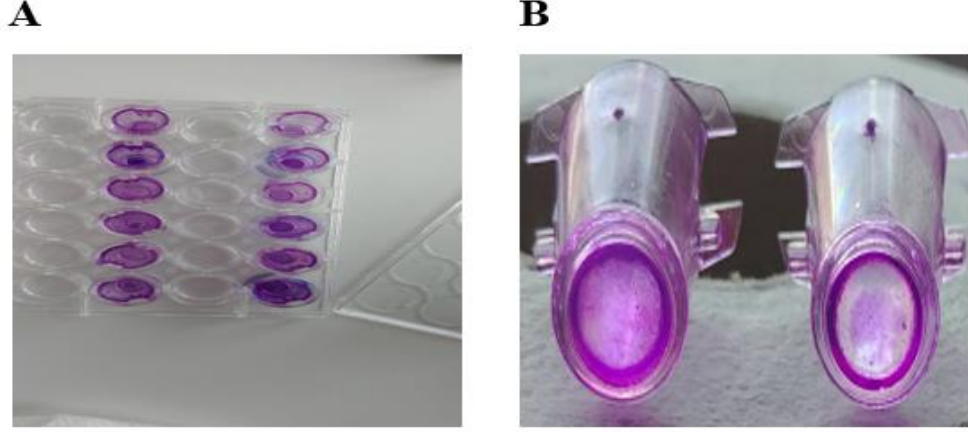
transwell plakalarda 8 µm gözenek boyutlu polikarbonat zar içeren insörtler içine HEp-2 ekilmiştir. HUVEC hücresi, HEp-2 hücre içeren transwell insörtlerin altındaki kuyuya ekilmiştir. Kontrol grubu olarak ise; 24 kuyulu transwell plakalarda 8 µm gözenek boyutlu polikarbonat zar içeren insörtler içine HUVEC ekilmiştir. Bu transwell insörtlerin altındaki kuyuya hiçbir hücre ekilmemiştir. %20 FBS içeren medyum ile alt kuyucuk doldurulmuştur. Bu deney grubundan aynı şekilde matrijelli olarak da hazırlanmıştır.



Şekil 2.9. Boyden transwell chamberin filtreli porları ve invazyon yapmış HEp-2 hücreleri (10x ve 40x).

Uygun dilüsyonla hazırlanan matrijelden 50'şer µl chamberlara koyulmuştur. İnvazyon yüzdesinin hesaplanması için matrijel koyulan kuyu kadar, chamberlara ise matrijel koyulmamıştır. Matrijelin donmasını takiben 5 saat sonra, matrijelli ve matrijelsiz transfer bölmelerine (*chamberlar*) hücre deney gruplarının ekimi yapılmıştır. Transwell chamberına konulan kuyulara (alt kısımlara), 750'şer µl serumlu kültür medyumunu eklenmiştir. 200 µl serumsuz besiyeri içinde uygun ve optimize edilen sayıda hücreler transfer chamberlara (üst kısımlara) ekilerek ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün chamberlar boşaltılıp iki kere PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra %3,7'lik PBS'li formaldehit (Merck, Almanya) ile hücreler fikse edilip oda sıcaklığında 2 dakika beklenmiştir. Formaldehit boşaltılıp iki kere PBS ile yıkanmıştır, %100 metanol (Sigma, Almanya) ile 20 dakika oda sıcaklığında beklenerek hücre zarının geçirgenliği sağlanmaktadır. Süre sonunda metanol alınıp iki kere PBS ile yıkanmıştır. Transwell chamberlar pamuklu kulak çöpü ile iyice kazınarak non-invazif hücrelerin uzaklaşması sağlanmıştır. Giemsa boyasından (Merck, Almanya) 500'er µl alınıp hem transwell chamberlarına hem de kuyucuklara koyularak, alüminyum folyoyla kapatılıp 15 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur

(Şekil 2.10). Işık mikroskobu altında invazif hücrelerin 10x'te fotoğrafları alınıp bilgisayar ortamında Image J (Amerika) yazılım programıyla sayılmıştır (Şekil 2.11). Her bir hücre grubunun invazyon yüzdesi hesaplanmıştır.

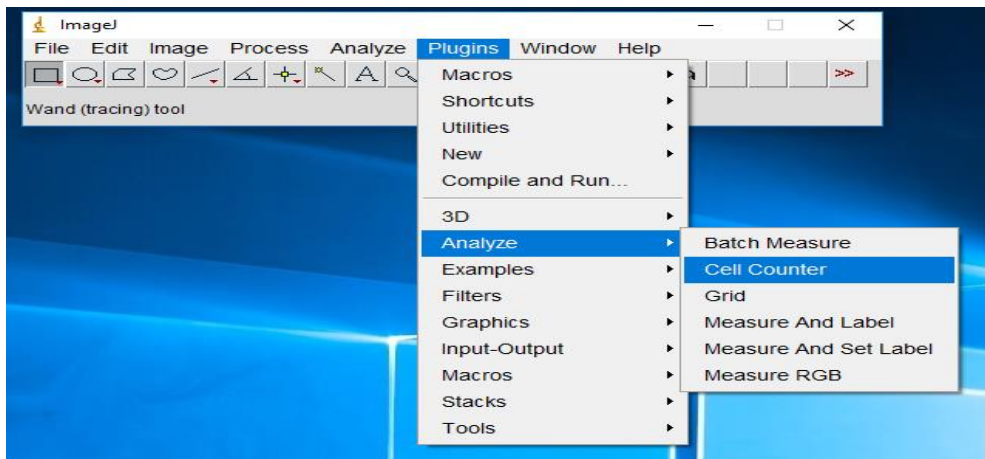


Şekil 2.10. (A) 24 kuyulu plakalarda transwell chamberlar; (A) Giemsa boyaması sonrası kuyular ve insörtler (B) Matrijelli (sağdaki) ve matrijelsiz (soldaki) insörtler.

İnvazyon deneyleri en az 3 kere yapılmış olup sonuçlar invazyon yüzdesi şeklinde hesaplanmıştır:

% İnvazyon

$$= \frac{\text{Matrijelli insert membrana invaze olan hücre sayısı}}{\text{Kontrol (matrijelsiz) insert membrana migrasyon yapan hücre sayısı}}$$



Şekil 2.11. İmage J yazılım programındaki Cell Counter.

2.8.Hedef Genlerin Ekspresyon Analizleri

Kanser hücrelerinin (HEp-2) mikroçevresi, HUVEC hücrelerinin gen profilini ve sağlıklı hücrelerin (HUVEC) mikroçevresi, kanser hücrelerinin gen profilini nasıl etkiliyor?’ sorularının cevapları mRNA seviyesinde araştırılmıştır.

2.8.1. CM Muamelesi

Ko-kültürlerin kanser ve sağlıklı hücrelerin gen profiline uzun süreli (21 gün) ve kısa süreli (24 saat) etkilerini araştırmak için uygun deney düzeneği yukarıda anlatıldığı gibi (2.4.3. bölüm) kurulmuştur. Sürenin sonunda hücreler tripsinle kaldırılarak RNA izolasyonu prosedürüne geçilmiştir.

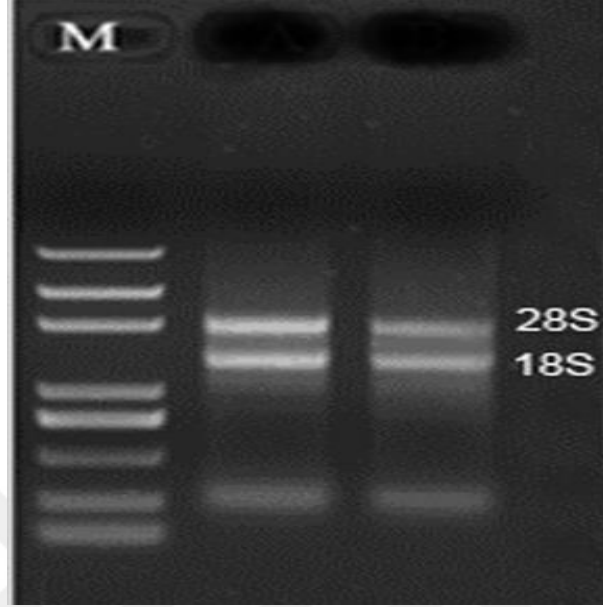
2.8.2. RNA İzolasyonu

Hücreler, CM ile muamele ile istenilen sürenin sonunda (24 saat ya da 21 gün sonra) tripsin ile kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 15 ml’lik falkonlara aktarılarak 1200 RPM’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet üstüne 1ml trizol (Invitrogen, ABD) koyuldu. Hücre-TRIZOL süspansiyonu 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı ve bolca pipetaj yapıldı. Üzerine 200 µl kloroform eklendi. Tüp sertçe vortekslendi ve 15 dakika buzda inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, karışım 12000×g’de 15 dakika boyunca 4 °C’de santrifüj yapıldı ve faz ayırımından sonra oluşan şeffaf üst kısım alındı ve yeni bir 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı. RNA karışımına 500 µl isopropanol eklendi ve karışım vortekslendikten sonra 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Sürenin sonunda, 12000×g devirde 10 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pelete 1 ml %70’lik etanol eklendi ve 7500×g devirde 10 dakika boyunca 4 °C’de tekrar santrifüj yapıldı. Sürenin sonunda süpernatant tamamen alındı ve RNA peleti kurumaya bırakıldı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra RNA peleti 50 µl ddH₂O’da çözdürüldü.

2.8.3. RNA Miktarı ve Kalitesinin Belirlenmesi

RNA izolasyonundan sonra her bir örnek için 260 ve 280 nm UV Spektrofotometre (ACT Gene, ABD) ile RNA miktarı ve kalitesi ölçüldü. Miktar tayini yapılan RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacıyla 1 µg/5µl RNA üzerine 6x yükleme boyasından 2 µl eklenerek %1’lik agaroz jelde elektroforez sonrası

ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak UV translüminatör görüntüleme sisteminde (Bio-Rad, ABD) gözlemlendi. Jelde 28S ve 18S rRNA (ribozomal ribonükleik asit) moleküler ağırlığa sahip RNA bantları gözlemlendi (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Temsili RNA agaroz jel görüntüsü.

2.8.4. Genomik DNA (gDNA)'nın Uzaklaştırılması

Spektrofotometrik ölçümleri yapılan RNA'ların konsantrasyonları 1 µg/10µl olacak şekilde DEPC-ddH₂O kullanılarak eşitlendi. Olası gDNA kontaminasyonlarının ortadan kaldırılması amacıyla DNase-I enzim reaksiyonu üretici firmanın (EUR_x, DNase I, RNase-Free) protokolüne göre uygulandı. Bu protokole göre 1 µg/20 µl total RNA üzerine 1 µl DNase-I reaksiyon karışımı ve 1 µl DNase-I enzimi konularak 37 °C'de 15 dakika bekletildi. Enzimatik reaksiyonun durdurulması için 2 µl 50 mM EDTA ilavesi ile 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

2.8.5. Reverz Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu (cDNA Sentezi)

gDNA'nın uzaklaştırılmasının ardından 1 µg/10 µl total RNA'dan tek zincir cDNA üretimi 2-Step RT-PCR kiti (Vivantis, Malezya) ticari kit kullanarak gerçekleştirildi. Bunun için oda ısısında bir tüp içerisine 2 ng RNA, 50 ng/µl random hexamerden 1 µl, 40µM'den 1 µl oligo (dT) 18 primer, 10 mM'lik dNTP karışımından 1 µl ve 10 µl'ye tamamlayacak miktarda nükleaz içermeyen su eklendi ve denatürasyon için Thermol Cycler cihazında (Bio-Rad-T100, ABD) 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda karışıma sıra ile 10x buffer M-MulV'den 2 µl,

100 ünite Reverse Transkriptaz enziminden 0,5µl eklendi ve karışım toplam hacim 20 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen suyla tamamlandı ve tüp yavaşça karıştırıldı. cDNA sentezi için karışım 42 °C 60 dakika inkübe edildi, ardından random hekzamer kullanıldığı için 25 °C 10 dakika inkübasyon yapıldı. Süre sonunda karışım, enzim inaktivasyonu için 85 °C 5 dakika inkübe edildi. Sentezlenmiş cDNA, 1:9 veya 1:6 oranlarında sulandırılarak kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

2.8.6. Primerlerin Seçimi ve Dizaynı

Çalışmada kullanılan genler; proliferasyon, migrasyon, metastaz yoluyla ilişkili veya EMT’de markör olanlar arasından seçilmiştir. mRNA dizi bilgileri Gen Bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) üzerinden elde edildi. İlgili genin mRNA sekansları IDT (<http://eu.idtdna.com/home/home.aspx>) programı ile dizayn edildi (Çizelge 2.2.). Primerlerin sekans bilgileri ve çoğaltılacak bölge Gen Bankasındaki BLAST programı ile kontrol edildi.

Çizelge 2.2. Primerlerin gen isimleri, simgeleri ve uzunlukları (bp).

Gen ismi	Simgesi	Primer dizisi	Uzunluk (bp)
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GAPDH-F GAPDH-R	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	115 bp
Actin Beta	ACTB-F ACTB-R	ACTCTCCAGCCTTCCTTC ATCTCCTTCTGCATCCTGTC	110bp
Beta-2-Mikroglobulin	B2M-F B2M-F	TGCTGTCTCCATGTTTGTATGATCT TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	86bp
Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta	YWHAZ-F YWHAZ-R	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA CCGCCAGGACAAACCAGTAT	94bp
Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase	HPRT1-F HPRT1-R	CGAGATGTGATGAAGGAGATGG TTGATGTAATCCAGCAGGTCAG	98bp
Nöral kaderin (N-cadherin)	CDH2-F CDH2-R	AGCCAACCTTAAGTGAAGGAGT GGCAAGTTGATTGGAGGGATG	100 bp
Vimentin	VIM-F VIM-R	CAGCTTTCAAGTGCCTTTCTG CTTGAGGAGTGTCGGTTTGT	95 bp
C-X-C motif chemokine ligand 8	CXCL8-F CXCL8-R	CTTGCGAGCCTTCTTCTGATTT GGGTGAAAGGTTTGGAGTATG	111 bp
Matrix metalloproteinase 2	MMP-2-F MMP-2-R	AAGTGGTCCGTGTGAAGTATC GGTATCAGTGCAGCTGTTGTA	95 bp
Matrix metalloproteinase 9	MMP-9-F MMP-9-R	TCACTTTCTGGGTAAGGAGTA CTGTCAAAGTTCGAGGTGGTAG	91 bp
C-C Motif Chemokine Ligand 21	CCL21-F CCL21-R	CTCAAGTACAGCCAAAGGAAGA CAAGAACAGGATAGCTGGGATG	99 bp
Integrin Subunit Alpha 1	ITGB1 -F ITGB1 -R	TGATCCTGTGCCATTGTAAG TGACCTCGTTGTTCCCATTC	86 bp

2.8.7. Primerlerin Sulandırılması

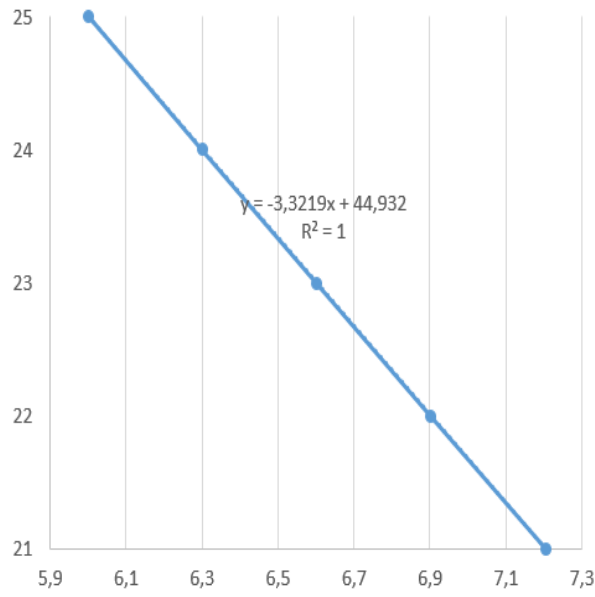
Liyofilize primerler 3000 g hızında 3 dakika santrifüj edildi ve 10 pMol/ μ l konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz içermeyen su içerisinde çözdürüldü. Her bir genin forward ve reverz primerlerinden alt stoklar hazırlanarak -20°C’de muhafaza edildi.

2.8.8. Referans Gen Seçimi

Çalışmada kullanılan HEp-2 ve HUVEC hücre hatlarıyla ilgili literatürde geçen sıklıkla kullanılan referans genlerden bir set (GAPDH, ACTB, B2M, YWHAZ, HPRT1) seçilmiştir. Bu bir dizi gen arasından farklı biyolojik şartlar altında en minimum değişkenlik gösteren; nispeten en stabil olan gen HEp-2 ve HUVEC hücreleri için referans gen olarak ayrı ayrı seçilmiştir.

2.8.9. Primer Dilüsyonları ile Primer Etkinliğinin Belirlenmesi

HEp-2 ve HUVEC mono-kültür ve ko-kültür örneklerinin cDNA’larından 5’er μ l olarak cDNA havuzu oluşturuldu. Daha sonra elde edilen bu cDNA 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 dilüsyonlarında sulandırıldı. Her primer için RT-qPCR (ROCHE, Modeli: Light Cycle 480 II, Almanya) yapıldı. Dilüsyonların Cycle-Logaritmik konsantrasyon okuma değerleri grafiği çizilerek, gözlenen noktaların lineer bir doğru oluşturmaya en çok yaklaştığı bölgedeki beşerli noktalardan grup oluşturuldu. Grafikteki noktalara eşit uzaklıkta bulunan doğru denklemlerinden eğimleri bulundu ve $10^{-(1/E_{\text{gim}})}$ formülü ile primer etkinliği değerleri hesaplandı (Şekil 2.13). Eğimin kabul edilen değeri -3,0 ve -3,6 arasında ve $R^2 > 0,990$ olmalıdır.

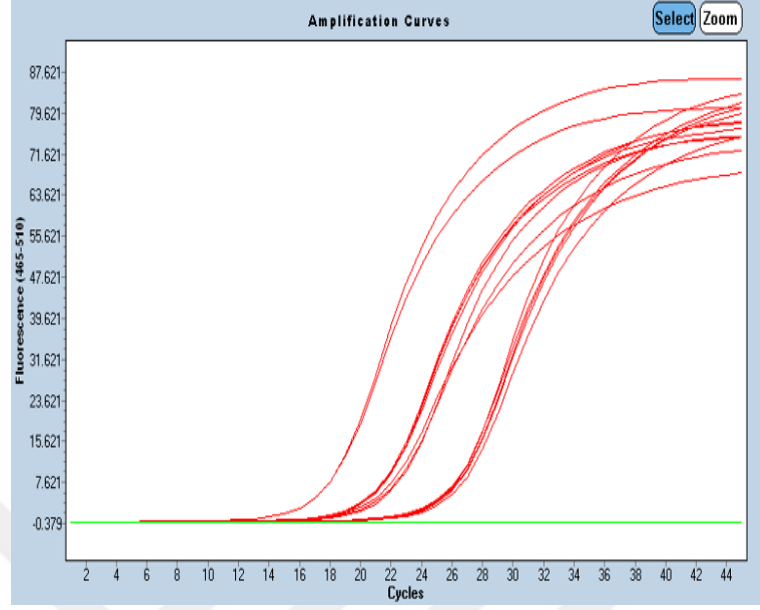


Şekil 2.13. İdeal bir primer etkinliği grafiği ve denklemleri.

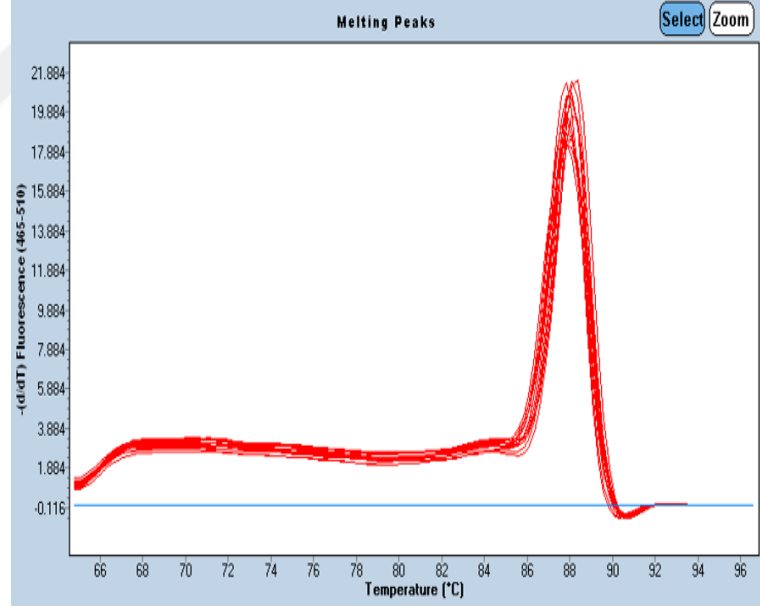
2.8.10. Real Time Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR)

HEp-2 ve HUVEC mono-kültür ve ko-kültür gen anlatımı farklılıklarının belirlenmesi için seçilen genlerin primerleri, cDNA'lar kullanarak RT-qPZR'da çoğaltıldı. İnterkalasyon ajan olarak çift iplikçikli DNA'ya bağlanabilen ve SyberGreen'e göre daha fazla floresan ışımaya yapabilen yeni bir boya olan BRYT Green kullanıldı. Reaksiyon BRYT Green içeren GoTaq® qPCR Master Mix (Pomega, ABD), 2X'ten 1X olacak şekilde; 5 µl miks, 10 pMol forward primer ve reverz primer içeren ara stoğundan 0,1 µl; 1/10 sulandırılmış cDNA'dan 2 µl eklendi ve toplam hacim 10 µl olacak şekilde steril dH₂O ile tamamlandı. Yarı hacimde (5 µl) hazırlanan reaksiyon da başarılı bir şekilde çalışmıştır; bu sebeple analizlerin bir kısmı yarı hacimde yapılmıştır. Reaksiyon steril 8'li RT-qPZR stripleri (Axygen, ABD) içinde gerçekleştirildi. Reaksiyonun ısı profili +95°C'de 10 saniye, 45 döngü (95°C'de 15 saniye, 58°C'de 30 saniye, 72°C'de 45 saniye) olacak şekilde ayarlandı. Optik ölçümler, her siklusun 58°C'deki bağlanma ısısının hemen bitiminde, uzama safhasında cihaz tarafından otomatik olarak yapıldı ve amplikasyon eğrileri görüntülendi (Şekil 2.14). Daha sonra 63°C'den 95°C'ye kadar saniyede 0,1°C olacak şekilde kademeli olarak ısıtıldı ve bu ısılar içerisindeki her 1°C artışta optik ölçümler yapılarak erime eğrisi (melting curve) analizi gerçekleştirildi (Şekil 2.15). RT-qPZR'de optik analiz sonucu elde edilen veriler Cq olarak kayıt edildi. Negatif kontrol olarak non template control (NTC) olarak cDNA yerine aynı miktarda *double distile su* (ddH₂O) içeren karışım kullanıldı. Elde edilen veriler uygun housekeeping gen

seçimine bağlı şekilde, normalizasyonları yapılarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak analiz edildi.



Şekil 2.14. Deney gruplarımızdan bir amplifikasyon eğrisi örneği (yeşil çizgi NTC'ye aittir).



Şekil 2.15. Deney gruplarımızdan bir erime eğrisi örneği (mavi çizgi NTC'ye aittir).

2.9. İstatistiksel Analizler

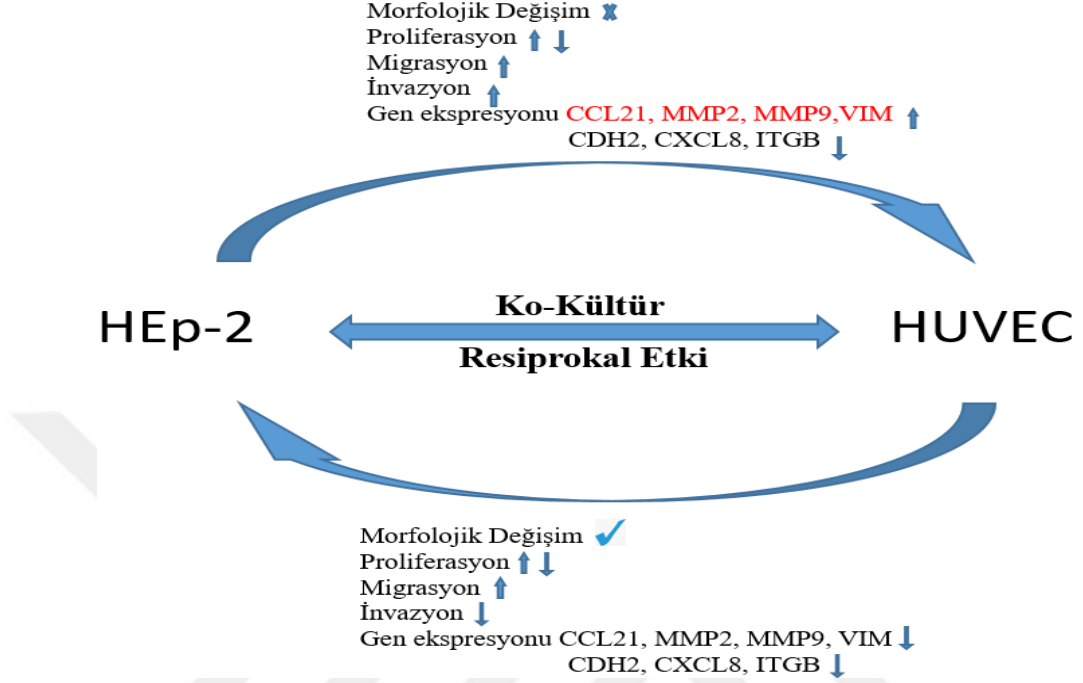
Ko-kültür olan çalışma grupları, negatif kontrol olan mono-kültür grupları ile istatistiki karşılaştırma yapıldı ve anlamlılık p değeri hesaplanarak incelendi. Gruplar içi farklılık *student's unpaired t testi* uygulanarak araştırıldı. Bütün istatistiksel

işlemler GraphPad Prism® V.6.00 (GraphPad software Inc.) programı kullanılarak gerçekleştirildi. $p < 0,05$ istatistiksel fark olarak anlamlı kabul edildi.



3. BULGULAR

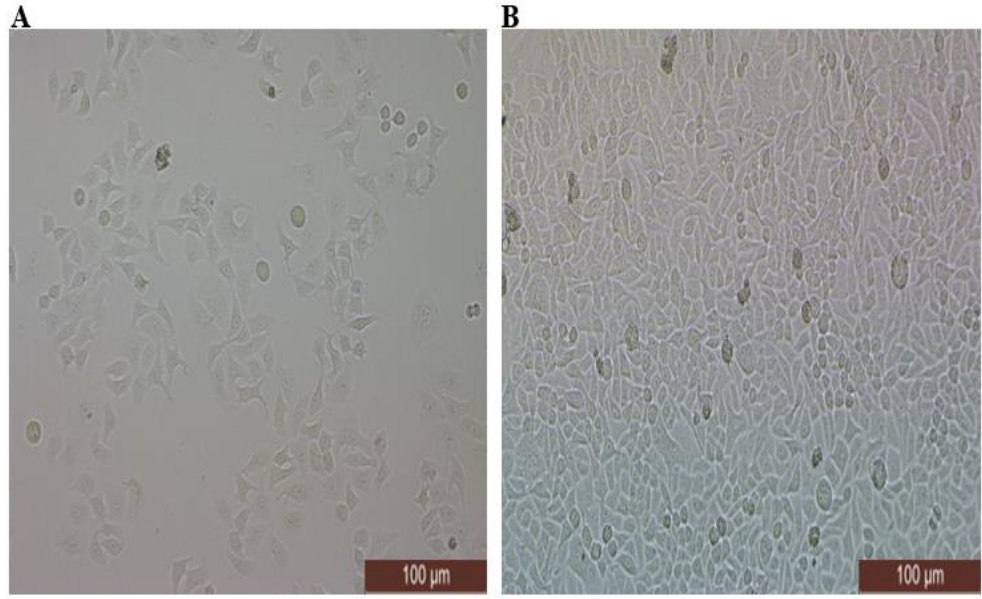
Tüm bulgular şekil 3.1.'de özetlenmiştir.



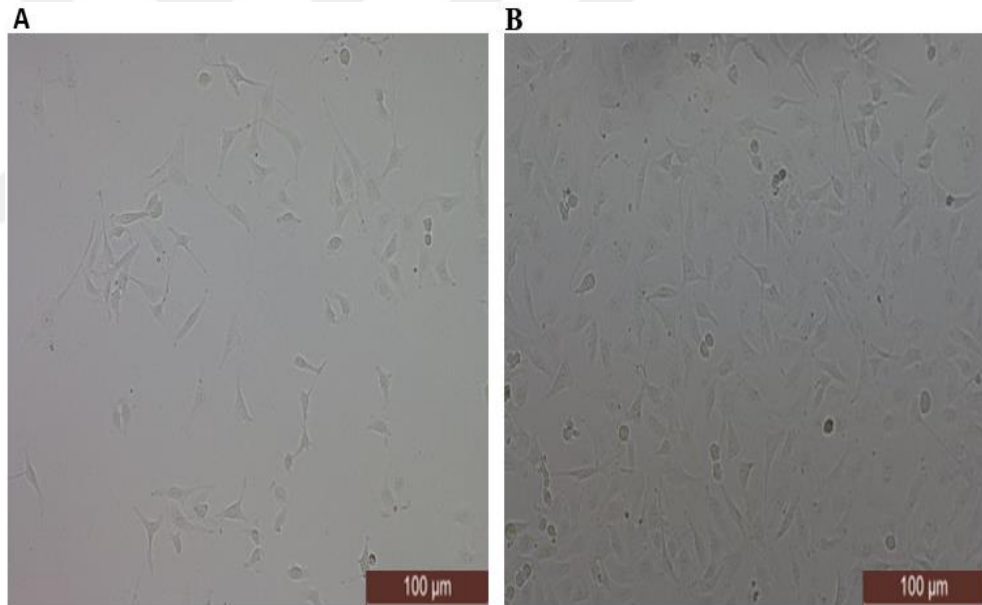
Şekil 3.1. Endotel hücreleri ve larinks kanseri hücrelerinin karşılıklı konuşmalarının hücre çoğalması, invazyon, metastaz ve kanser progresyonunda belirleyici genler üzerindeki etkilerinin sonuçlarını gösteren/özetleyen şema.

3.1.Hücre Kültürü

Hücre kültürleri, 3 günde bir besiyerlerinin değiştirilmesi suretiyle, 37 °C ve %5 CO₂'li ortamda etüvde yeterli doluluk oranına ulaşınca kadar kültür edildi (Şekil 3.2 ve 3.3). Yeterli doluluk oranına ulaşan hücreler yeni kültür flasklarına aktarıldı. Çalışmaya devam edilmeyen hücreler ise dondurma medyumunda -80 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.2. HEp-2 hücre kültürü (x10) (A) düşük yoğunlukta ve (B) yüksek yoğunlukta invert mikroskop görüntüleri.

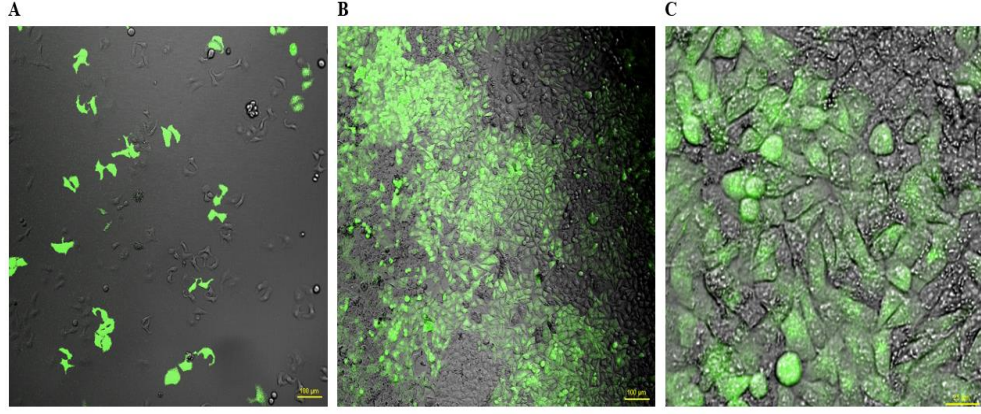


Şekil 3.3. HUVEC hücre kültürü (x10) (A) düşük yoğunlukta ve (B) yüksek yoğunlukta invert mikroskop görüntüleri.

3.2.Morfoloji Analiz Sonuçları

3.2.1. Puromisin Seleksiyon Sonuçları

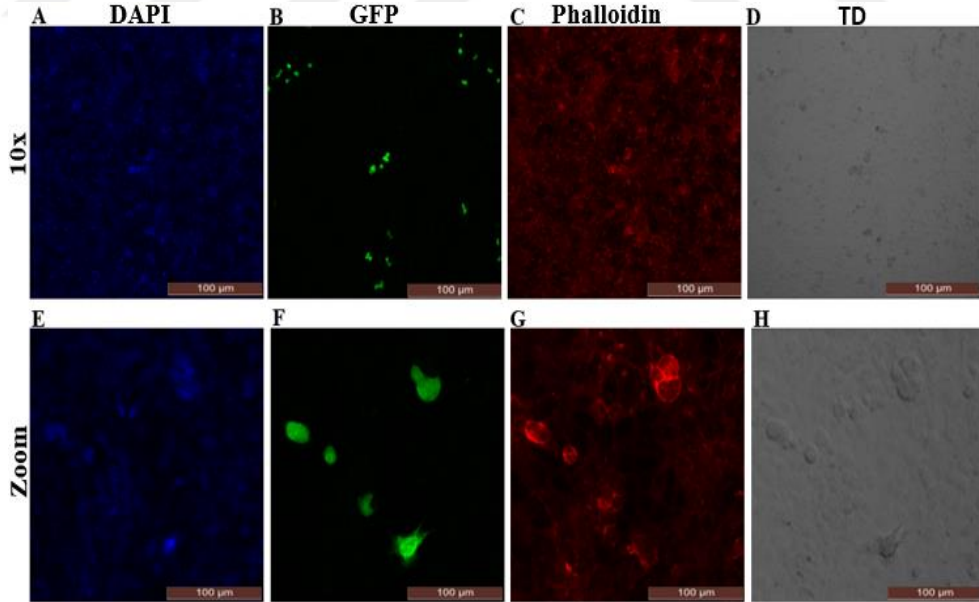
Promisin uygulamasının ardından, hücre ölümü azalan hücreler konfokal mikroskop ile kontrol edildi ve GFP oranı %90'ı geçen hücre hatlarında promisin uygulaması sonlandırıldı (Şekil 3.4).



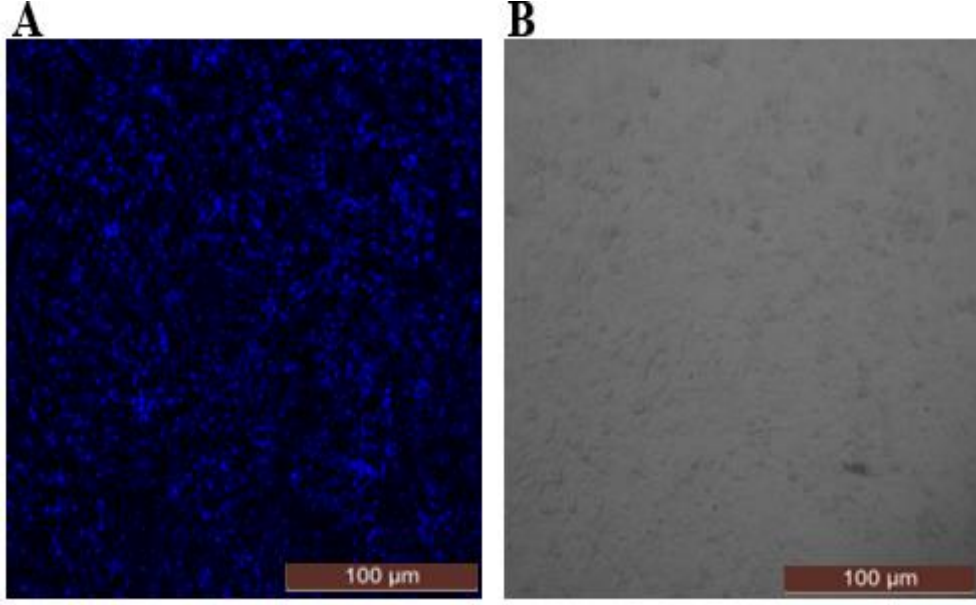
Şekil 3.4. GFP-HEp-2 hüceleri konfokal mikroskop görüntüleri (A) Puromisin seleksiyonu öncesi (10x) (B) Puromisin seleksiyonu sonrası (10x) (C) Hücrelerin NY-quist/zoom yapılmış hali (10x).

3.2.2. Hücrelerin Ko-kültür Sonrası Konfokal Mikroskop Görüntüleri

Hep-2 ve HUVEC hüceleri mono ve ko-kültürde DAPI ve Alexa Fluor 680 Phalloidin ile boyandıktan sonra konfokal mikroskopta incelendi (Şekil 3.5) ve mono-kültür ve ko-kültürdeki morfolojileri kıyaslandı. HUVEC hüceleri ko-kültürde tabanı tamamen kapladıkları için belirgin bir morfolojik değişim gözlenmemiştir (Şekil 3.6).

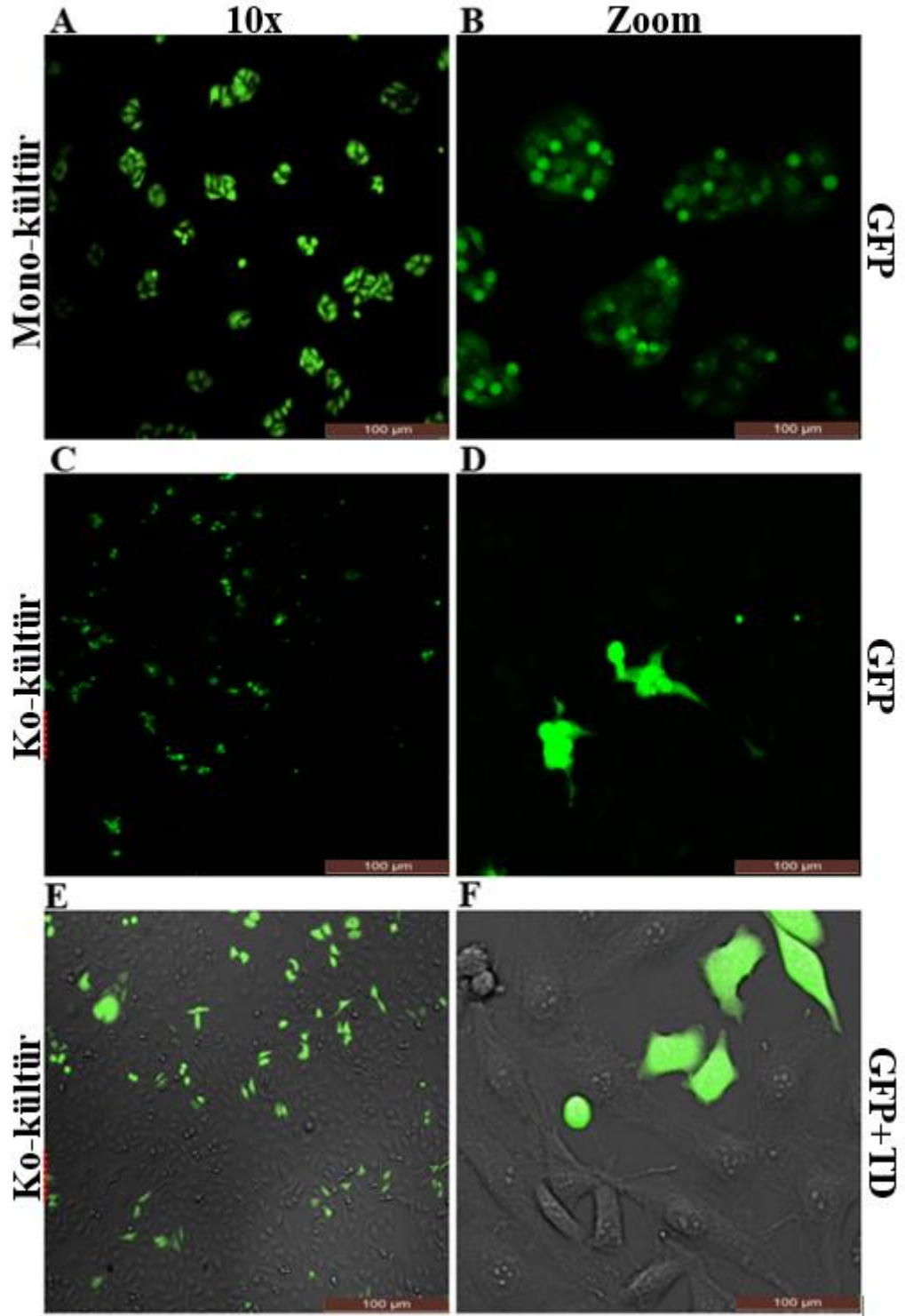


Şekil 3.5. HEp-2-GFP ve HUVEC hüceleri ko-kültür konfokal mikroskop görüntüleri (TD -Transmitted dedektör-ışık mikroskobundaki görüntüsüdür).



Şekil 3.6. Mono-kültürdeki HUVEC hücrelerinin (A) DAPI ve (B) TD konfokal mikroskop görüntüleri (10x).

Mono-kültürde GFP-HEp-2 hücreleri yuvarlağımsı bir formda olup koloni halinde çoğalmayı seçerken; HUVEC ile ko-kültürde ise GFP-HEp-2 hücreleri tek tek çoğalmayı seçmiş ve mekik şekline dönüşmüşlerdir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. GFP-HEp-2 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri. (A,B) Mono-kültürdeki GFP-HEp-2 hücreleri. (C-E) Ko-kültürdeki GFP-HEp-2 hücreleri.

3.3.Proliferasyon Deney Sonuçları

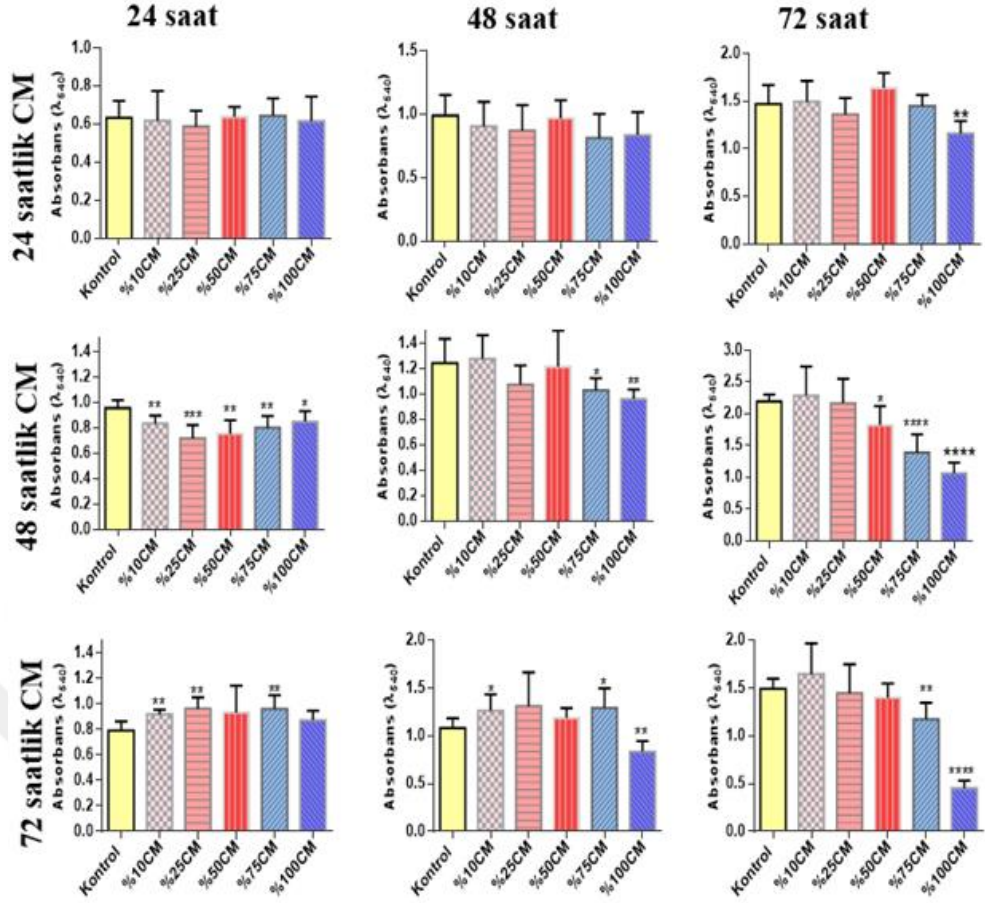
3.3.1. MTT ve XTT Deney Sonuçları

Uygun zamanda toplanacak (24-48 veya 72 saatlik) CM'yi belirleyebilmek ve bu CM'den uygun konsantrasyonu (%10, % 25, % 50, %75, %100) tayin etmek ve belirlenen konsantrasyon ve zamanlı CM'yi diğer deneylerde kullanabilmek için MTT yapılmıştır.

24 saatlik CM'nin kullanıldığı deneylerde; HUVEC-CM'si ile 24 saatlik muamele sonunda, kontrole (kültür medyumuyla muamele edilen HEp-2 hücreleri) kıyasla %10, 25, 50, 75 ve 100 CM'ler HEp-2 hücrelerinin proliferasyonunu ne baskılamış ne de artırmıştır. 48 saatlik muamele sonunda ise kontrole kıyasla tüm HUVEC-CM konsantrasyonları, hücrelerin proliferasyonunu baskılamıştır; ancak kontrole göre anlamlı bir fark görülmemektedir. 72 saatlik muamele sonunda ise %100 HUVEC-CM'si hücreler için toksiktir ($p<0,01$). %10 ve %50 CM'si ise proliferatif etkidedir.

48 saatlik CM'nin kullanıldığı deneylerde; HUVEC-CM'si ile 24 saatlik muamele sonunda, kontrole kıyasla %10 ($p<0,01$), 25 ($p<0,001$), 50($p<0,01$), 75 ($p<0,01$) ve 100 ($p<0,05$) CM'ler HEp-2 hücrelerinin proliferasyonunu baskılamıştır. 48 ve 72 saatlik muameleler sonunda ise sadece %10 CM'si proliferasyonu tetiklemiş; diğer konsantrasyonlar ise proliferasyonu baskılamıştır. Yüksek konsantrasyonlu CM'lerin sonuçları anlamlıdır (özellikle %75 ve %100 CM, $p<0,0001$).

72 saatlik CM'nin kullanıldığı deneylerde; HUVEC-CM'si ile 24 saatlik muamele sonunda, kontrole kıyasla tüm konsantrasyonlar, hücrelerin proliferasyonunu artırmıştır. %10, %25 ve %75 CM anlamlıdır ($p<0,01$). 48 saatlik muamele sonunda ise %100 CM hariç ($p<0,01$), tüm konsantrasyonlar hücrelerin proliferasyonunu artırmıştır (%10 ve %75 CM anlamlıdır; $p<0,05$). 72 saatlik muamele sonunda ise yalnızca %10 CM proliferatif etkidedir. Diğer dozlar ise özellikle %100 CM toksik ya da antiproliferatiftir ($p<0,0001$) (Şekil 3.8).

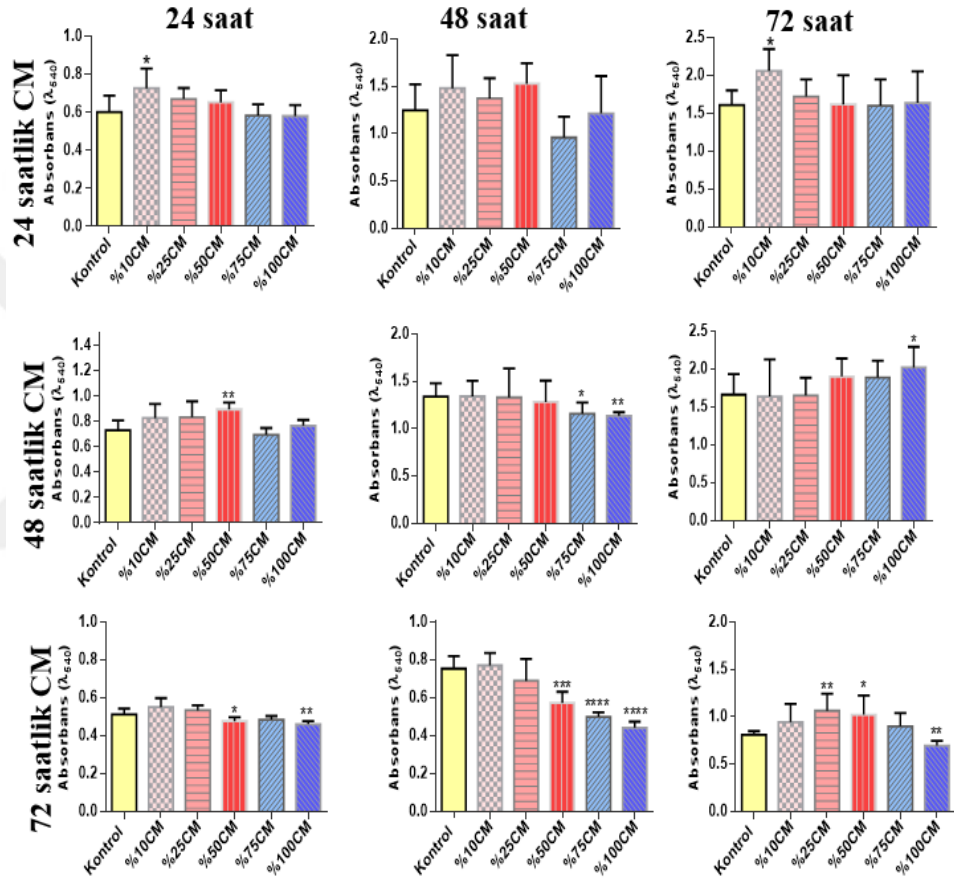


Şekil 3.8. HEP-2 hücresinin farklı süre ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış CM'lerle muamelesi sonundaki MTT hücre proliferasyon deney sonuçları. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

24 saatlik CM'nin kullanıldığı deneylerde; HEP2-CM'si ile 24 saatlik muamele sonunda, kontrole (kültür medyumuyla muamele edilen HUVEC hücreleri) kıyasla %10 (p<0,05), %25, %50 CM'ler, HUVEC hücreleri için proliferatif; diğer konsantrasyonlar ise antiproliferatif etkide olmuştur. 48 saatlik CM ile muamele sonunda %10, 25 ve 50 CM'ler proliferatif, diğerleri ise anti-proliferatif etkidedir. 72 saat muamele sonunda %10 CM'sinin proliferatif etkisi anlamlıdır (p<0,05). Diğer konsantrasyonların ise kontrole kıyasla hücreler üzerine anlamlı bir etkisi yoktur.

48 saatlik CM'nin kullanıldığı deneylerde; HEP2-CM'si ile 24 saatlik muamele sonunda %10, 25 ve 50 CM (p<0,01)'ler proliferasyonu artırmış; lakin diğer konsantrasyonların anlamlı bir etkisi olmamıştır. 48 saatlik muamele sonunda %10, 25 ve 50 CM'lerin anlamlı bir etkisi olmamış; %75 ve %100 CM'nin ise anlamlı anti-proliferatif etkisi görülmüştür (sırasıyla p<0.05 ve p<0.01). 72 saatlik muamele sonunda ise yalnızca %100 CM'nin anlamlı bir proliferatif etkisi görülmektedir (p<0,05).

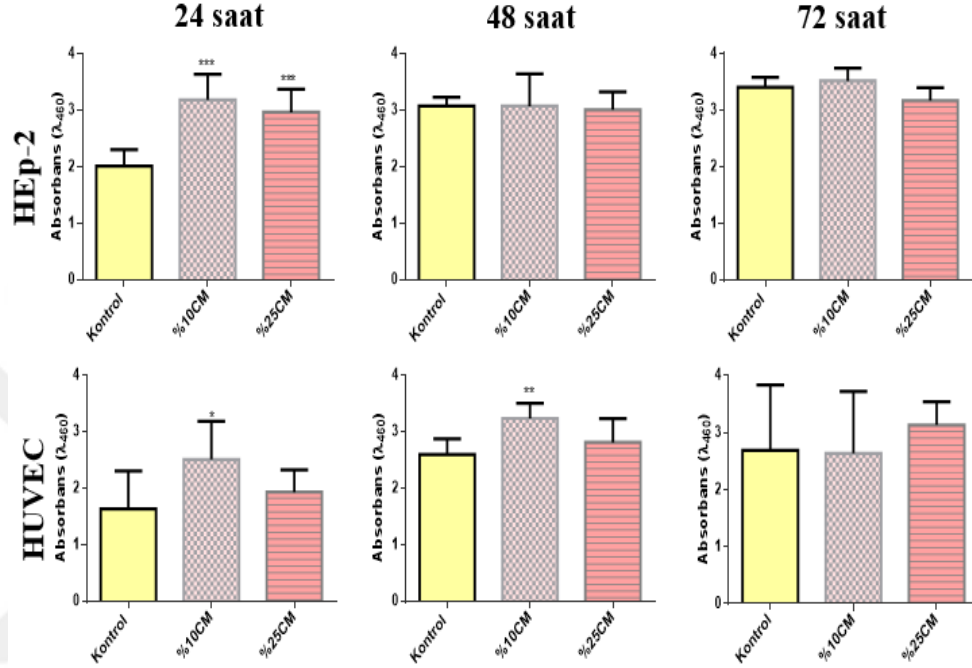
72 saatlik CM'nin kullanıldığı deneylerde; HEp2-CM'si ile 24 saatlik muamele sonucunda %10 ve %25 CM'sinin proliferatif etkisi anlamsızken; %50 ve %100 CM'sinin antiproliferatif etkisi olmuş ve anlamlı bulunmuştur (sırayla $p<0,05$ ve $p<0,01$). 48 saatlik muamele sonunda ise %10 CM'sinin proliferatif etkisi görülürken, %50, %75 ve %100 CM'ler ise anti-proliferatif etkilidir ($p<0,001$ ve $p<0,0001$). 72 saatlik muamele sonucunda ise %100 CM ($p<0,01$) hariç diğer konsantrasyonlar proliferatif etkilidir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. HUVEC hücresinin farklı süre ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış CM'lerle muamelesi sonucundaki MTT hücre proliferasyon deney sonuçları. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

Sonuçlara topluca bakılacak olursa diğer deneylerde (Tripın mavisi, Migrasyon deneyleri ve xCELLigence proliferasyon deneyleri) kullanılmak üzere uygulanacak dozun hücreler üzerine aşırı toksik etkisinin olmaması gerekmektedir. Bu durumda hem HEp-2 hem de HUVEC için 30 saatlik kültür sonrasındaki CM'nin toplanmasına ve uygun konsantrasyonun da %10 CM olmasına karar verildi. Bu sonucun konfirmasyonu için 30 saatlik CM ve %10 ve %25'lik CM'ler kullanılarak XTT deneyleri yapılmıştır.

XTT sonuçlarına göre tüm zaman dilimlerinde %10 HUVEC-CM'si, HEp-2 hücreleri için toksik değil; proliferatif etkidedir (24 saat için $p<0,001$; 48 ve 72 saat için $p>0,05$). %10 HEp-2 CM'si ise 24 saatlik ($p<0,05$) ve 48 saatlik ($p<0,01$) maruziyet için proliferatifdir; 72 saatlik maruziyet sonucunda ise kontrolle anlamlı bir fark görülmemiştir; en azından toksik değildir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. HEp-2 ve HUVEC hücrelerinin 30 saatlik ve %10 ve %25 CM konsantrasyonlarıyla muamelesi sonucundaki XTT hücre proliferasyon deney sonuçları. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

3.3.2. Tripın Mavisi Deney Sonuçları

HEp-2-CM ve HUVEC-CM ile 24 saat muamele edilen HEp-2 ve HUVEC hücrelerinin Tripın Mavisi deney sonucu hücre sayıları verilmiştir (Çizelge 3.1 ve 3.2). Bu bulguların grafiksel ifadesi de verilmiştir (Şekil 3.11). Kontrollere göre %10 ve %100 CM'lerle sağlanan indirekt ko-kültür, hem HEp-2 hem de HUVEC hücrelerinin proliferasyonunu baskılamıştır.

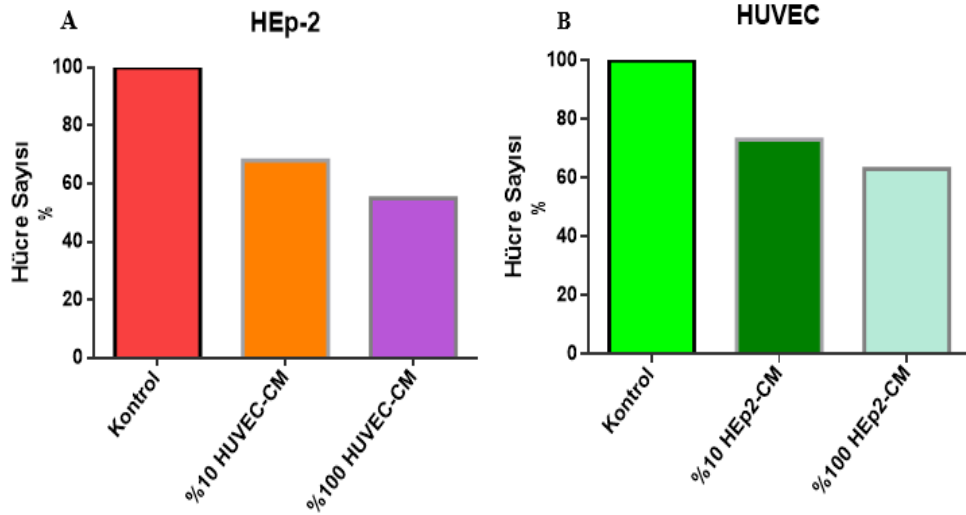
Çizelge 3.1. 24 saat HUVEC-CM'ler ile muamele edilmiş HEp-2 hücrelerinin Tripın Mavisi deneyleri sonucundaki ölü ve canlı hücre sayıları ortalamaları.

HEp-2 Hüresi	KM Canlı	KM Ölü	%10 CM Canlı	%10 CM Ölü	%100 CM Canlı	%100 CM Ölü
Ortalama	918.167	12.333	625.750	17.833	506.250	8167

Çizelge 3.2. 24 saat HEp-2-CM'ler ile muamele edilmiş HUVEC hücrelerinin Tripan Mavisi deneyleri sonucundaki ölü ve canlı hücre sayısı ortalamaları.

HUVEC Hücresi	KM Canlı	KM Ölü	%10 CM Canlı	%10 CM Ölü	%100 CM Canlı	%100 CM Ölü
Ortalama	1.253.000	13.750	914.583	20.417	791.917	27.083

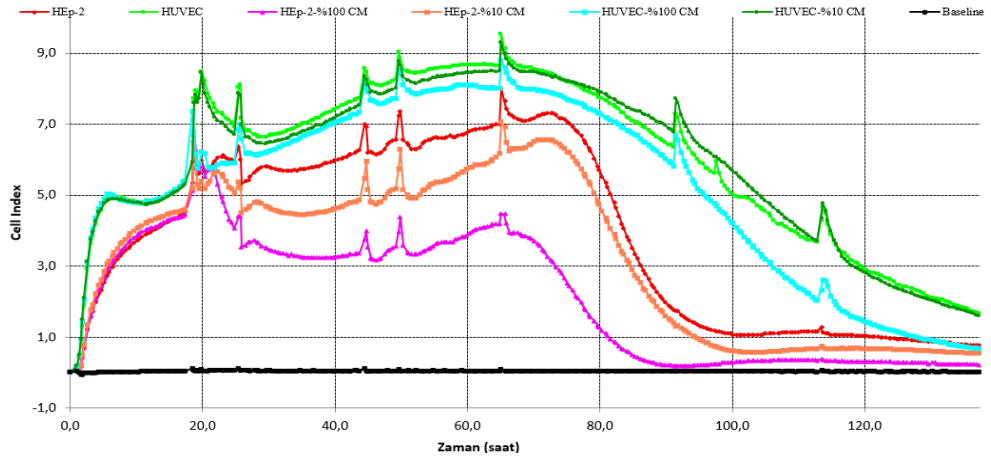
(KM: Kültür Medyumu, CM: Kondisyon Medyumu).



Şekil 3.11. 24 saat HUVEC-CM ve HEp-2-CM'ler ile muamele edilmiş HEp-2 (A) ve HUVEC (B) hücrelerinin Tripan Mavisi deneyleri sonucundaki canlı hücre yüzdelерinin grafiksel gösterimi. Deneyler en az 3'erli çalışılmıştır. * $p>0,05$; sonuçlar istatistiki olarak anlamsızdır. Kontrol hücrelerinin ölü ve canlı hücre değerleri % 100 olarak normalize edilmiştir.

3.3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Sonuçları

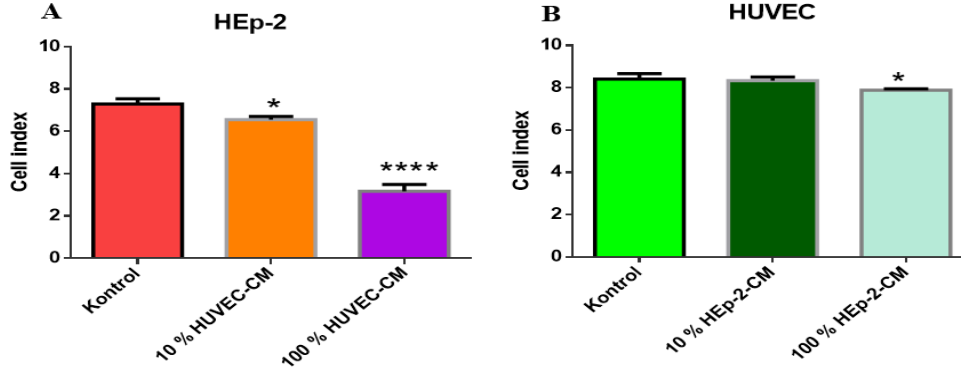
xCELLigence RTCA tarafından 120 saatten fazla, farklı ortamlardaki HEp-2 ve HUVEC hücre hatlarının hücre proliferasyon eğrileri kaydedilmiştir (Şekil 3.12). MTT/XTT deneylerinde madde eklendikten 24, 48, 72. saatlerde analiz yapılır. Bu metodlarla RTCA'yı kıyaslamak amacıyla CM'ler 25.saatte eklendiği için (25+24, 25+48, 25+72.saatlerde) CI ve 'doubling time' (iki katına çıkma süresi) bakılmıştır. Her hücre, CM'ler eklendikten yaklaşık 8.saatten sonra, toparlanıp yükselen bir grafik çizmişlerdir.



Şekil 3.12. XCELLigence RTCA tarafından 120 saatten fazla kaydedilen farklı ortamlardaki HEp-2 ve HUVEC hücre hatlarının hücre proliferasyon eğrileri. Grafikteki kısa iniş çıkışlar, CM eklenmesi ve fotoğraf çekimi için plakaların alınıp sistemin durdurulmasından kaynaklıdır. Yaklaşık 72.saatten sonra her hücrenin CI'sı düşmektedir. HUVEC grubunun (en üstteki 3 eğri) CI'sı, %10 ve %100 HEp2-CM farkı, HEp-2 grubunun %10 ve %100 HUVEC-CM'si kadar değildir; eğriler birbirine çok yakındır; bu da HEp2-CM (kanser hücre CM) etkisinin HUVEC-CM (sağlıklı hücre CM) etkisinden daha fazla olduğunu düşündürmektedir.

XCELLigence sisteminin 72.saatteki cell indeks sonuçlarına göre, %10 HUVEC-CM (CI:6,553, $p<0,05$)'ye maruz bırakılan HEp-2 hücreleri, kontrol HEp-2 hücreleri (CI:7,299) ile kıyaslandığında daha yavaş bir proliferasyon söz konusudur. Ayrıca, %100 HUVEC-CM (CI:3,168, $p<0,0001$)'ye maruz bırakılan HEp-2 hücreleri, kontrol HEp-2 hücrelerinden çok daha yavaş çoğalmıştır (Şekil 3.13 A).

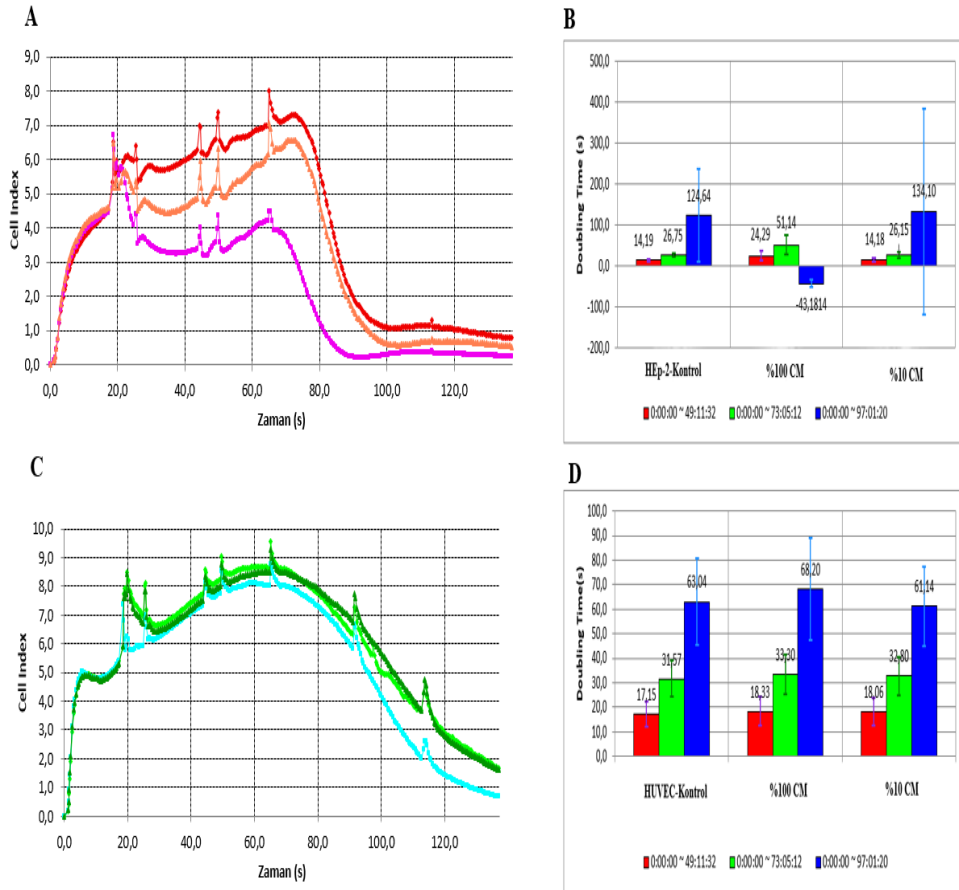
%10 HEp-2-CM (CI:8,342, $p>0,05$)'ye maruz bırakılan HUVEC hücreleri, kontrol HUVEC hücrelerinden (CI:8,411) daha az çoğalmıştır. Ayrıca, %100 HEp2-CM (CI:7,883 $p<0,05$)'ye maruz bırakılan HUVEC hücreleri, kontrol HUVEC hücrelerinden daha yavaş çoğalmıştır (Şekil 3.13 B).



Şekil 3.13. CM'lerin (% 10 ve % 100) HEp-2 (A) ve HUVEC (B) hücrelerinin proliferasyon üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Cell indeks ile ters bir ilişkisi olan doubling time üç zaman dilimindeki sonuçlara göre ise HEp-2 hücrelerinde, doubling time'ye göre de bulgular değerlendirilmiştir. 49. , 73. ve 97. saatlerdeki ortak sonuç şu şekildedir; %100 CM'ye maruz bırakılan HEp-2 hücrelerinin sayılarını artırmak için gerekli süre kontrol hücreleri için gerekli süreden daha fazladır. Ancak %10 CM'ye maruz bırakılan HEp-2 hücrelerinin sayılarını artırmak için gerekli süreyle kontrol hücreleri için gerekli süre ile hemen hemen aynıdır (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.14 B).

HUVEC hücrelerinde, doubling time'ye göre bulgular değerlendirilmiştir. 49. ve 73. saatlerdeki ortak sonuç şu şekildedir; %100 ve %10 CM'ye maruz bırakılan HUVEC hücrelerinin sayılarını artırmak için gerekli süre kontrol hücreleri için gerekli süre ile hemen hemen aynıdır. Ancak 96. saatte ise %100 CM'ye maruz bırakılan HEp-2 hücrelerinin sayılarını artırmak için gerekli süre kontrol hücreleri için gerekli süreden daha fazladır. Ancak %10 CM'ye maruz bırakılan HUVEC hücrelerinin sayılarını artırmak için gerekli süreyle kontrol hücreleri için gerekli süre ile hemen hemen aynıdır (Çizelge 3.4 ve Şekil 3.14 D).



Şekil 3.14. HEp-2 hücrelerinin (A) Cell indeks, (B) Doubling time grafikleri; HUVEC hücrelerinin (C) Cell indeks, (D) Doubling time grafikleri. Kırmızı sütun, madde eklendikten yaklaşık 24 saat sonrası; yeşil sütun madde eklendikten yaklaşık 48 saat sonrası; mavi sütun madde eklendikten yaklaşık 72 saat sonrası. Doubling time, hücre popülasyonunun iki katına çıkması için gereken süredir. Cell indeks ile doubling time arasında ters bir ilişki vardır.

Çizelge 3.3. Uygulanan CM'lerin, HEp-2 hücrelerinin iki katına çıkma süresine (Doubling Time) etkilerinin belirlenmesi.

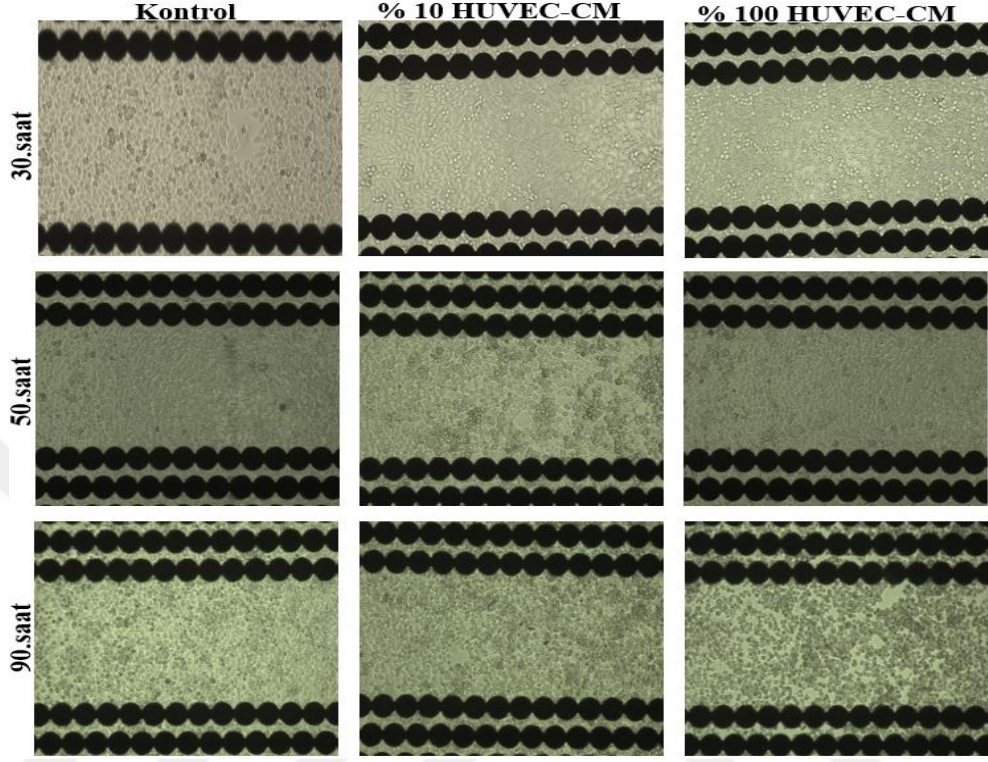
Zaman Aralığı: 0:00:00 ~ 49:11:32			0:00:00 ~ 73:05:12		0:00:00 ~ 97:01:20	
Kuyu	Doubling Time(s)	SD	Doubling Time(s)	SD	Doubling Time(s)	SD
HEp-2	14,19	3,28	26,75	5,15	124,64	126,91
%100 CM	24,29	11,84	51,14	23,11	-43,18	8,20
%10 CM	14,18	4,84	26,15	7,05	134,10	361,90

Çizelge 3.4. Uygulanan CM'lerin, HUVEC hücrelerinin iki katına çıkma süresine (Doubling Time) etkilerinin belirlenmesi.

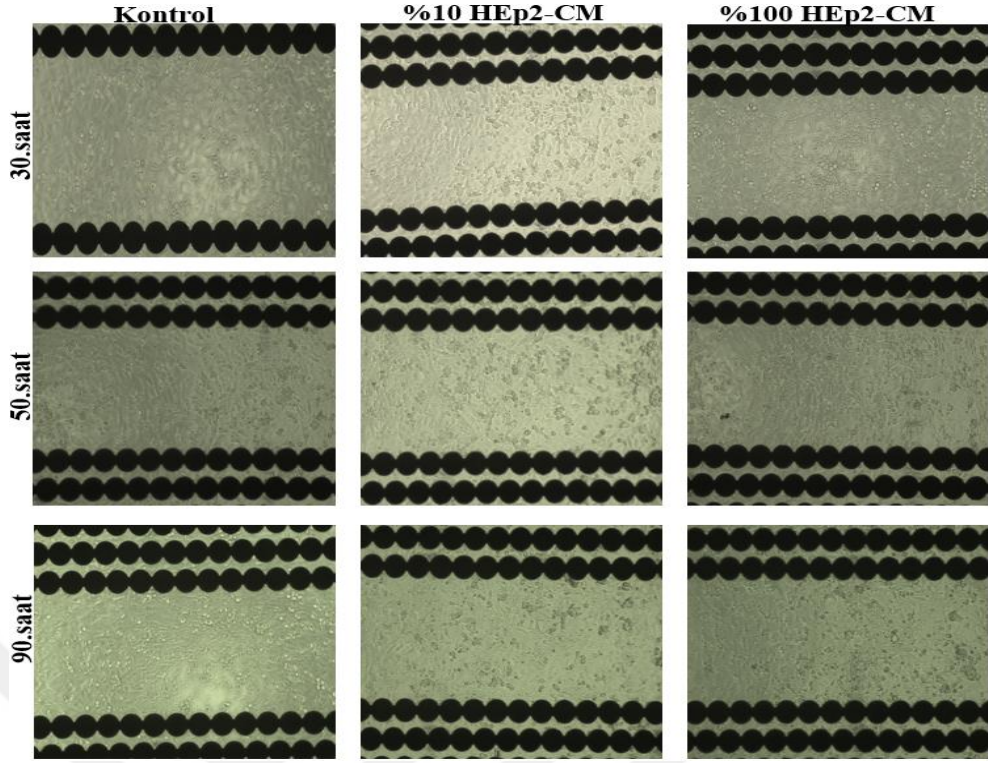
Zaman Aralığı: 0:00:00 ~ 49:11:32			0:00:00 ~ 73:05:12		0:00:00 ~ 97:01:20	
Kuyu	Doubling Time(s)	SD	Doubling Time(s)	SD	Doubling Time(s)	SD
HUVEC	17,15	5,06	31,57	7,46	63,04	17,77
%100 CM	18,33	5,76	33,30	8,20	68,20	20,75
%10 CM	18,06	5,57	32,80	7,92	61,14	16,10

HEp-2 ve HUVEC hücre hatlarının hücre proliferasyon eğrileri xCELLigence RTCA tarafından otomatik kaydedilirken, sistemden plakayı çıkarıp invert mikroskopta belirli saatlerde hücrelerin fotoğrafları da çekildi. Şekil 3.14'te 30. (CM

ile yaklaşık 6 saatlik maruziyeti), 50. (CM ile yaklaşık 24 saatlik maruziyet) ve 90. (CM ile yaklaşık 72 saatlik maruziyeti) saatlerdeki fotoğraflar görünmektedir (Şekil 3.15 ve 3.16). Proliferasyon eğrileri ile morfolojik görüntüleri kıyaslandı.



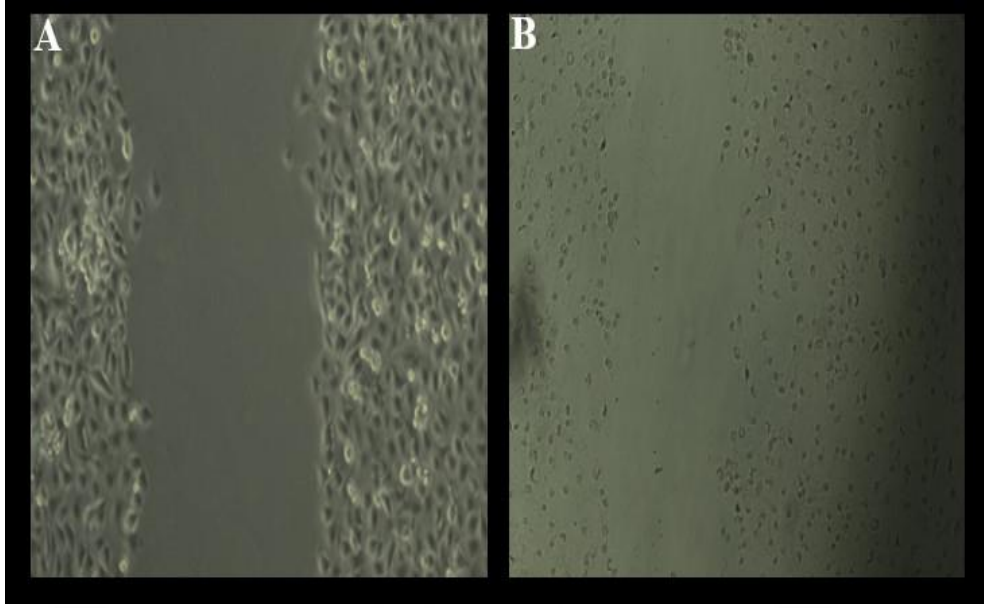
Şekil 3.15. E-plaka (view)'lardaki HEp-2 hücrelerinin belirli saatlerdeki ve CM'lerde invert mikroskop görüntüleri(10x).



Şekil 3.16. E-plaka (view)'lardaki HUVEC hücrelerinin belirli saatlerde ve CM'lerde invert mikroskop görüntüleri (10x).

3.4.Migrasyon Deneý Sonuçları

Migrasyon/Göç analizi için wound healing (strach assay) migrasyon deneyi kullanılmıştır. İlk önce 12 well plakalarda, daha sonra 24 well plakalarda deneyler yapılmıştır. 12 well plakada ve az sayıda hücre ile çalışınca protokol gereği pipet ucuyla çizim sonrası, çizilen alana yakın hücrelerin strese girip kalktığı veya mutsuzlaştığı gözlenince (Şekil 3.17), 24 well plakalarda ve daha fazla sayıda hücre ile deneylerin devamına karar verildi.



Şekil 3.17. Migrasyon deneyinde pipet ucuyla çizim sonrası (A) 24 well plakadaki HUVEC hücreleri (B) 12 well plakada strese giren HUVEC hücreleri (10x).

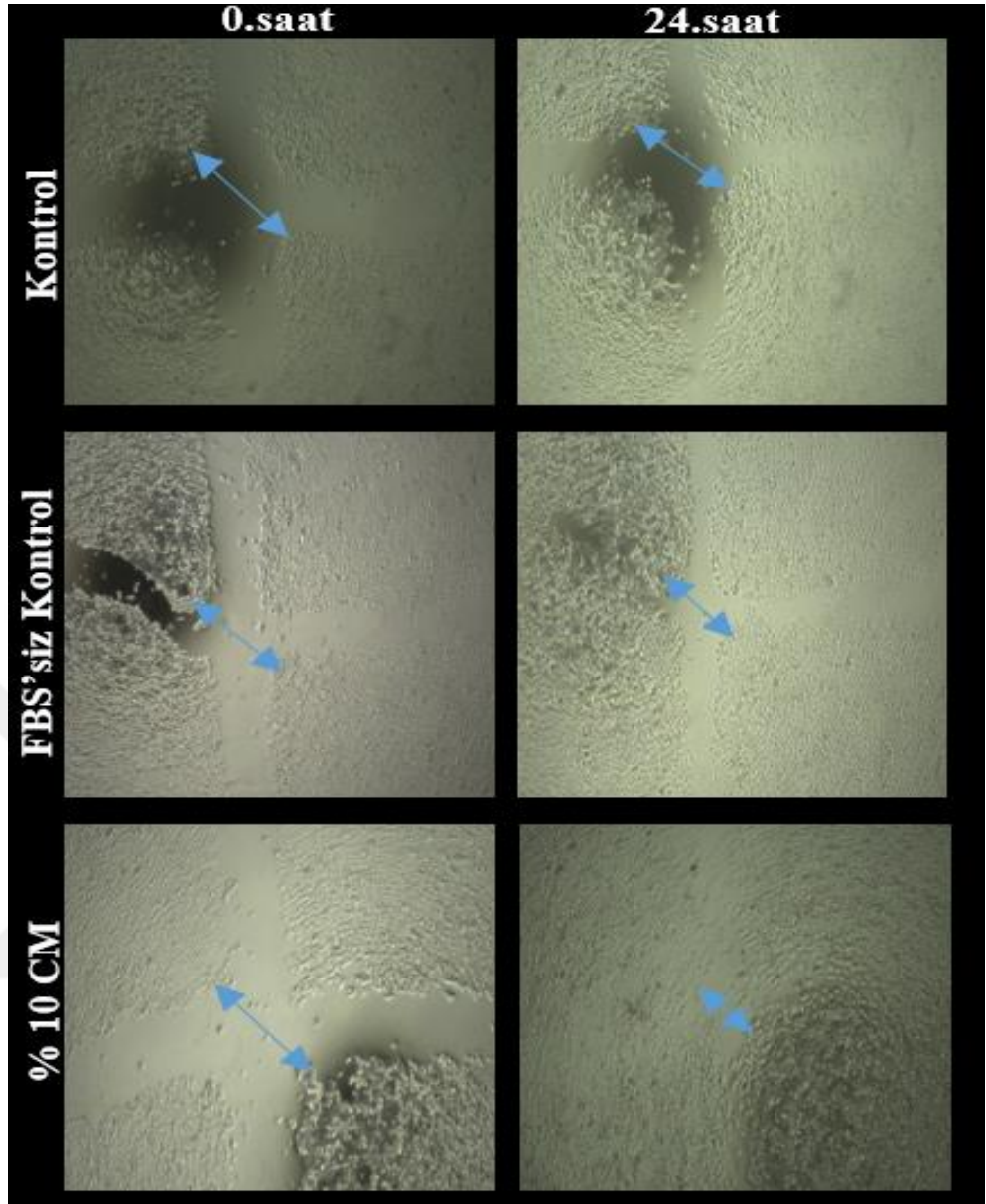
Yara kapanma deneyinde, pipetle açılan yara “hücre göçünden dolayı mı yoksa proliferasyondan dolayı mı kapanıyor” şüphesini ortadan kaldırmak için proliferasyon inhibitörü (Mitomysin C) kullanıldı. Mitomisin uygulanmış ve mitomisin uygulanmamış olan deney gruplarında yaranın kapanma hızındaki farklılık net olarak görülmektedir (Şekil 3.18). Mitomycin C ile hücrelerin proliferasyonu baskılanmış ve bu gruplarda yaranın kapanma tek sebebi hücre göçü olmuştur. Diğer deney grubunda ise Mitomycin C uygulanmamıştır ve yara kapanma sebebi hem proliferasyon hem de göç kaynaklıdır. Deneye genel olarak bakılıp deney grupları kontrollerle kıyaslandığında Mitomycin C uygulamasının, nihai sonucu (nispi sıralamayı) etkilemediği görülmüştür (%10 CM uygulanmış hücreler, Mitomysin C uygulansa da uygulanmasa da %100 KM'den ve %0 FBS'den daha erken kapanmaktadır) (Şekil 3.21).



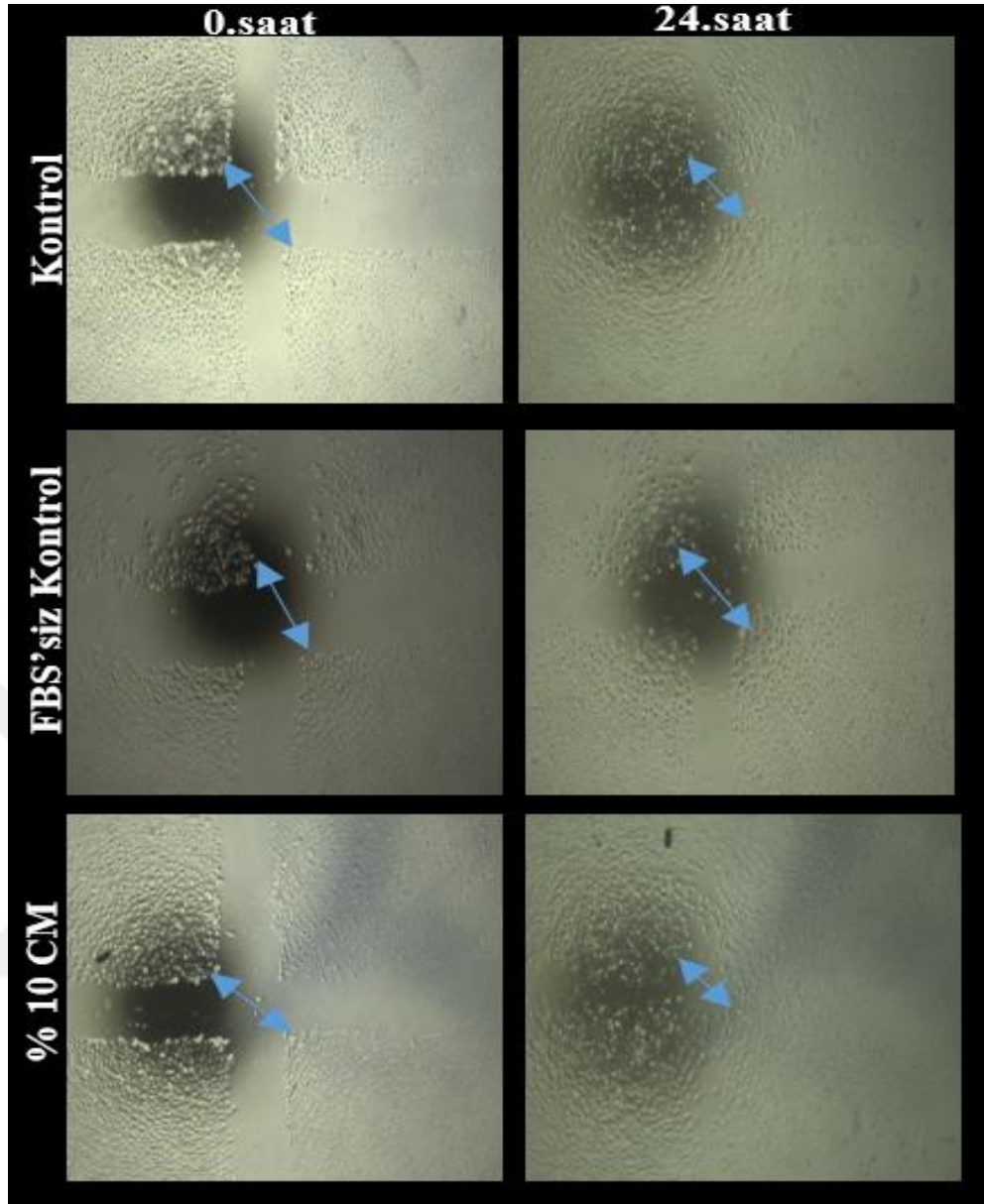
Şekil 3.18. Migrasyon deneyi 48. Saatteki HUVEC hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü (10x). Sağda Mitomycin C uygulanmış, solda Mitomycin C uygulanmamış hücreler. Mitomycin C uygulanmamış hücrelerde kapanan yara alanı, diğerine nispetle daha fazladır.

HUVEC-CM'de kültüre edilen HEp-2 hücrelerinin, sadece kültür ortamında (KM) ve serumsuz medyumda (%0 FBS) kültüre edilen HEp-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında, göç ve hareketlilik için daha fazla kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir. %100 CM'nin, %50 CM'den; %50 CM'nin de %25 CM'ye göre; %25 CM'nin de %10 CM'ye göre migrasyona etkisi daha fazla olmuştur (Şekil 3.19, 3.21 A).

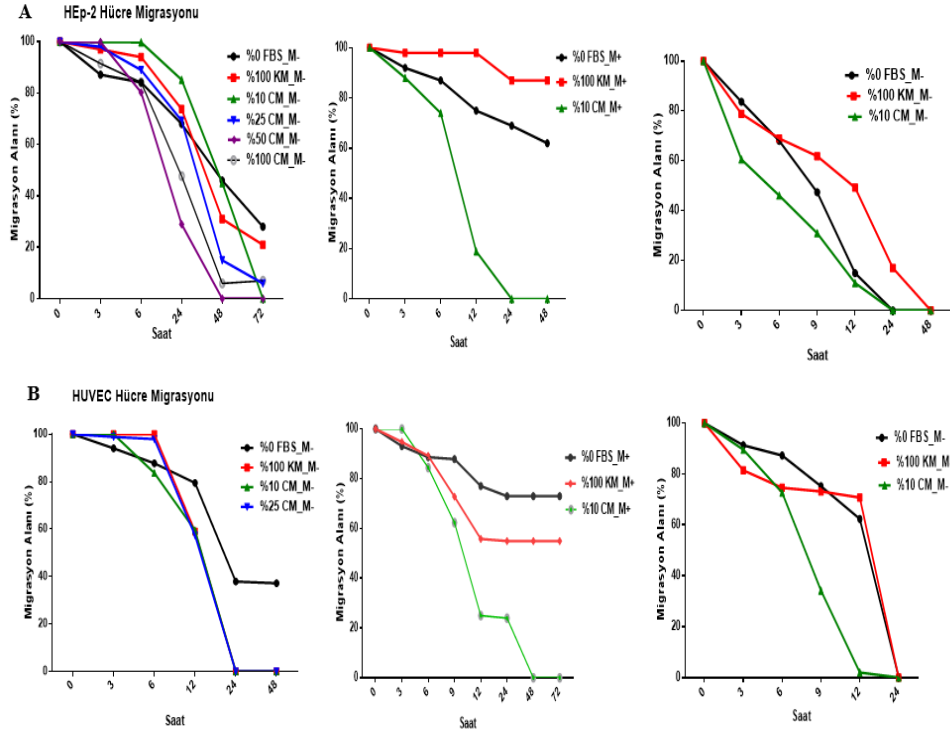
HEp2-CM'de kültüre edilen HUVEC hücrelerinin, sadece kültür ortamında ve serumsuz medyumda yetiştirilen HEp-2 hücreleri ile karşılaştırıldığında, göç ve hareketlilik için daha fazla kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir. %25 CM'nin %10 CM'ye göre migrasyona etkisi daha fazla olmuştur (Şekil 3.20, 3.21 B).



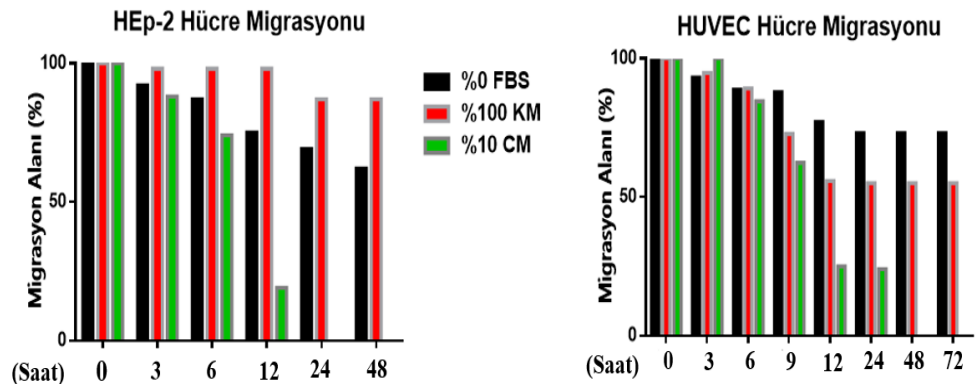
Şekil 3.19. HEP-2 hücrelerinin farklı ortamlardaki migrasyon paternleri.



Şekil 3.20. HUVEC hücrelerinin farklı ortamlardaki migrasyon paternleri.



Şekil 3.21. (A) %10 HUVEC-CM'nin, kontroller olan kültür medyumunda (KM) ve FBS'siz kültür medyumundaki (%0 FBS) hücelere kıyasla HEP-2 hücre migrasyonu üzerindeki etkisi. Mitomycin C'nin varlığında (M+) ve Mitomycin C'nin yokluğunda (M-) deneyler yapıldı. %10 CM'nin yanı sıra %25 CM, %50 CM ve %100 CM etkisine de bakılmıştır. **(B)** %10 HEP2-CM'nin, kontroller olan kültür medyumunda (KM) ve FBS'siz kültür medyumundaki (%0 FBS) hücelere kıyasla HUVEC hücre migrasyonu üzerindeki etkisi. Mitomycin C'nin varlığında (M+) ve Mitomycin C'nin yokluğunda (M-) deneyler yapıldı. %10 CM'nin yanı sıra %25 CM'nin etkisine de bakılmıştır. HEP2-CM'nin, HUVEC hücresi üzerine tesiri öldürücü olduğundan %50 CM ve %100 CM deneylerine devam edilememiştir.



Şekil 3.22. HEP-2 ve HUVEC hücrelerinin Mitomycin C varlığında migrasyon deney sonucu (Şekil 3.21'deki mitomisinli grafiğin dönüştürülmüş halidir).

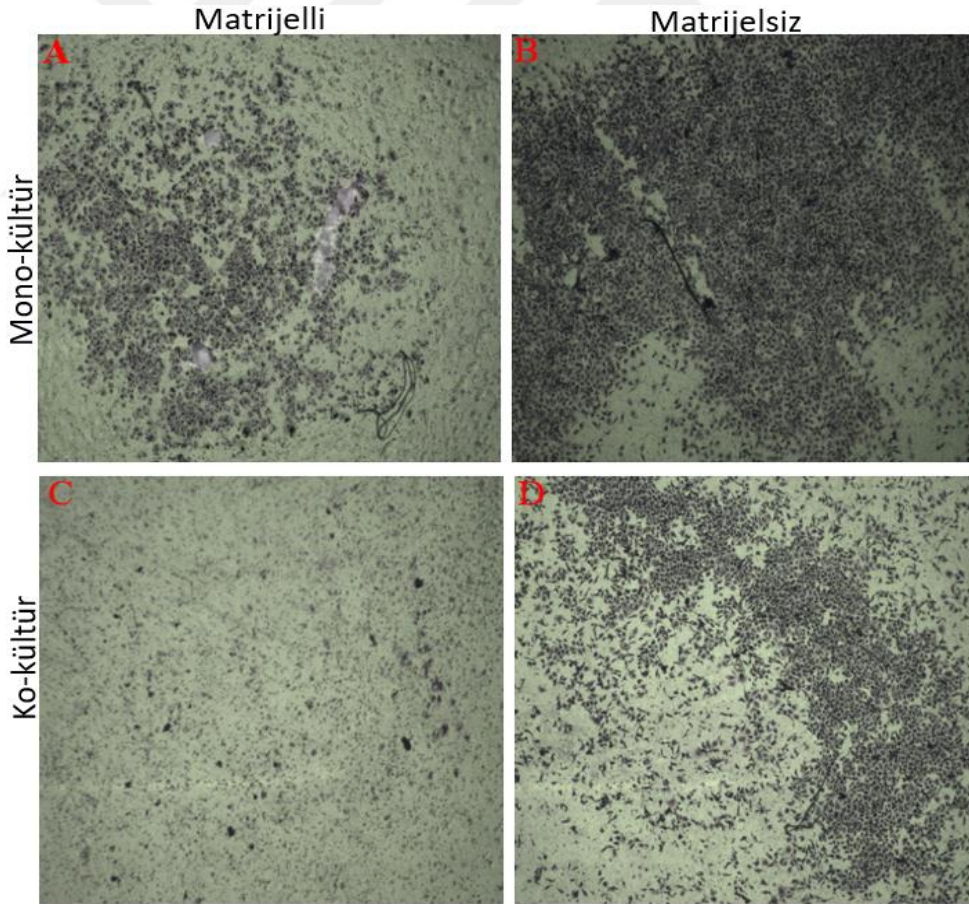
3.5.İnvazyon Deney Sonuçları

İnvazyon deneyleri 6 kere yapılmış olup sonuçlar invazyon yüzdesi şeklinde hesaplanmıştır (Çizelge 3.5).

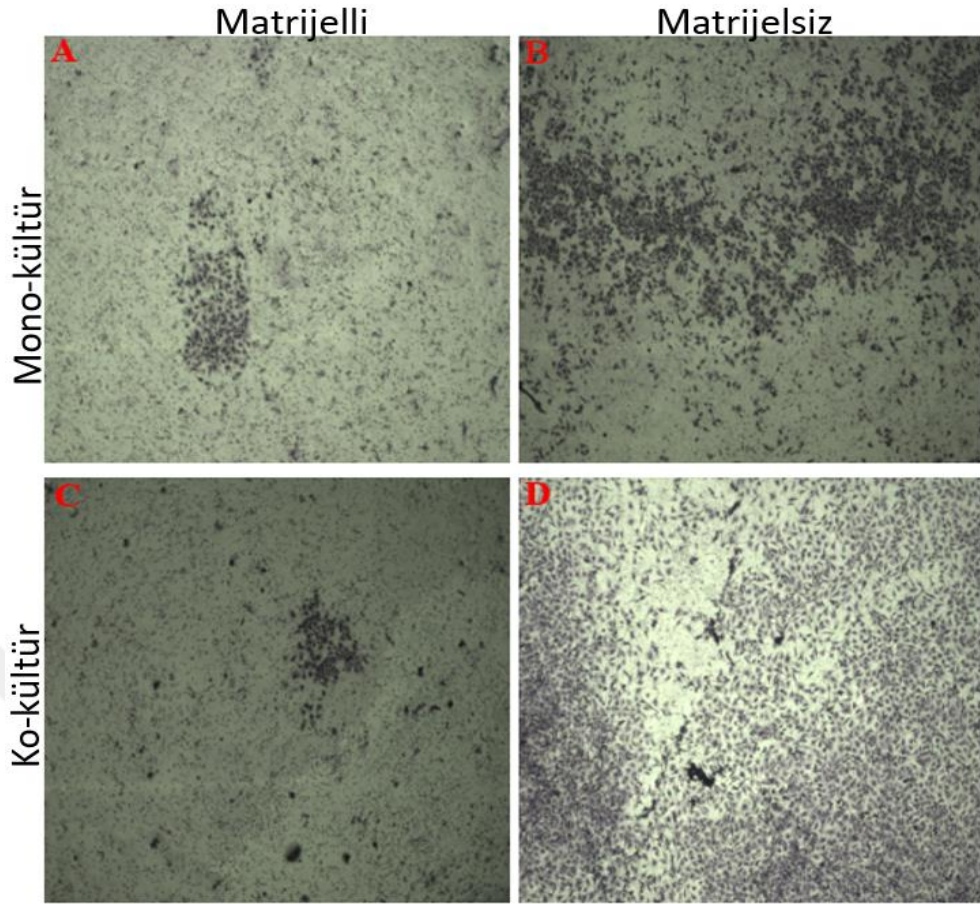
Çizelge 3.5. İnvazyon deneylerinin invazyon yüzde sonuçları

	Deney1 (%)	Deney2 (%)	Deney3 (%)	Deney4 (%)	Deney5 (%)	Deney6 (%)	Ortalama (%)
HEp-2-Kontrol	37.0	43.2	15.84	30.2	43	30.2	33.24
HEp-2-Ko-kültür	1.4	2.2	7.3	30.0	38.0	23.2	17.01
HUVEC-Kontrol	3.4	5.2	30.0	33.5	10.0	6.7	14.80
HUVEC-Ko-kültür	13.8	10.01	53.5	47.6	15.7	13.2	25.64

Transwell chamberdaki boyama sonrası invazyon yapmış HEp-2 hücrelerinin (Şekil 3.23) ve HUVEC hücrelerinin (Şekil 3.24) invert mikroskop görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3.23. Transwell chamberdaki boyama sonrası invazyon yapmış HEp-2 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri (10x).

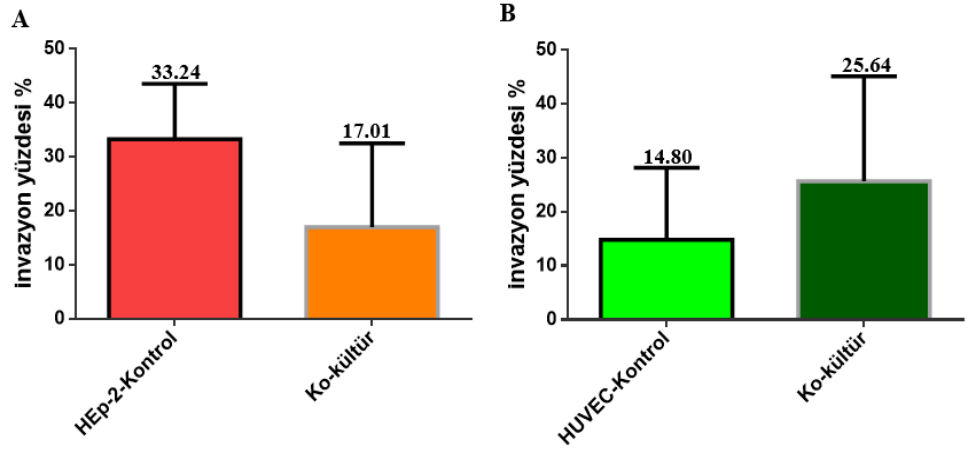


Şekil 3.24. Transwell chamberdaki boyama sonrası invazyon yapmış HUVEC hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri (10x).

Transwell chamberlardaki HUVEC ile ko-kültürü yapılmış HEp-2 hücreleri (%17,01), mono-kültür HEp-2 hücrelerine (% 33,24) kıyasla daha az invazyon yapmıştır ($p>0,05$, Şekil 3.25 A).

Buna karşılık, transwell chamberlardaki HEp-2 ile ko-kültürü yapılmış HUVEC hücreleri (%25,64), mono-kültür HUVEC hücrelerine (%14,80) kıyasla daha fazla invazyon göstermiştir ($p>0,05$, Şekil 3.25 B).

İnvazyon analizine göre, sağlıklı hücreler (HUVEC hücreleri), invazyonu baskılayarak HEp-2 hücrelerinin malin aktivitelerini sınırlandırmıştır. Öte yandan, kanser hücreleri (HEp-2 hücreleri), invazyonu teşvik ederek HUVEC hücrelerinin malin aktivitelerini artırmıştır.

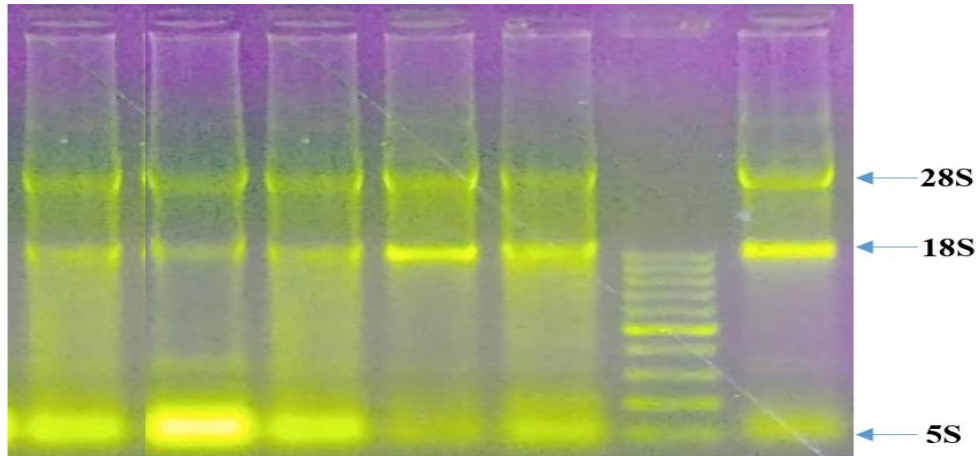


Şekil 3.25. (A) HUVEC ko-kültürdeki HEP-2 ve (B) HEP-2 ko-kültürdeki HUVEC hücre hatları ile invazyon grafiği. Veriler, kontrollere ve ko-kültürlü hücre hatlarına kıyasla invazyon yüzdesini göstermektedir ($p > 0.05$).

3.6.Gen Ekspresyon Sonuçları

3.6.1. Hücre Hatlarından RNA İzolasyonu

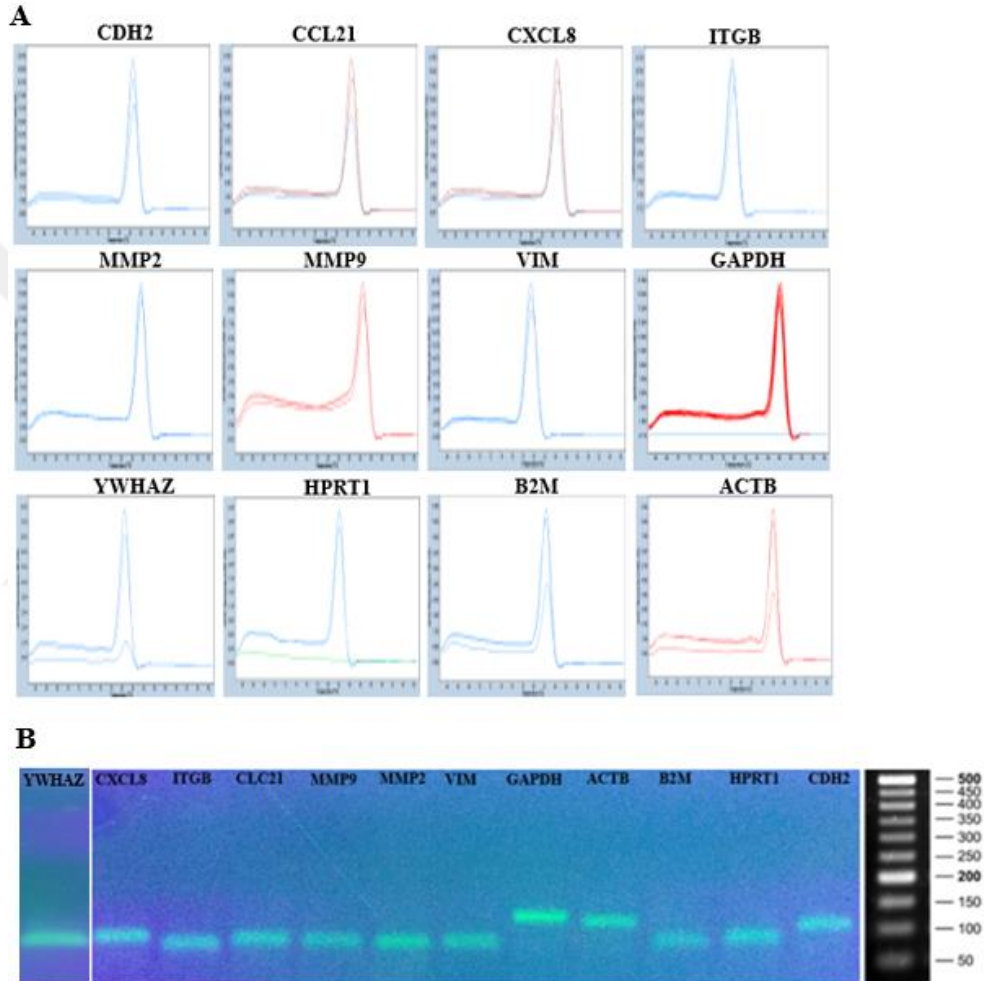
Hücre kültürlerinden trizol yöntemi ile araştırmada kullanılacak kalitede tüm RNA'lar elde edildi. Beklenen 18S ve 28S ribosomal RNA bantları gözlemlendi (Şekil 3.26). Ancak RNA örneklerinde az miktarda da olsa gDNA kontaminasyonu olabileceğinden; bu problemin önüne geçmek amacıyla RNA örnekleri DNase-I enzimi ile muamele edilerek genomik DNA'nın eliminasyonu sağlandı.



Şekil 3.26. Örneklerin agaroz RNA jel görüntüsü. Soldan sağa sırayla HUVEC-uzun süreli ko-kültür, HEP-2-kontrol, HEP-2-uzun süreli ko-kültür, HUVEC kısa süreli ko-kültür, HUVEC-kontrol, 100bp'lik marker, HEP-2 kısa süreli ko-kültür RNA'ları.

3.6.2. cDNA Eldesi ve Kontrolü

Çalışmada kullanılan tüm genlerle (*CDH2*, *CCL21*, *CXCL8*, *ITGB*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM*, *YWHAZ*) yapılan RT-qPCR sonucunda çıkan ürünler, %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve ethidium bromide (EtBr) ile boyanarak UV altında değerlendirildi. Ayrıca her gene ait eğrime eğrisi analizleri RT-qPCR reaksiyonlarının spesifikliğini kontrol etmek için yapılmıştır (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. Primerlerin ve amplicon uzunluklarının özgüllüğü. (A) %2 agaroz jel elektroforezi kullanılarak fragmentlerin çoğaltılması; primerlerin amplifikasyon ürünlerinin beklenen boyutta olduğunu ve primer dimerlerinin olmadığını göstermiştir. (B) Genlerin her biri için tek erime eğrisi ve her amplifikasyon reaksiyonunda bir tek pik elde edildiği görülmektedir. Jelin en sağında 50 bp'lik marker görülmektedir.

3.6.3. Primer Etkinlikleri

Herbir genin primer dilüsyonundan RT-qPZR ile elde edilen Cq değerleri kullanılarak primerlerin etkinliği $10^{-(1/E_{\text{Eğim}})}$ formülü ile hesaplandı (Çizelge 3.7).

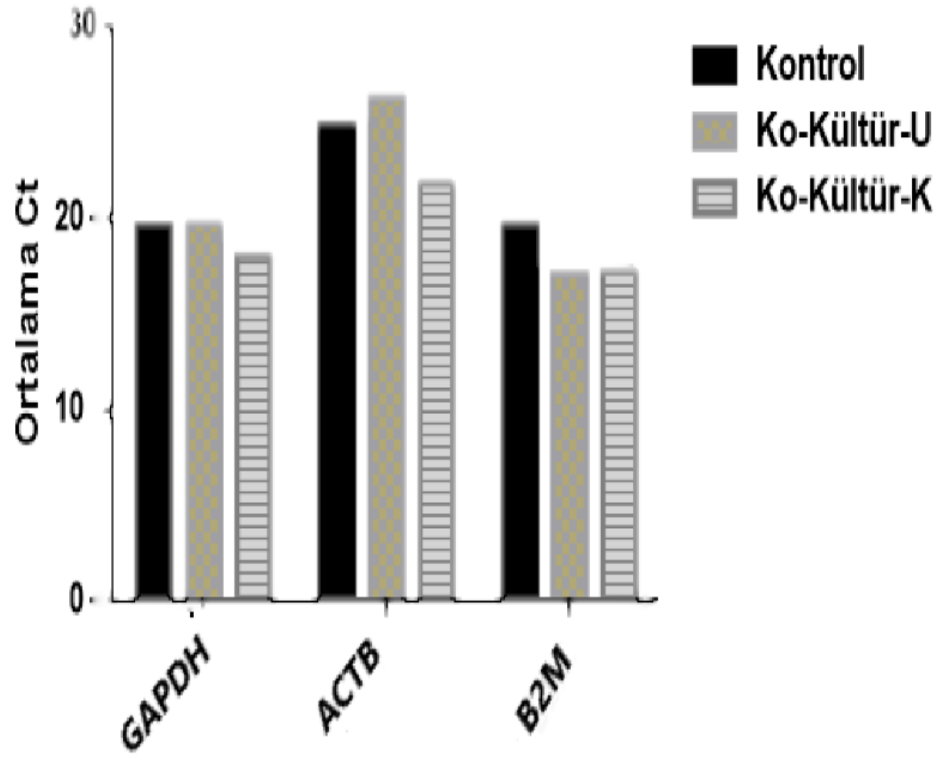
Çizelge 3.7. Primer etkinliklerinin denklemleri ve değerleri.

Gen	Formül	Eğim	E
CDH2	$10^{-(1/-3,8880)}$	-3,8880	1,810
CCL21	$10^{-(1/-3,2754)}$	-3,2754	2,020
CXCL8	$10^{-(1/-3,8368)}$	-3,8368	1,823
ITGB	$10^{-(1/-3,7604)}$	-3,7604	1,845
MMP2	$10^{-(1/-3,2023)}$	-3,2023	2,053
MMP9	$10^{-(1/-3,6242)}$	-3,6242	1,890
VIM	$10^{-(1/-3,4249)}$	-3,4249	1,959
YWHAZ	$10^{-(1/-3,4249)}$	-3,5611	1,910
GAPDH	$10^{-(1/-3,8501)}$	-3,8501	1,820

*Eğim; Lineer denklemin eğimi ($y=mx+b$), E; primer etkinliği.

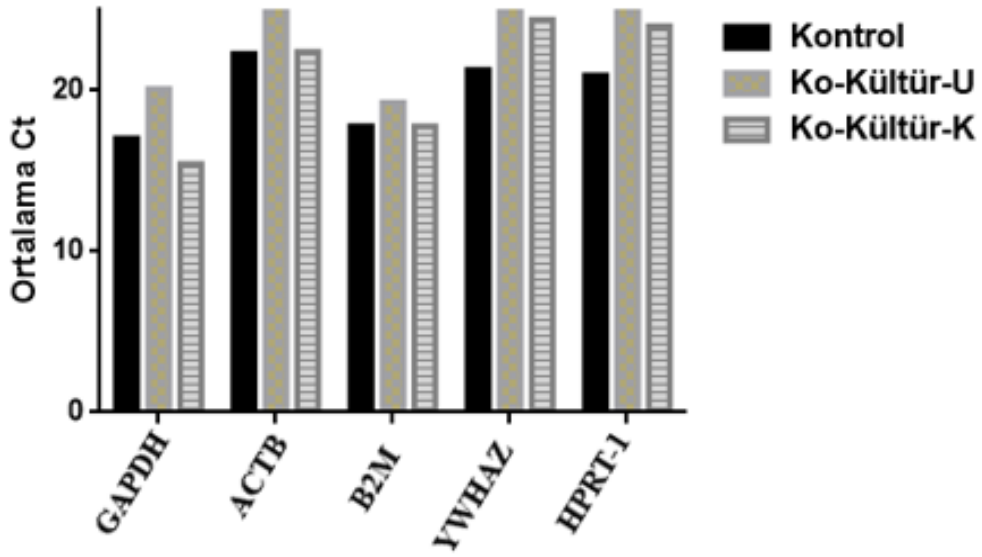
3.6.4. Referans Gen Seçimi Sonuçları:

Çalışmadaki HEp-2 hücre grubu için kullanılan referans genlerden kontrol olan mono-kültür HEp-2, kısa süreli ko-kültür ve uzun süreli ko-kültür şartları altında nispeten en stabil gen olarak GAPDH'nin referans gen olarak kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.28).



Şekil 3.28. Hep-2 hücresi ve deney gruplarındaki aday referans genlerin ortalama Ct değerleri. Kontrol, mono-kültür HEp-2 hücresinin mRNA'sının; Ko-kültür-U, HEp-2 hücresinin HUVEC hücresi ile uzun süreli (21 gün) indirekt ko-kültür indüklü mRNA'sının; Ko-kültür-K, HEp-2 hücresinin HUVEC hücresi ile kısa süreli (24 saat) indirekt ko-kültür indüklü mRNA'sının Ct'lerini ifade etmektedir.

Çalışmadaki HUVEC hücre grubu için kullanılan referans genlerden kontrol olan mono-kültür HUVEC, kısa süreli ko-kültür ve uzun süreli ko-kültür şartları altında nispeten en stabil gen olarak B2M'nin referans gen olarak kullanılmasına karar verildi (Şekil 3.29).



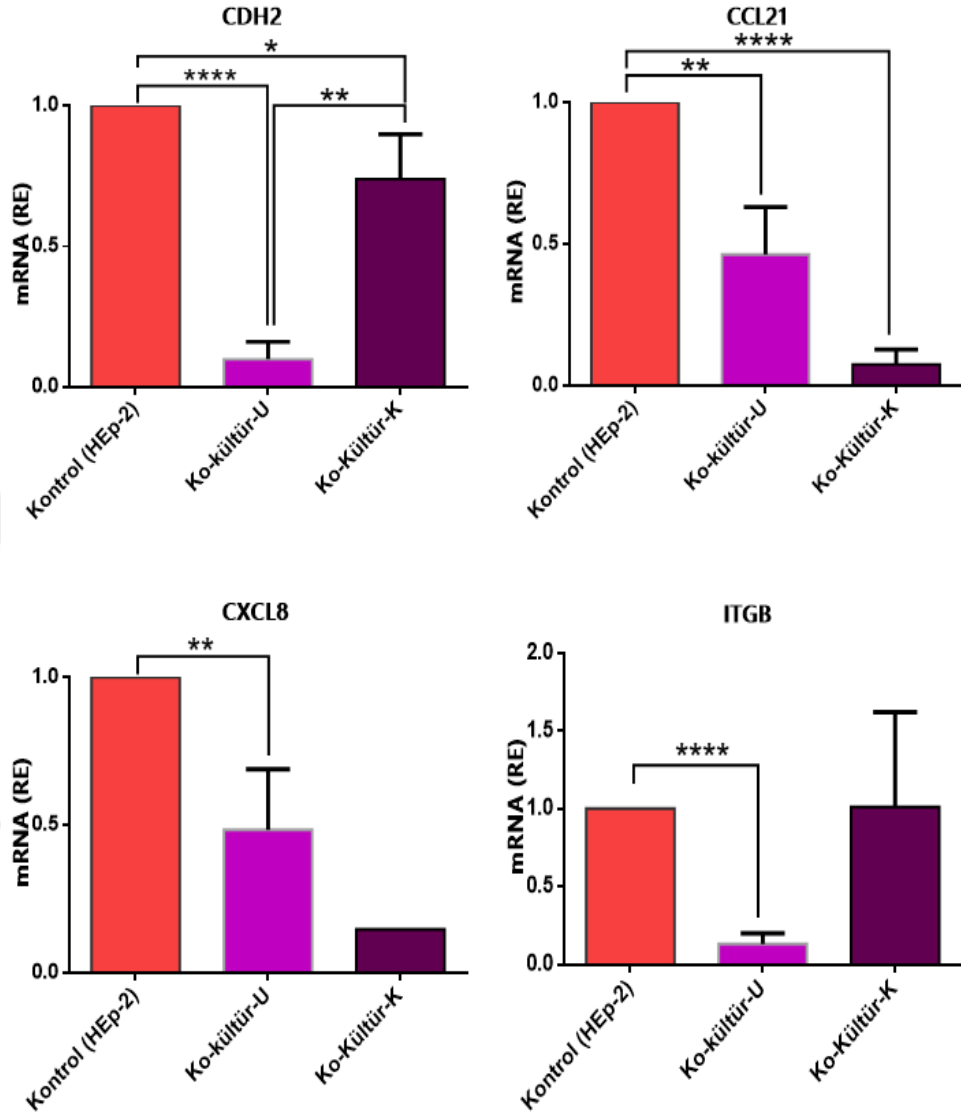
Şekil 3.29. HUVEC hücresi ve deney gruplarındaki aday referans genlerin ortalama Ct değerleri. Kontrol, mono-kültür HUVEC hücresinin mRNA'sının; Ko-kültür-U, HUVEC hücresinin HEp-2 hücresi ile uzun süreli (21 gün) indirekt ko-kültür indüklü mRNA'sının; Ko-kültür-K, HUVEC hücresinin HEp-2 ile kısa süreli (24 saat) indirekt ko-kültür indüklü mRNA'larının Ct'lerini ifade etmektedir.

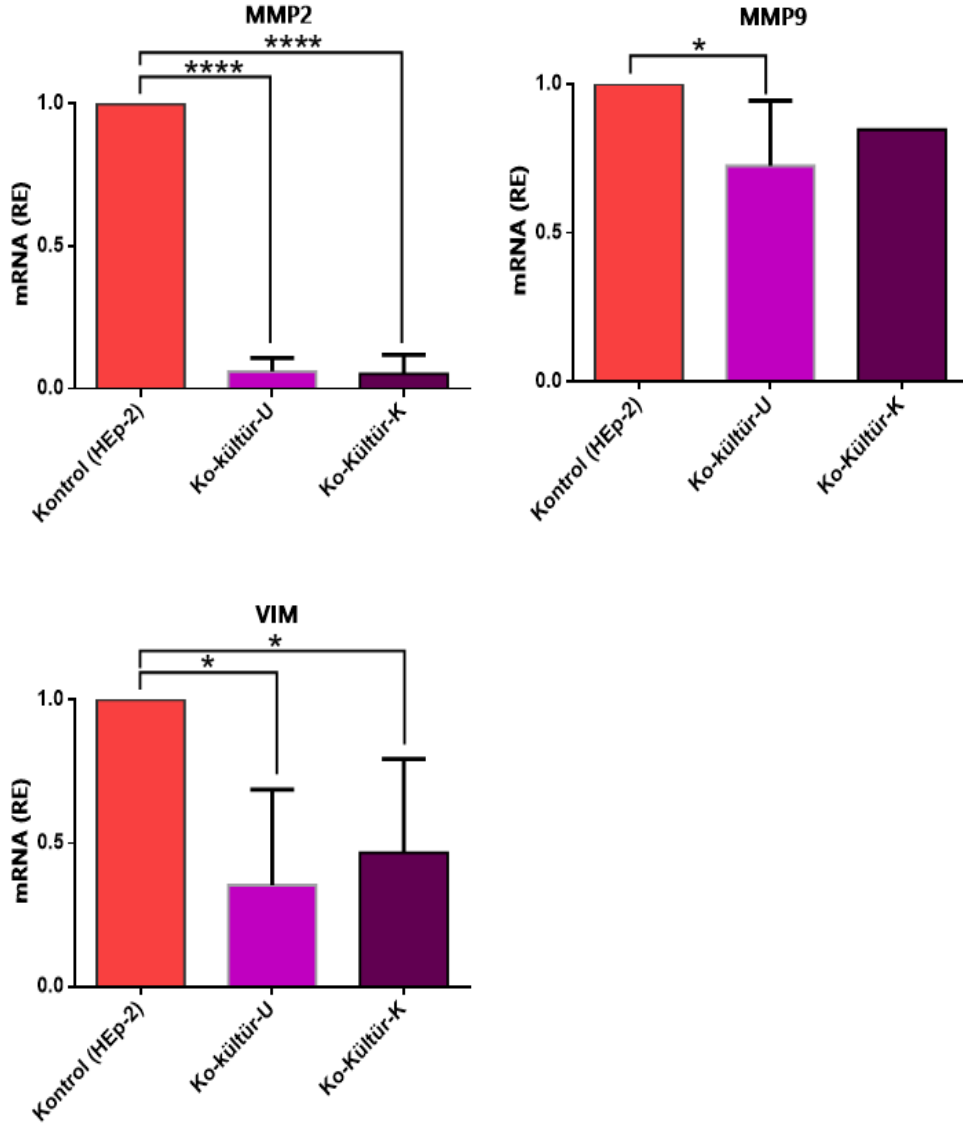
3.6.5. Hedef Genlerin mRNA Ekspresyonunun Optimizasyonu ve Analizi

Uygun referans gen seçimi yapıldıktan sonra seçilen genlerin (*CDH2*, *CLC21*, *CXCL8*, *ITGB*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM*) qRT-PZR ile kontrol grubu olan mono-kültürler ve deney grubu olan uzun (Ko-kültür-U) ve kısa süreli indirekt ko-kültürlerle (Ko-kültür-K) ekspresyon düzeylerine bakıldı. Ekspresyon düzeyleri incelenen bu genlerin qRT-PZR amplifikasyon eğrileri Ek-F'de verilmiştir. RT-qPZR'de yapılan analizlerde gen ekspresyon miktarları relative expression (RE) (nispi ifade) yöntemi kullanılarak belirlendi.

Birinci araştırmada HEp-2 hücresi ve bunun HUVEC-CM'si ile uzun süreli ve kısa süreli indirekt ko-kültür grupları karşılaştırılmıştır. Buna göre Ko-kültür-U'daki *CDH2*, *ITGB* ve *MMP2* ekspresyonları ($p < 0,0001$), *CCL21* ve *CXCL8* ekspresyonları ($p < 0,01$), *MMP9* ve *VIM* ekspresyonları ($p < 0,05$) kontrole kıyasla önemli derecede azalmıştır. Ayrıca Ko-kültür-K'daki *CCL21* ve *MMP2* ekspresyonları ($p < 0,0001$), *CDH2* ekspresyonu ($p < 0,01$), *VIM* ekspresyonu ($p < 0,05$) kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde azalmıştır. Ko-kültür-K'daki *CXCL8*, *ITGB* ve *MMP9* ekspresyonları da kontrole kıyasla azalmıştır ancak anlamlı bir azalma bulunamamıştır. Yalnızca *CDH2*

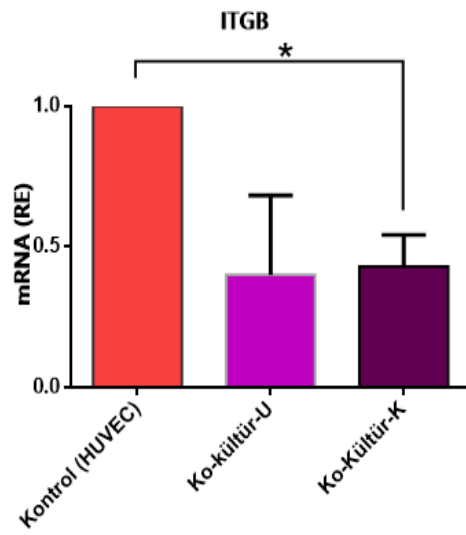
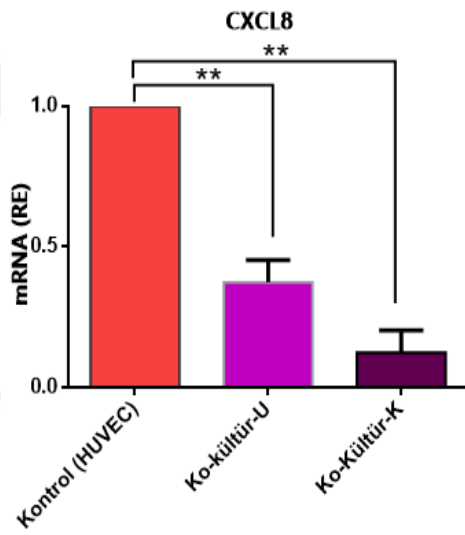
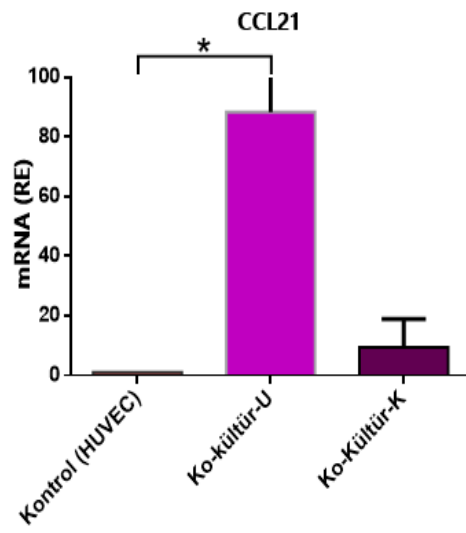
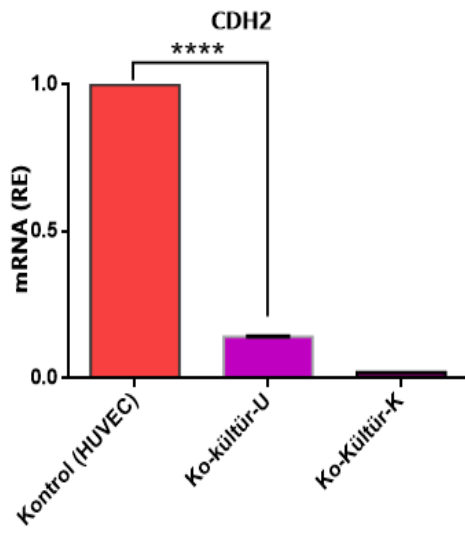
gen ekspresyonu için Ko-kültür-U ve Ko-kültür-K arasında anlamlı bir ilişki den bahsedilebilir (($P < 0.01$) (Şekil 3.30).

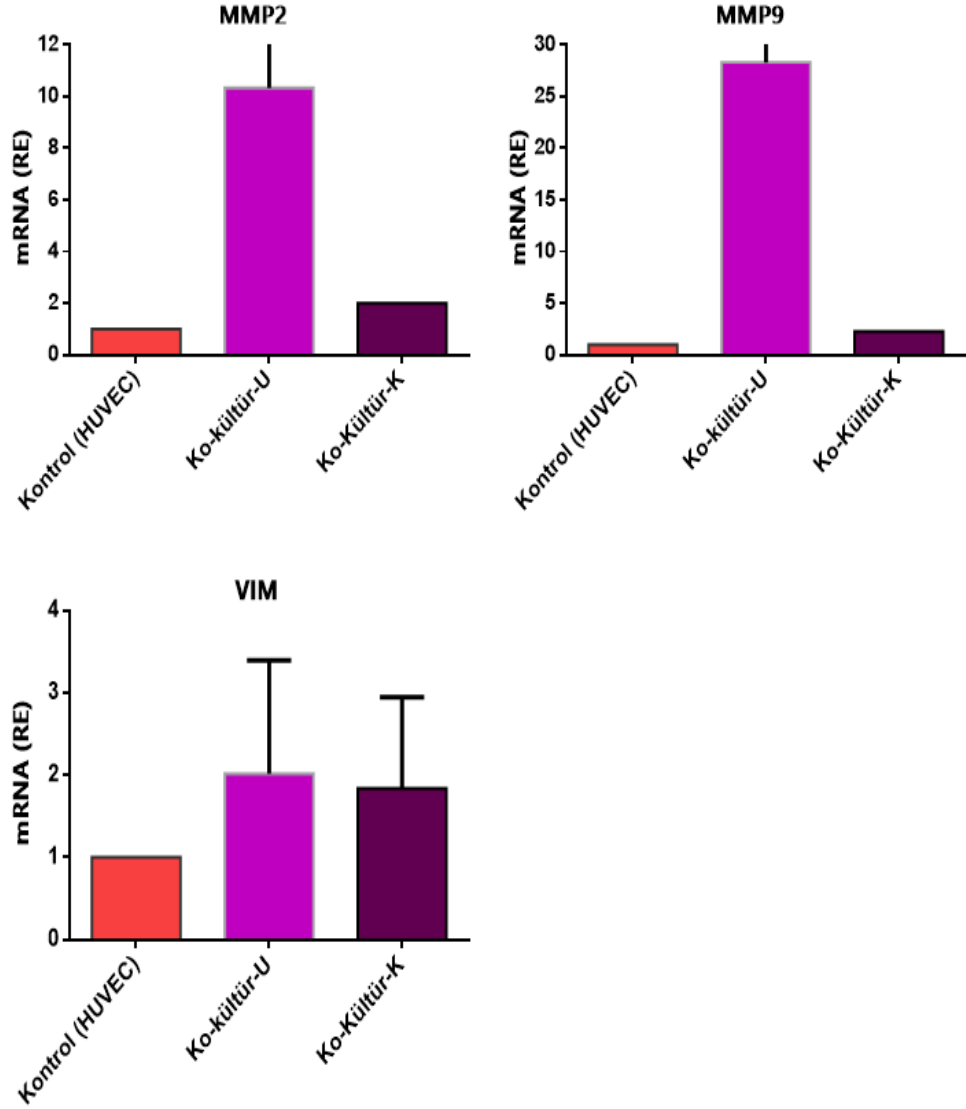




Şekil 3.30. *CDH2*, *CLC21*, *CXCL8*, *ITGB*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM* genlerinin ekspresyonlarının mono-kültür HEp-2 (kontrol)'e göre uzun süreli ko-kültür (Ko-kültür-U) ve kısa süreli ko-kültür (Ko-kültür-K) gruplarının arasındaki nispi değişim miktarı. RE: Nispi ekspresyon miktarı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

İkinci araştırmada HUVEC hücresi ve bunun HEp-2-CM'si ile uzun süreli ve kısa süreli indirekt ko-kültür grupları karşılaştırılmıştır. Buna göre hem Ko-kültür-U hem de Ko-kültür-K'daki *CDH2*, *CXCL8* ve *ITGB* ekspresyonları kontrole kıyasla azalırken; hem Ko-kültür-U hem de Ko-kültür-K'daki *CCL21*, *MMP2*, *MMP9* ve *VIM* ekspresyonları kontrole kıyasla artmıştır. Bunlardan Ko-kültür-U'daki *CCL21* ekspresyonunun kontrole kıyasla yaklaşık 85 kat anlamlı arttığı bulunmuştur (* $P < 0.05$). Ko-kültür-K'daki *CCL21* ekspresyonunun ise kontrole kıyasla yaklaşık 9 kat arttığı bulunmuştur ($p > 0,5$). Ko-kültür-U'daki *MMP2* ekspresyonunun kontrole kıyasla yaklaşık 10 kat arttığı bulunmuştur ($p > 0,5$) (Şekil 3.31).





Şekil 3.31. *CDH2*, *CLC21*, *CXCL8*, *ITGB*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM* genlerinin ekspresyonlarının mono-kültür HUVEC'e (kontrol) göre uzun süreli ko-kültür (Ko-kültür-U) ve kısa süreli ko-kültür (Ko-kültür-K) gruplarının arasındaki nispi değişim miktarı. RE: Nispi ekspresyon miktarı. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4. TARTIŞMA

Mevcut çalışmada larinks kanser hücreleri HEp-2 ve tümör mikroçevre elemanlarından endotel hücreleri HUVEC arasındaki ilişki araştırılmıştır. Hem tümör hem de sağlıklı hücrelerdeki mikroçevrenin etkisinin analiz edilmesi ve hücrel ve moleküler değişikliklerin araştırılarak BBSHK'nın patogenezinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Endotel hücrelerinin tümör hücrelerine; tümör hücrelerinin de endotel hücrelerine etkileri ayrı ayrı değerlendirilerek, mikroçevrenin kanser progresyonuna etkisi araştırılmıştır.

Mevcut çalışmada hem iki boyutlu hem de üç boyutlu ko-kültür modelleri kullanıldı. Bu bağlamda ilginç bir gözlem, hayvan modellerinde toksisite göstermeyen, ancak bazı hastalarda ciddi hepatotoksisite nedeniyle pazardan çekilmesi gereken ilaç troglitazonunun hepatotoksitesidir (Kaplowitz 2005). Bir başka çalışmada mono ve ko-kültür yapılmış karaciğer ve bağışıklık hücrelerinin bulunduğu *in vitro* bir modelde, troglitazon, ko-kültürlerde her iki hücre tipindeki tek kültürden daha yüksek bir sitotoksositeye neden olmuştur (Edling ve ark 2009). Bu sebeple *in vitro* ko-kültür hücre modelleri kullanmak çalışmaların sonucunu daha güvenilir yapacaktır.

Mevcut çalışmada proliferasyon, migrasyon ve gen ekspresyon deneyleri için iki boyutlu; invazyon deneyi için üç boyutlu modeller kullanılmıştır. Üç boyutlu ko-kültür için transwell chamberlara matrijel koyularak model oluşturulmuştur. Kullanılan matrigel matrisi; ECM benzeri bir yapı olmak üzere laminin, kollajen IV, heparin sülfat proteoglikanlar, entaktin/nidojen ve birkaç büyüme faktörü dahil olmak üzere hücre dışı matris proteinleri bakımından zengin bir tümör olan Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare sarkomundan ekstre edilen çözündürülmüş bir bazal membran preparatıdır (Kleinman ve ark 1982). Bir insan hücresi, matrijel tabakasının üstüne yerleştirildiğinde hücreler normal epitel yapısını andıran bir yapıyla sonuçlanan morfogenetik bir programa maruz kalırlar (Muthuswamy ve ark 2001).

Literatürde bazı ko-kültür çalışmalarında -nadir de olsa- kullanılacak medyum seçimi için ön çalışmalar yapılmıştır. Örneğin mezenkimal kök hücre (MSC) ve HUVEC ile yapılan ko-kültür çalışmasında uygun medyum seçimi için yapılan ön çalışmalarda DMEM+M199 mixture (1:1)'i uygun bulmuşlardır (Bidarra ve ark 2011).

Lakin mevcut çalışmada HEp-2 ve HUVEC için bu tarz ön çalışmaya gerek duyulmamıştır; bu iki hücre hattı hem mono-kültürde hem de ko-kültürde DMEM'e uyum göstererek gerekli yaşam şartlarını sergilemişlerdir.

İndirekt ko-kültür kurulması için belirli zamanlarda hücrelerden kondisyon medyumunu toplanarak metot kısmında anlatıldığı üzere belirli bir prosedürle CM hazırlanmıştır. Literatürde, CM toplama zamanı ile ilgili prosedürlerde değişkenlik göstermektedir. Örneğin hDPSC-CM'si (İnsan dental pulp stromal hücresi/dental pulp fibroblast-CM) ile kurulan ko-kültür çalışmasında 48 saatlik CM toplanmıştır. Ayrıca uygun seyreltmelerle (%25 ve %50) CM hazırlanmıştır (Gharaei ve ark 2018). Adiposit (3T3-L1) ve meme kanseri hücreleri (4T1) ile yapılan indirekt ko-kültür çalışması için 24 saatlik %10, %25, %50 ve %75'lik CM hazırlanmıştır. Ko-kültür çalışma süresi 48 saat olarak belirlenmiştir. (Hsieh ve Huang 2016). Mevcut çalışmada ise literatür gözönünde bulundurularak 24, 48 ve 72 saatlik CM ile denemeler yaparak 30 saatlik CM ile deneylere devam etmeye karar verilmiştir. Zira CM çözünür faktörlerin bir kokteyli olarak bir çeşit "kara kutu"dur ve hangi büyüme faktörlerinin hangi konsantrasyonlarda salgılandığı bilinmemektedir. Ayrıca işlevi bilinmeyen birçok küçük molekül medyumda bulunabilir ve hücre büyümesi üzerinde de olumlu/olumsuz etkileri olabilir. Bu sebeple ayrıca 30 saatlik CM'den %10, %25, %50, %75 ve %100 CM'ler hazırlanarak deneyler yapılmıştır.

Mevcut çalışmadaki hipotezimiz, kanser hücreleriyle ko-kültürü yapılan stroma hücrelerinin (endotel hücrelerinin) kanserle ilişkili bir fenotip ve genotipe kayacağı/evrileceği/transformasyonunu araştırmaktır. Bunu ispatlamak için yapılan deneylerden migrasyon ve invazyon beklenildiği gibi ko-kültür ortamında artmış, kanser progresyonuyla ilişkili genlerden bir kısmının da (*CCL21*, *MMP2*, *MMP9* ve *VIM*) ekspresyonu artmıştır. Proliferasyon testlerinden ise MTT/XTT beklentimizle uyumlu çıkacak şekilde ko-kültür ortamında hücre proliferasyonu artarken; tripan mavisi deneyi ve RTCA analizinde ise hücre proliferasyonu azalmıştır. Ayrıca diğer hipotezimiz, stroma hücreleriyle ko-kültürü yapılan kanser hücrelerinin de kanser progresyonunun artacağı yönünde idi. Bunu ispatlamak için yapılan deneylerde proliferasyon deneylerinden MTT/XTT ve migrasyon deneyi beklentimizi karşılarken, invazyon ve gen ekspresyon sonuçları beklentimizin aksi doğrultuda çıkmıştır. Bunun üzerine sağlıklı hücrelerle yapılan indirekt ko-kültürün kanser hücrelerini

baskılabileceği şeklinde bir değerlendirme yapılmıştır. Bu bulgumuz, Iacopino ve ark'larının çalışmasıyla kısmen uyumludur. Ayrıca normal gastrik stromal hücreler ile direkt ko-kültür yaptıkları çalışmada da stromal hücrelerin kanser hücresi büyümesi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Iacopino ve ark 2012).

Bazı uygulamalar için, farklı hücre populasyonları, bazen karma kültür (*mixed culture*) olarak da adlandırılan doğrudan temas (direkt ko-kültür) halinde olmalıdır. Fizyolojik davranışı korumak için genellikle memeli dokusunda ve diğer ökaryotik hücre kültürlerinde doğrudan temas gerekir (van der Meer ve ark 2013). Benzer şekilde, enfeksiyon ve invazyon deneyleri de çalışmanın amacı nedeniyle doğrudan temas gerekir (Lindén ve ark 2007). Sonuç olarak, bir hücre-hücre temaslı ko-kültür modeli, *in vivo* duruma anatomik olarak daha yakındır (Malina ve ark 2009). Mevcut çalışmada fizyolojik davranışı koruma amacıyla morfoloji analizi için direkt ko-kültür modeli kullanılmıştır. Bunun için projedeki iki hücre tipinin (endotel hücreleri ve kanser hücreleri) fiziksel olarak bağlantılı olduğu sistem kuruldu. Bu ko-kültürün amacı, endotel hücreleri ve kanser hücreleri aynı ortamda iken birbirlerini nasıl etkilediklerini morfolojik olarak gözlemlemektir. Endotel hücreleri, kültür kabının tabanına ekilerek HUVEC tabakası (HUVEC monolayer) oluşturuldu. Buna göre HUVEC hücreleri, HEp-2 ile ko-kültürde tabanı tamamen kapladıkları için belirgin bir morfolojik değişim gözlemlendi.

Mono-kültürde GFP-HEp-2 hücreleri ise yuvarlağımsı bir formda olup koloni halinde çoğalmayı seçerken; HUVEC ile ko-kültürde ise GFP-HEp-2 hücreleri tek tek çoğalmayı seçmiş ve mekik şekline dönüşmüşler; invazyon potansiyelini gösteren uzamış çıkıntılar sergilemişlerdir. Bu morfoloji, 120 saatlik ko-kültürden sonra da devam etmiştir. GFP-HEp-2 hücrelerinde bu tip bir organizasyonun bulunması, ko-kültür sisteminin mikroçevredeki modifikasyonlardan dolayı morfolojik bir yeniden düzenlemeye işaret etmektedir. Bu nihayetinde, hücre temasının yeniden düzenlenmesine ve mikroçevredeki çözünebilir (*soluble*) maddelerin değişen ekspresyonlarıyla ilişkilendirilebilir. Akciğer kanser hücre hattı (A549) ve makrofaj hücre hattı (RAW264.7) ile oluşturulan ko-kültür çalışmasında da direkt ko-kültür kurulmuş ve mevcut çalışma ile benzer sonuçlar rapor edilmiştir. A549- hücreleri, RAW264.7 hücreleri ile ko-kültürden sonra daha dağılmış (*scattered*) ve iğ şeklinde (*spindle*) morfoloji göstermiştir (Li ve Tai 2013). Kanser hücrelerinin benzer

morfolojik değişimi göstermesinin sebebi A549 ve HEp-2 hücrelerinin epitel kaynaklı olmasıyla ilişkili olabilir.

HEp-2 hücrelerinin morfolojisine dair bu veriler mevcut çalışmanın tümör migrasyon sonuçları ile uyumlu; ancak invazyon bulgularıyla uyumlu değildir. İndirekt ko-kültür sonucuna göre HEp-2 hücrelerinin invazifliği azalmıştır. Bu uyumsuzluğun, direkt ko-kültür ile indirekt ko-kültür arasındaki kültür şartlarıyla ilgili olabileceği düşünölmektedir.

Ayrıca ko-kültürdeki GFP-HEp-2 hücrelerinin, mono kültür GFP-HEp-2 hücrelerine göre proliferasyonları yavaşlamıştır. Işık mikroskopundaki morfolojik gözlemlerimiz, direkt ko-kültürde HUVEC hücrelerinin HEp-2 hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı yönündedir. Bu durum, ortamda bulunan yüksek düzeyde bir apoptotik ve antimitojenik proteinlerin varlığı ile açıklanabilir. Ancak CM transferi ile sağlanan indirekt ko-kültür şartlarında ise uygulanan proliferasyon testine göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. MTT ve XTT sonuçlarına göre HUVEC-CM'si, HEp-2 hücrelerinin proliferasyonunu artırırken, tripan mavisi deneyine göre proliferasyonu azalmakta, RTCA deneyine göre ise anlamlı bir fark görülmemektedir. Sonuçların farklılığı kullanılan testlerin mahiyeti ve hassasiyetleriyle ilgili olabileceği düşünölmüştür.

Gerçek zamanlı analizlerden mevcut çalışmada da kullanılan RTCA sistemi (xCELLigence, ACEA Biosciences, San Diego, CA) tipik olarak düzenli aralıklarla görüntü yakalayabilmekte ve proliferasyonun bir ölçü birimi (cell index-CI) olarak hem hücresel yüzey alanını hem de hücresel proliferasyonun göstergelerinden biri olan hücresel yapışma mukavemetini de elektriksel empedans kullanarak ölçebilmektedir. RTCA'da hücre popülasyonu sürekli olarak izlendiğinden, müdahale olmadan hücrelerde herhangi bir değişiklik veya dalgalanma kaydedilmektedir. Son nokta (*endpoint* hücre canlılık deneyleri) yaklaşımlarından farklı olarak; gerçek zamanlı test sistemleri, bir deneyin tüm zamanı boyunca hücresel büyümenin izlenmesine izin vermektedir. Bu, özellikle hassas büyüme önleyici etkilerin kolayca fark edilebildiğı ancak *endpoint* temelli yöntemler kullanılarak gözden kaçabileceği sitostatik bileşiklerin (hücre büyümesini inhibe eden) etkisini değerlendirmek için uygun olmaktadır (Single ve ark 2015). Singel ve ark., meme kanseri hücre hattında (MCF10A), öldürücü ilaç değerlendirme çalışmalarında her bir yaklaşımın etkinliğini

karşılaştırmak için üç *endpoint* deneyi (resazurin indirgeme, CellTiter-Glo ve çekirdek sayımı) ve iki gerçek zamanlı test (IncuCyte ve xCELLigence) kullanmışlardır. Bu çalışmada her iki metabolik-temelli yaklaşım (resazurin azalmasının ve CellTiter), MCF10A hücre hattındaki her üç ilaç konsantrasyonu için çekirdek sayma yaklaşımından önemli ölçüde daha yüksek canlılık vermiştir, bu da *endpoint* deneylerinde, hücre canlılığının aşırı olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın bulguları, mevcut çalışmamızla uyumlu çıkmıştır; gerçek zamanlı hücre analiz sistemleri ve çekirdek sayma yöntemi deneyinin sitotoksitesisi, *endpoint* deneylerinin sitotoksitesisinden daha fazla çıkmıştır. Mevcut çalışmada da kullanılan *end-point* testleri (MTT ve XTT) bulguları, gerçek zamanlı hücre analiz sisteminin bulgularından (RTCA) daha az sitotoksik bulunmuştur. Bu durum da hassas büyüme önleyici faktörlerin etkisinin RTCA ile kolayca fark edilebileceği; ancak *endpoint* temelli yöntemler kullanıldığında gözden kaçabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bununla beraber direkt hücre canlılığını ölçen çekirdek sayma yönteminin (örneğin tripan mavisi deneyi) en doğru yöntem olduğu düşünülmektedir (Chan ve ark 2013) ancak metabolik temelli deneylerin kullanım kolaylığı, yüksek verimli ilaç taramalarında MTT/XTT gibi metabolizma temelli testlerin yaygın olarak kullanımını sağlamaktadır (Single ve ark 2015). Buna göre mevcut çalışmadaki tripan mavisi ve RTCA analiz bulgularının; MTT ile XTT deneylerinin de birbiriyle uyumlu olmasını ayrıca tripan mavisi ve RTCA sonuçlarının; MTT/XTT sonuçlarından daha fazla sitotoksik bulunmasının, bu testlerin mahiyeti ve hassasiyetlerine bağlı olduğu şeklinde değerlendirilmektedir. Ayrıca, Single ve ark, gerçek zamanlı sistemlerin son nokta analizleri ile kombine kullanılmasının, tek başına hücre kültürlerinde ilaç toksisitesini değerlendirmek için daha etkili bir araç sağlayarak, her bir yaklaşımın yol açtığı dezavantajları hafiflettiğini göstermişlerdir (Single ve ark 2015). Bunlara ek olarak, daha küçük bir deteksiyon limiti, bir deney boyunca deney içi kopyalar arasında gözlenen zamana bağlı değişkenlik artışını açıklayabilir. Hücre kültürü temelli deneylerden elde edilen veriler; hücre sayımı, pipetleme, kemotaktik faktörlerin hazırlanması ve genel hücre kültürü kullanımı ile ilgili bireyler arası farklılığa bağlı olabilir. Sonuç olarak, bir deneyin hazırlanması sırasındaki küçük farklar, teknik kopyalar arasındaki sinyal farklılıklarına yol açabilir ve bu, bir alandaki hesaplama veya OD ölçümü ile karşılaştırıldığında, bu değişkenliği saptamayan bir deneyde zamanla artan varyasyonlara yansıtacaktır (Limame ve ark 2012).

Mevcut çalışmada ise HUVEC ile yapılan indirekt ko-kültür sonucunda, kanser hücrelerinin kısmen proliferasyonunu (kullanılan teste göre bulguların değişkenliği yukarıda izah edilmiştir) ve migrasyonunu artırmıştır; ancak invazyonunu baskılamıştır. Ayrıca Ding ve ark'larının 'artmış migrasyon ve invazyon kapasitelerine her zaman artan proliferasyon bulgusu eşlik eder (Ding ve ark 2016) sonucu ve genelmesiyle de çelişmektedir bulgularımız. Bununla beraber literatürde belirtilen kanser stromal hücreleri kanserin ilerlemesinde, büyümesinde ve yayılmasında kritik rol oynamasına rağmen (Li ve ark 2012), sonuçlarımız stromal hücrelerin kanser hücresi invazyon üzerindeki etkisinin kanser hücrelerinin tipine özgü olabileceğini göstermektedir. Aynı çalışmada ayrıca HUVEC'lerde neo-vaskülatüre benzeyen ağ benzeri yapıların oluşumu dahil morfogenetik değişiklikleri içeren fenotipik değişiklikleri desteklediği de gösterilmiştir (Khodarev ve ark 2003). Mevcut çalışmada ise HEp-2 ile ko-kültüre edilen HUVEC hücrelerinde morfolojik bir değişim gözlenmemiştir. Bulgulardaki bu farklılık, yine farklı hücreler ve farklı kültür şartlarıyla ilgili olabilir.

Tümör hücrelerinin, endotel hücrelerle direkt etkileşimi sonucu hücrel etkileşimleri artıran çözünebilir faktörleri salgılayarak; endotelyal hücre çoğalmasını, migrasyonunu ve tüp formasyonunu artırdığı ve anjiyogeneze aracılık ettiği önerilmektedir. Tümör hücreleri ve endotel hücreleri arasındaki etkileşimler komplekstir, embriyonik gelişim sırasında gözlenenlere benzer olabilir ve tümör anjiyogenez sürecinde önemli olduğu varsayılmıştır (Darland ve D'Amore 1999). Başka bir ko-kültür çalışmasında, tümör/endotel hücre etkileşimlerini modellemek için U87 insan glioma hücrelerini HUVEC ile ko-kültür yapılmıştır (Khodarev ve ark 2003). U87 hücrelerinin, HUVEC'lerde proliferasyon ve migrasyonu artırdığı rapor edilmiştir. Bununla beraber tümör hücrelerinden gelen sinyaller, normal fibroblastların (NF'lerin) CAF'lara aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Ayrıca, NF'ler, kanser hücreleriyle ko-kültürü yapılmak suretiyle CAF'lara dönüştürülebilir (Erez ve ark 2013). Bu literatür bilgisine dayanarak HEp-2 hücresiyle ko-kültürü yapılan HUVEC hücrelerinin de tümörle ilişkili endotel hücrelerine transforma olabileceği öngörüsünde bulunulmuştur. Proliferasyon, migrasyon, invazyon ve bazı gen ekspresyon bulgularımız bu hipotezimizi desteklemektedir. Buna göre HEp-2

mikroçevresinin HUVEC yapışma kinetiğini ve migrasyonunu artıran biyofaktörler içerdiği önerilmektedir.

İnsan dental pulp stromal hücrelerinin CM'si (hDPSC-CM) ve HUVEC ile kurulan ko-kültür modelinde HUVEC'in mono-kültüre nispetle hem proliferasyon, hem migrasyonun arttığı hem de morfolojik değişimlerin gözlemlendiği rapor edilmiştir. Ayrıca RTCA analizi ile MTT sonuçları tutarlıdır (Gharaei ve ark 2018). Mevcut çalışmada ise HUVEC hücresi, yukarıdaki çalışmadaki gibi stromal hücresi ile değil tümör hücresi gibi kanserle ilişkili *soluble* faktörlerin medyuma salındığı bir ortamla ko-kültür yapılmasına rağmen HUVEC'lerde morfolojik değişim gözlenmemiştir; ancak proliferasyon ve migrasyon bulgularıyla uyumludur. Zira endotel hücrelerinin mikroçevredeki küçük değişiklikleri algıladığına ve yerel gereksinimlere uyum sağlama konusunda dikkate değer bir kapasiteye sahip olduğuna ve dolayısıyla farklılaşma yönünü belirlediğine dair bulgular elde edilmiştir (Alberts B 2002.).

Wang ve ark, oluşturdukları ko-kültür süresini maksimum 6 gün olarak belirlemişlerdir (Wang ve ark 2015). Aynı şekilde Gharaei ve ark da 2, 3 ve 7 günlük ko-kültürler kurmuştur (Gharaei ve ark 2018) . Bir CAF olan MRC-5 ile pankreatik kanser (PC) arasında kurulan ko-kültür süresi 14 gün olarak belirlenmiştir (Ding ve ark 2018). Khodarev ve ark'larının yaptığı çalışmada HUVEC-U87 ko-kültür süresi olarak 18, 24 ve 48 saat seçilmiştir. MSC ve HUVEC ile yapılan ko-kültür çalışmasında 3, 7, 14 ve 21 günlük mono ve ko-kültür süreleri uygun görülmüştür (Bidarra ve ark 2011). Bu kültür süresini bu şekilde belirlemede isabet ettikleri söylenebilir ki zira MSC hücrelerinin proliferasyonu 3 ve 7 günlük sürelerde değil, 14 ve 21 günlük ko-kültürde mono-kültüre kıyasla artış göstermiştir. Ayrıca ko-kültürdeki MSC'nin metabolik aktivitesinin ilk 7 günde değil; 14 ve 21 günlerde arttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ko-kültür etkisinin kısa süreli değerlendirmesi olarak 24, 48 ve 72. saatler ve uzun süreli değerlendirme olarak ise 21 günlük periyod kullanılmıştır. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, ko-kültür zaman ölçeğinin detayları hiç rapor edilmemektedir (Goers ve ark 2014).

Tümör kütleindeki inflamatuvar hücreler, iki uçlu kılıca benzer. Spesifik uyarıda tümör büyümesini baskılayan IL-12 gibi antianjiyogenik sitokinler üretebilmektedir. Ancak birçok tümör inflamatuvar hücresi; tümör anjiyogenezi, tümör büyümesi, doku bozulmasından sorumludur (Hagemann ve ark 2007). Ayrıca son zamanlarda, stromal

fibroblastların başlangıçta aktif hale gelinceye ve kanser büyümesini teşvik etmeye başlayana kadar kanser gelişimini engellediği öne sürülmüştür (Angeli ve ark 2009). Mevcut çalışmadaki hipotezimiz, bu literatür bilgilerine dayarak benzer bir düşünceyle endotel hücrelerinin de başlangıçta kanser gelişimini inhibe edeceği, ancak zamanla kanser progresyonunu teşvik edebileceğine dayanmaktadır. Bu bağlamda mevcut çalışmada HUVEC ile kurulan ko-kültürde tümör hücrelerinin morfolojisi mezenkimal hücre fenotipine doğru değişmiş, migrasyonu artmış lakin invazyonu azalmıştır. Kansere ilişkili genlerin ekspresyonu ise bu beklentiyi karşılayacak şekilde artmamış aksine ciddi bir şekilde azalmıştır. Bu durumda endotel hücreleri, kanser hücrelerinin agresifliğini artırmamış aksine azalması yönünde etki etmiştir.

Karaciğer kanseri hücreleri ve HUVEC ile yapılan direkt ve indirekt ko-kültür içeren bir çalışmada, karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyonunun mono-kültüre kıyasla önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Ding ve ark 2016). Başka bir çalışmada ise BBSHK hücreleri, endotel hücre hattı olan HDMEC hücrelerinin CM'sine 72 saat maruz kaldığında, mono-kültür BBSHK hücrelerine kıyasla kanser hücre proliferasyonunda hiçbir fark gözlenmemiştir, ancak migrasyonu artırdığı tespit edilmiştir. (Neiva 2009). Mevcut çalışmamızda ise 24, 48, 72 saat HUVEC-CM maruziyet sonuçlarında kanser hücrelerinde MTT/XTT'ye göre ilk bulgularla uyumlu olarak proliferasyonda artış görülmüş; RTCA sonuçlarına göre ise proliferasyonda azalma görülmüştür. Kansere hücreleri ve endotel hücreleri arasındaki direkt temas ve CM'nin kullanıldığı hücre çoğalma deneylerinin gösterdiği gibi, elde ettiğimiz verilerin, ortamda salgılanan faktörlere bağlı olabileceğini varsaymaktayız. Endotel hücreler ile kanser hücrelerinin ortak kültürlerinde birbirleri ile etkileşimleri sonucunda stromal hücre kaynaklı olan bir takım faktörlerin salınımlarının arttığını bu durumun da kanserli hücre çoğalmasını ve tümörün ilerlemesini (migrasyon) desteklediğini düşünmekteyiz.

Normal fibroblastlar ile prostat kanser hücre hatları ile yapılan ko-kültür çalışmasında resiprokal etkiye bakılan sonuçlarına göre fibroblast CM'si prostat kanser hücrelerini; prostat kanser hücre CM'si de fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu azaltmıştır (Iacopino ve ark 2012). Bu bulgular, mevcut çalışmanın RTCA sonuçlarıyla uyumludur. HUVEC ve HEp-2 hücrelerinin proliferasyonlarının zamanla azalması (RTCA sonuçlarına göre), tümör/ sağlıklı mikroçevreden gelen

büyüme sinyallerinin yokluğunda uzun süre *in vitro* kültür sisteminde biyolojik olarak stabil kalmasının imkansız olduğunu gösterir.

Buna karşılık, başka bir çalışma dental pulp kök hücrelerden (hDPSC) ve kemik iliği mezenkimal kök hücre (BM-MSK)'lerden elde edilen CM'lerin endotel hücre büyümesi üzerinde bir etkisi olmadığını göstermiştir (Bronckaers ve ark 2013). Bu bulgu, deney düzeneklerinde hücre sağkalımı için yetersiz serum konsantrasyonunun varlığı ile açıklanabilir. Farklı çalışmalarda kullanılan kültür şartlarının ve hücrelerin çok değişken olduğu ve bu durumun farklı araştırmacılar tarafından elde edilen farklı sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırdığına dikkat edilmelidir (Iacopino ve ark 2012).

Ayrıca bahsedilen ko-kültür çalışmaları ve burada belirtilmeyen pek çok çalışma, TMCÇ elemanlarından biri olan endotel hücrelerinin tümör hücreleri üzerine etkisi, hücreler arasındaki etkileşimi tek yönlü değerlendirmektedir. Çalışmamızda tümör hücresinin endotel hücresine; endotel hücresinin tümör hücresine olmak üzere hücreler arasındaki resiprokal etki araştırılmıştır. Benzer şekilde resiprokal etki MSC ve HUVEC ile yapılan ko-kültür çalışmasında da araştırılmıştır (Bidarra ve ark 2011). Fibroblast hücreler ve prostat kanser hücrelerle oluşturulan ko-kültür çalışmasında da mevcut çalışmaya benzer olarak resiprokal etki araştırılmıştır (Iacopino ve ark 2012). Resiprokal etkiyi sadece gen ekspresyonu ile araştıran Da-Woon Jung ve ark (2010) da migrasyon ve invazyon deneylerinde ise yine tek yönlü etkiyi (tümör hücrelerinin CAF üzerine etkisi) değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, OSCC hücreleri ile stromal fibroblastlar arasında kanser ilerlemesini arttırmada karşılıklı bir diyalog olup olmadığını araştırmışlardır. OSCC hücreleri ve CAF arasındaki bir iletişim aracı olarak, OSCC hücrelerinden salınan IL-1a'nın CAF'dan CCL7 salgılamasına neden olduğunu ve kanserin ilerlemesine katkısı olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada dikkat çeken önemli bir unsur da CAF ile direkt muamele edilen OSCC hücre hattında belli miktar CCL7 protein ekspresyonu tespit edilirken, CAF-CM'si ile indirekt ko-kültür yapılan OSCC hücre hattında ise bazal seviyede CCL7 tespit edilmesidir. Bu durum, ko-kültürdeki CCL7'nin asıl kaynağının CAF'ın OSCC ile direkt muamelesinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Jung ve ark 2010). Mevcut çalışmada ise HUVEC ile HEp-2 direkt ko-kültür modelinde HEp-2 hücrelerinin invazyon potansiyelini gösteren uzamış çıkıntılar sergilemesiyle; HUVEC-CM'siyle oluşturulan indirekt ko-kültürde ise, HEp-2 hücrelerinin

invazyonunun artmasını beklerken azalmasıyla sonuçlanmıştır. Mono-kültür Hep-2'lere kıyasla, matrigel boyunca göç eden/invazyon yapan ko-kültürdeki HEp-2 hücresinin sayısı azalmıştır; bu durum matrijeli parçalamak için yeterli aktif proteaz üretilmemesi nedeniyle olabilir. HUVEC'in sağladığı tümör mikroçevrede proteazların baskılandığını düşünebiliriz. Hep-2'nin proliferasyon/migrasyon/gen ekspresyonu üzerindeki etkisi, birkaç büyüme faktörünün ilave veya sinerjik etkisinin bir sonucu olabilir. Ayrıca bu durum da direkt ko-kültürde HEp-2 hücrelerinin HUVEC ile muamelesinin önemli olduğunu, sonuçları etkileyebileceğini gösterebilir. Bununla beraber HEp-2 hücrelerinde invazyon kabiliyetinin azalmasını, sağlıklı hücreler olan HUVEC hücreleri ile ko-kültürünün yapılmış olması şeklinde de yorumlanabilir. Çünkü CAF ya da tümörle ilişkili endotel hücreleri gibi tümör mikroçevre elemanları ile yapılan ko-kültürlerde tümör hücrelerinin kanser progresyonunun artmasının sebebi bu hücrelerin sağlıklı olmamalarıyla ilişkili olabilir. Ancak bu yorum, yukarıda izah edildiği üzere HUVEC ile çalışan Ding ve arkadaşlarının çalışmalarıyla çelişmektedir (Khodarev ve ark 2003, Ding ve ark 2016). Ancak Wang ve ark'larının yaptığı çalışma ile de uyumludur; HEp-2 ve normal fibroblastlar (NF) ile yapılan ko-kültür modelinde tümör hücresinin migrasyon, invazyon ve proliferasyon kapasiteleri kontrole nispetle değişmemiş; ancak HEp-2 ve CAF ile yapılan ko-kültür modelinde ise migrasyon, invazyon ve proliferasyon kapasiteleri kontrole nispetle artmıştır (Wang ve ark 2015). Aynı şekilde normal fibroblast hücre hattı olan MRC-5 ve pankreatik kanser (PC) ile yapılan ko-kültür çalışmasında CAF; kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu inhibe etmiştir (Ding ve ark 2018). Normal gastrik stromal hücreler ile direkt ko-kültür yapılan bir başka çalışmada da stromal hücrelerin kanser hücresi büyümesi üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Bununla beraber aynı çalışmadaki direkt ko-kültürde; kanserle ilişkili stromal hücrelerin, gastrik kanser hücrelerinden MKN45'in büyümesini önemli bir şekilde artırdığı ve fakat diğer gastrik kanser hücre hattı HSC43'ün büyümesini ise hem direkt hem de indirekt ko-kültürde önemli bir şekilde etkilemediği gösterilmiştir (Niwa ve ark 2015). Aynı şekilde farklı kültür şartlarının ve hücrelerin çok değişken olduğu ve farklı sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırdığına dikkat edilmelidir (Iacopino ve ark 2012).

Kanserli dokuda hücrelerin göç edebilmesi/migrasyonu, tümörün metastazı için çok önemlidir. Mevcut çalışmada ko-kültürdeki HUVEC'lerin artmış migrasyon

kabiliyeti gözlemlendi ve iki hücre tipi arasındaki indirekt temasın, HUVEC göçünü uyaracak kemotaktik faktörlerin salınımını uyardığı şeklinde yorumlandı. Aynı şekilde ko-kültürdeki HEp-2'lerin migrasyon kabiliyeti de gözlemlendi ve iki hücre tipi arasındaki indirekt temasın, HEp-2 migrasyonunu uyaracak kemotaktik faktörlerin salınımını uyardığı şeklinde yorumlandı. Migrasyon kabiliyetinin invazyon için bir ön şart olduğu gerçektir; bir hücre migrasyon yapmadan invazyon yapamaz; ama invazyon olmadan göç edebilir (Friedl ve Wolf 2010). Bu bağlamda mevcut çalışmada ko-kültürdeki hem HEp-2 hem HUVEC hücrelerinin migrasyon kabiliyeti mono-kültürlerine kıyasla artmıştır; ancak sadece ko-kültürdeki HUVEC'in invazyon kabiliyeti artmıştır.

Ko-kültür sistemlerimizde gözlenen etkiler, kültür ortamındaki hücrelerin salgıladığı faktörlerden kaynaklanmakla beraber, salgılanan moleküller ve konsantrasyonları hücre tipine, kültür durumuna ve süresine göre de değişmektedir (Dowling ve Clynes 2011).

Kanser hücresinin önemli özelliklerinden biri gen ekspresyon seviyelerinde gözlenen değişikliklerdir. Mevcut çalışmanın ikinci kısmı olan moleküler seviyede etkiye bakıldığında, ifadesi artmış genlerin HUVEC'ler tarafından sadece tümörle şartlandırılmış ortama maruz kaldıktan sonra ifade edileceğini ve monokültürde HUVEC'ler tarafından ifade edilmeyeceği şeklinde yorumlanmıştır.

N-cadherin'in artmış ekspresyonunun kanserde EMT'nin bir özelliği olduğu öne sürülmektedir (Yılmaz ve Christofori 2009). Meme kanseri hücreleri olan düşük metastatik MCF-7 ve yüksek metastatik MDA-MB-231 hücreleri ile NF ve CAF'lar ile ko-kültür yapılan bir çalışmada CAF'larda *N-cadherin* seviyesinde bir artış gözlenmiş, ancak NF'lerde gözlenmemiştir. CAF'lar, sırayla, MDA-MB-231 hücrelerinin *N-cadherin* seviyesinde bir artışa neden olmuş ve başlangıçta *N-cadherin* için negatif olan MCF-7 hücrelerinde ise *N-cadherin* ekspresyonunu indüklemiştir (Angelucci ve ark 2011). Mevcut çalışmada ise hem HUVEC hem de HEp-2 hücrelerinde *N-cadherin* seviyesinde ciddi bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Ko-kültür ortamının hem HUVEC hem de HEp-2 hücrelerinin mezenkimal geçişi tetiklemediğini düşünmekle beraber EMT'nin tek bir markörü ile de buna karar verilemeyeceği düşünülmektedir.

IL-8, çeşitli tümörlerde inflamasyon, tümör ilerlemesi ve anjiyogenezde önemli bir role sahiptir (Sarvaiya ve ark 2013). Neiva'nın (2009) BBSHK hücre hatları ile ko-kültürü sonucunda endotel hücrelerinde *IL-8* gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir. BBSHK hücre hattı olarak OSCC3, UM-SCC-1, UM-SCC-17B, UM-SCC-74A hücreleri kullanılırken, endotel hücre hattı olarak HDMEC kullanılmıştır (Neiva 2009). Mevcut çalışmada ise HEp-2 ile ko-kültürü yapılan endotel hücrelerinde, *IL-8* gen ekspresyonunda azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu farklılığın sebebi kullanılan farklı hücre hatları ve farklı hücre şartları olabilir. HUVEC ile ko-kültürü yapılan tümör hücrelerinde de, *IL-8* gen ekspresyonunda azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). HEp-2-CM ortamı, HUVEC'in migrasyon ve invazyon bulgularının aksine, ilginç bir şekilde *IL-8* gen ekspresyonunu artırma değil azaltma yönünde etkilemiştir. Ancak bu bulgu hücre canlılığı azalan RTCA bulgusuyla uyumludur ($p>0,05$).

CCR7 ve ligandı *CCL21* çeşitli organ kökenli kanser hücrelerinin proliferasyonuna, ilerlemesine ve metastazına katılabilir (Wang ve ark 2005). Mevcut çalışmada HEp-2-CM ortamı, HUVEC hücrelerinde *CCL21* ekspresyonunda anlamlı bir artışa sebep olmuştur ($p<0,05$). Bu bulgu, HUVEC'in proliferasyon, migrasyon ve invazyon bulgularıyla uyumludur. Bunun aksine HUVEC-CM ortamı ise HEp-2 hücrelerinde *CCL21* ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur ($p<0,05$). Bu bulgu da HEp-2'nin proliferasyon ve invazyon bulgularıyla uyumludur.

MMP2 ve *MMP9*, çeşitli malin kanserlerde aşırı eksprese edilmekte ve ayrıca sıklıkla tümör derecesi ve kötü hasta prognozu ile ilişkilidir (Uloza ve ark 2011). *MMP*'ler arasında, *MMP2* ve *MMP9*, kanser hücrelerinin invazyon ve metastazlarında iyi karakterize edilmiş rollere sahiptir (Roh ve ark 2012). Yapılan bir çalışmada fibroblastlar, MCF-7 tümör hücreleri tarafından oluşturulan kondisyon ortamı (MCF7-CM) varlığında kültürlendiğinde, *MMP2* enzim üretiminin arttığı, ancak *MMP9*'un ise saptanamadığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, fibroblastlar ve MCF-7 tümör hücrelerinin ko-kültüründe, *MMP9* indüklenmiştir. İlgili iki hücre tipinin mono-kültürlerinde *MMP2* veya *MMP9* proteini tespit edilmemiştir. Bu durumda *MMP2* ekspresyonunun malin tümörlerin stromasında mevcut olduğu ve çözülebilir faktörlerin aracılık ettiği parakrin uyarımı ile arttırıldığı sonucuna vardılar. Buna karşılık, *MMP9* ekspresyonu için ise tümör kaynaklı fibroblastların, malign tümör epiteli ile doğrudan temas gerektireceği şeklinde yorumlamaktadırlar (Singer ve ark

2002). Mevcut çalışmada ise Singer ve ark'larının çalışmasına paralel olarak HEp-2-CM ortamı, HUVEC hücrelerinde *MMP2* ve *MMP9* ekspresyonlarında anlamlı bir artışa sebep olmuştur ($p<0,05$). *MMP*'ler arasında, *MMP2* ve *MMP9*, kanser hücrelerinin invazyon ve metastazlarında iyi karakterize edilmiş rollere sahiptir (Roh ve ark 2012). Bu rapor, invazyon kabiliyeti artan mevcut çalışmamızdaki ko-kültürdeki HUVEC hücrelerinin artan *MMP2* ve *MMP9* ekspresyonlarıyla uyumludur. Bunun aksine HUVEC-CM ortamı ise HEp-2 hücrelerinde *MMP2* ve *MMP9* ekspresyonlarında anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur. Bu bulgu da invazyon kabiliyeti azalan mevcut çalışmamızdaki ko-kültürdeki HEp-2 hücrelerinin azalan *MMP2* ve *MMP9* ekspresyonlarıyla uyumludur. Ayrıca başka bir çalışmada ko-kültürler kullanılarak, hem tümör hücrelerinde hem de fibroblastlarda *MMP2* ve *MMP9* sekresyonunu aktive etmek için BBSHK hücreleri ve fibroblastlar arasında doğrudan temasın gerekli olduğu rapor edilmiştir. (Koontongkaew ve ark 2012). Mevcut çalışmada ise HUVEC ve HEp-2 hücreleri arasında direkt temasın gerekli olmadığı HEp-2 CM'sinin HUVEC hücrelerinin *MMP2* ve *MMP9* sekresyonunu aktive etmek için yeterli olduğu gösterilmiştir.

ITGB1'in tümörlerin başlatılması, ilerlemesi ve metastazında önemli rolleri vurgulanmıştır (Kaplan-Türköz ve ark 2012). Mevcut çalışmada HEp-2-CM ortamı, HUVEC hücrelerinde *ITGB1* ekspresyonunda anlamlı bir azalışa sebep olmuştur ($p<0,05$). Aynı şekilde, HUVEC-CM ortamı ise HEp-2 hücrelerinde *ITGB1* ekspresyonunda uzun süreli ko-kültürde anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur ($p<0,0001$). Kısa zamanlı ko-kültürde ise *ITGB1* ekspresyonunda anlamlı bir artış ya da azalış görülmemiştir.

VIM, epitelyal hücrelerin şeklinin dramatik bir şekilde değiştirmelerine ve artmış motilite göstermelerine neden olan bir mezenkimal fenotip kazanmasına sebep olan hücrel bir yeniden programlama işlemi olan EMT'nin standart bir markörü olarak kabul edilir (Thiery ve Sleeman 2006). Mevcut çalışmada HEp-2-CM ortamı, HUVEC hücrelerinde *VIM* ekspresyonunda bir artışa sebep olmuştur. EMT markerı olan *VIM* upregüle olurken, *CDH2* (*N caderin*) geni ise downregüle olmuştur. EMT markörleri olan bu iki gen aynı anda upregüle olsaydı HEp-2 CM'sinin, HUVEC'lerde EMT'yi indüklediği şeklinde yorumlanabilirdi; ancak bu durumda bu yorum zayıf kalacaktır. Çünkü *E-kadherinin* downregülasyonu, *Vimentinin* upregülasyonu, *β -katenin*

taşınması ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi EMT sırasında en kritik hücresel olaylardan bazılarıdır (Zeisberg ve Neilson 2009).

Bunun aksine HUVEC-CM ortamı ise HEp-2 hücrelerinde VIM ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur ($p < 0,05$). Oral dil skuamöz karsinom hücre hattı olan Cal27 hücreleri, TAM ile direkt ko-kültür kurulmuş ve *E-cadherin*'in Cal27 hücrelerinde downregüle olduğu, *Vimentin* ve *Slug*'nin ise upregüle edildiği tespit edildi (Gao ve ark 2018). Bu bulgu, mevcut çalışmada ko-kültürdeki tümör hücrelerinde *VIM*'in downregüle olmasıyla çelişmektedir; ancak bu durum sağlıklı hücreler olan HUVEC ile ko-kültürün ya da indirekt ko-kültürün etkisinin sonucu olarak yorumlanabilir.

HUVEC-CM ortamındaki HEp-2 hücrelerinin kanser progresyonuyla ilişkili *CCL21*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM*, *CDH2*, *CXCL8* ve *ITGB* genlerinin ekspresyonunun azalması yukarıda tartışıldığı gibi ya sağlıklı hücrelerin kanser hücrelerini baskılayabileceği şeklinde ya da beklentinin doğrultusunda kanserle ilişkili genlerin ekspresyonunun artışı ancak kanser hücreleri ve endotel hücrelerinin direkt teması neticesinde olabilir şeklinde açıklanabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; mevcut çalışmada larinks kanser hücreleri HEp-2 ve tümör mikroçevre elemanlarından endotel hücreleri HUVEC arasındaki ilişki araştırıldı. Hem tümör hem de sağlıklı hücrelerdeki mikroçevrenin etkisinin analiz edilmesi ve hücrel ve moleküler değişikliklerin araştırılarak BBSHK'nın patogenezinin aydınlatılması amaçlandı. Bunun için 2B ve 3B direkt ve indirekt ko-kültür modelleri hazırlandı.

Ko-kültürdeki HUVEC, mono-kültürdeki HUVEC'e nispetle proliferasyonu MTT/XTT'ye göre artmış, RTCA/tripan mavisi deneylerine göre azalmıştır. Bununla beraber migrasyon ve invazyon kabiliyetleri artmışken, morfolojik bir değişim gözlenmemiştir. Kanser progresyonuyla ilişkili genlerden CCL21 (80 kat artış), MMP2 (10 kat artış), MMP9 (25 kat artış) ve VIM (2 kat artış) genlerinin ekspresyonu artarken; CDH2, CXCL8 ve ITGB genlerinin ise ekspresyonu azalmıştır.

Ko-kültürdeki HEp-2, mono-kültürdeki HEp-2'ye nispetle proliferasyonu MTT/XTT'ye göre artmış, tripan mavisine göre azalmış, RTCA'ya göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Bunun yanı sıra migrasyon kabiliyeti artmış, invazyon ise azalmıştır. Mezenkimal hücre fenotipine dönüşecek şekilde morfolojik değişim görülmüştür. Kanser progresyonuyla ilişkili CCL21, MMP2, MMP9, VIM CDH2, CXCL8 ve ITGB genlerinin ekspresyonu azalmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Deney sonuçlarının topluca değerlendirilmesi.

	Morfolojik değişim	Tripan mavisi	MTT	XTT	RTCA	Migrasyon	İnvazyon	CCL21	MMP2	MMP9	VIM	CDH2	CXCL8	ITGB
Direkt ko-kültürde HEp-2	Var	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Membranla indirekt ko-kültürde HEp-2	U	U	U	U	U	U	↓	U	U	U	U	U	U	U
CM ile indirekt ko-kültürde HEp-2	U	↓	↑	↑	↓	↑	U	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Direkt ko-kültürde HUVEC	Yok	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
Membranla indirekt ko-kültürde HUVEC	U	U	U	U	U	U	↑	U	U	U	U	U	U	U
CM ile indirekt ko-kültürde HUVEC	U	↓	↑	↑	↓	↑	U	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

*U: Uygulama yapılmamıştır.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara dayanarak kanser hücreleri ile endotel hücreleri arasında ciddi bir konuşma/etkileşim olduğu bunun da kanser progresyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinin de mikroçevre

elemanlarından endotel hücrelerini (HUVEC) kanser lehine etkilediği savunulabilir. Her ne kadar epitel ve stroma arasındaki dinamik ilişkiler literatürde artan bir fikir birliği ile desteklense de, kanser hücreleri ve tümör mikroçevresi arasındaki karmaşık etkileşimlerin tam olarak anlaşılması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda kanser progresyonuyla, EMT-MET ile ilişkili daha fazla gen ekspresyonu araştırılabilir; protein seviyesinde de bu sonuçlar konfirme edilebilir. Ayrıca tümör mikroçevre elemanlarından HUVEC haricinde mikroçevrenin önemli elemanlarından MSC, TAM, CAF ile de ko-kültürler kurulabilir. Zira literatürde MSC hücrelerinin kaderinin, diğer hücre popülasyonları ile birlikte çalışmaya dayandığı ve MSC'nin doğrudan temastaki diğer hücre tiplerinden ciddi bir şekilde etkilendiği gösterilmiştir. Hatta bu TMC elemanlarından ikisi ve kanser hücresi olmak üzere tri-kültür modeller kurulabilir. Bu sayede *in vivo* ortam şartları daha fazla taklit edilecektir. Endotel hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkisinin tümör hücrelerine özgü olup olmadığını anlamak için, insan oral keratinositlerini (HOK-16B) ya da insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) gibi hücre hatları da endotel hücre CM'ye maruz bırakılarak ve proliferasyon, migrasyon, invazyon ve gen ekspresyon deneyleri ile analizler yapılabilir. Daha fazla farklı BBSHK hücre hattı kullanarak bunların HUVEC ile ayrı ayrı ko-kültür etkilerine bakılabilir. En sonunda BBSHK patogenezinde etkili ortak bir yolak keşfedilebilir.

Bununla beraber sitokin array ya da PCR-array yapılarak ko-kültürde etkili olan genler belirlenerek etkili moleküler esas faktöre doğru araştırma spesifikleştirilebilir. Ayrıca CM'de metastaz, proliferasyonda etkili proteinlerin varlığı ve konsantrasyonlarını saptamak için kapsamlı proteomik analizler yapıp gen ekspresyon sonuçlarını güçlendirmesi beklenmektedir. Böylece en nihayetinde BBSHK tümör mikroçevresinin moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılması antikanser terapinin geliştirilmesinde kritik bir anahtar rolü oynayacaktır. Tümör mikroçevresini de içine alan hedefe yönelik tedavi yaklaşımları geliştirilebilmesi açısından daha pek çok çalışma yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Alberts B JA, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P. In: Anderson M, Granum S, editors. , 2002. Specialized tissues, stem cells, and tissue renewal; blood vessel, lymphatics, and endothelial cells. . Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, 1445–50.
- Albini A, Sporn MB, 2007. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews Cancer*, 7, 2, 139-47.
- Albini A, Tosetti F, Benelli R, Noonan DM, 2005. Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer research*, 65, 23, 10637-41.
- Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, 2004. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer cell*, 6, 1, 17-32.
- Angeli F, Koumakis G, Chen M-C, Kumar S, Delinassios JG, 2009. Role of stromal fibroblasts in cancer: promoting or impeding? *Tumor Biology*, 30, 3, 109-20.
- Angelucci C, Lama G, Proietti G, Fabbri C, Masetti R, Sica G, Maulucci G, 2011. Breast cancer cells and fibroblasts in co-culture: reciprocal influences on cell adhesion, membrane fluidity and migration. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 116, 1, 12.
- Anton K, Glod J, 2009. Targeting the tumor stroma in cancer therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 10, 2, 185-91.
- Antunes F, Andrade F, Araújo F, Ferreira D, Sarmento B, 2013. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83, 3, 427-35.
- Arellano-Garcia M, Hu S, Wang J, Henson B, Zhou H, Chia D, Wong D, 2008. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. *Oral diseases*, 14, 8, 705-12.
- Argiris A, Eng C, 2004. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. In: *Head and neck cancer*. Eds: Springer, p. 15-60.
- Argiris A KM, Raben D, Ferris RL (.) (.), 2008. Head and neck cancer. *Lancet*, 371, 9625, 1695-709. .
- Balkwill F, Mantovani A, 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The lancet*, 357, 9255, 539-45.
- Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggie S, Harris AL, 2002. Hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer research*, 62, 9, 2493-7.
- Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D, 1996. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer research*, 56, 11, 2484-7.
- Bello IO, Vered M, Dayan D, Dobriyan A, Yahalom R, Alanen K, Nieminen P, Kantola S, Läärä E, Salo T, 2011. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. *Oral oncology*, 47, 1, 33-8.
- Benelli R, Morini M, Carrozzino F, Ferrari N, Minghelli S, Santi L, Cassatella M, Noonan DM, Albini A, 2002. Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *The FASEB Journal*, 16, 2, 267-9.
- Bidarra SJ, Barrias CC, Barbosa MA, Soares R, Amédée J, Granja PL, 2011. Phenotypic and proliferative modulation of human mesenchymal stem cells via crosstalk with endothelial cells. *Stem cell research*, 7, 3, 186-97.
- Bindra RS, Glazer PM, 2005. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569, 1, 75-85.
- Bissell MJ, Radisky D, 2001. Putting tumours in context. *Nature Reviews Cancer*, 1, 1, 46-54.
- Björklund M, Koivunen E, 2005. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1755, 1, 37-69.
- Blavier L, DeClerck YA, 2005. Considering the critical interface between tumor cells and stromal cells in the search for targets for anticancer therapy. *Cancer cell*, 7, 5, 408-9.
- Boanini E, Torricelli P, Gazzano M, Fini M, Bigi A, 2012. The effect of zoledronate-hydroxyapatite nanocomposites on osteoclasts and osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials*, 33, 2, 722-30.
- Bogdanowicz DR, Lu HH, 2013. Multifunction co-culture model for evaluating cell–cell interactions. In: *Biomimetics and Stem Cells*. Eds: Springer, p. 29-36.
- Boiron M, Guillemain B, Bernard C, Peries J, Chuat J, 1968. Presence in murine sarcoma virus stocks of a third component which alone initiates cellular conversion. *Nature*, 219, 5155, 748.

- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in cancer biology*, 161-8.
- Boyle JO, Hakim J, Koch W, Van Der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, Sidransky D, 1993. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer research*, 53, 19, 4477-80.
- Brennan P, Mackenzie N, Quintero M, 2005. Hypoxia-inducible factor 1 α in oral cancer. *Journal of oral pathology & medicine*, 34, 7, 385-9.
- Bronckaers A, Hilkens P, Fanton Y, Struys T, Gervois P, Politis C, Martens W, Lambrichts I, 2013. Angiogenic properties of human dental pulp stem cells. *PloS one*, 8, 8, e71104.
- Brown JM, Wilson WR, 2004. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4, 6, 437-47.
- Califano J, Van Der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research*, 56, 11, 2488-92.
- Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D, 2000. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clinical Cancer Research*, 6, 2, 347-52.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ, 2003. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *New England Journal of Medicine*, 348, 17, 1625-38.
- Callender T, El-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG, 1994. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 74, 1, 152-8.
- Campos MS, Neiva KG, Meyers KA, Krishnamurthy S, Nör JE, 2012. Endothelial derived factors inhibit anoikis of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology*, 48, 1, 26-32.
- Carter V, Shenton B, Jaques B, Turner D, Talbot D, Gupta A, Chapman C, Matthews C, Cavanagh G. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplantation proceedings*, 654-7.
- Cassatella MA, 2003. The neutrophil: an emerging regulator of inflammatory and immune response, Karger Medical and Scientific Publishers, p.
- Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini P-L, 2011. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60, 3, 319-26.
- Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED, 2006. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer research*, 66, 23, 11271-8.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC, 2002. Metastasis: dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2, 8, 563.
- Chan GKY, Kleinheinz TL, Peterson D, Moffat JG, 2013. A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. *PloS one*, 8, 5, e63583.
- Chang K-P, Kao H-K, Yen T-C, Chang Y-L, Liang Y, Liu S-C, Lee L-Y, Chang Y-L, Kang C-J, Chen I-H, 2011. Overexpression of macrophage inflammatory protein-3 α in oral cavity squamous cell carcinoma is associated with nodal metastasis. *Oral oncology*, 47, 2, 108-13.
- Chuang JY, Yang WH, Chen HT, Huang CY, Tan TW, Lin YT, Hsu CJ, Fong YC, Tang CH, 2009. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells. *Journal of cellular physiology*, 220, 2, 418-26.
- Comoglio PM, Trusolino L, 2005. Cancer: the matrix is now in control. *Nature medicine*, 11, 11, 1156-7.
- Coussens LM, Werb Z, 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 6917, 860-7.
- Cuvier C, Jang A, Hill R, 1997. Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis: effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L+ B) secretion. *Clinical & experimental metastasis*, 15, 1, 19-25.
- Darland DC, D'Amore PA, 1999. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *The Journal of clinical investigation*, 103, 2, 157-8.
- De Simone U, Caloni F, Gribaldo L, Coccini T, 2017. Human co-culture model of neurons and astrocytes to test acute cytotoxicity of neurotoxic compounds. *International journal of toxicology*, 36, 6, 463-77.

- de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Vallejo GH, 2005. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 41, 3, 283-93.
- DeClerck Y, 2000. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *European Journal of Cancer*, 36, 10, 1258-68.
- Derycke LD, Bracke ME, 2004. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *International Journal of Developmental Biology*, 48, 5-6, 463-76.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A, 2001. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics*, 29, 2, 117.
- Diamond ME, Sun L, Ottaviano AJ, Joseph MJ, Munshi HG, 2008. Differential growth factor regulation of N-cadherin expression and motility in normal and malignant oral epithelium. *Journal of cell science*, 121, 13, 2197-207.
- Ding Q, Xia Y, Ding S, Lu P, Sun L, Fan Y, Li X, Wang Y, Tian D-a, Liu M, 2016. Potential role of CXCL9 induced by endothelial cells/CD133+ liver cancer cells co-culture system in tumor transendothelial migration. *Genes & cancer*, 7, 7-8, 254.
- Ding S-M, Lu A-L, Zhang W, Zhou L, Xie H-Y, Zheng S-S, Li Q-Y, 2018. The role of cancer-associated fibroblast MRC-5 in pancreatic cancer. *Journal of Cancer*, 9, 3, 614.
- Dowling P, Clynes M, 2011. Conditioned media from cell lines: A complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics*, 11, 4, 794-804.
- Eckert KA, Kunkel TA, 1993. Fidelity of DNA synthesis catalyzed by human DNA polymerase α and HIV-1 reverse transcriptase: effect of reaction pH. *Nucleic acids research*, 21, 22, 5212-20.
- Edling Y, Sivertsson LK, Butura A, Ingelman-Sundberg M, Ek M, 2009. Increased sensitivity for troglitazone-induced cytotoxicity using a human in vitro co-culture model. *Toxicology in Vitro*, 23, 7, 1387-95.
- Ehnert S, Aspera-Werz RH, Freude T, Reumann MK, Ochs BG, Bahrs C, Schröter S, Wintermeyer E, Nussler AK, Pscherer S, 2016. Distinct Gene Expression Patterns Defining Human Osteoblasts' Response to BMP2 Treatment: Is the Therapeutic Success All a Matter of Timing? *European Surgical Research*, 57, 3-4, 197-210.
- Elias BC, Mathew S, Srichai MB, Palamuttam R, Bulus N, Mernaugh G, Singh AB, Sanders CR, Harris RC, Pozzi A, 2014. The integrin β 1 subunit regulates paracellular permeability of kidney proximal tubule cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 12, 8532-44.
- Erez N, Glanz S, Raz Y, Avivi C, Barshack I, 2013. Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochemical and biophysical research communications*, 437, 3, 397-402.
- Folkman J, 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl. J. Med.*, 285, 21, 1182-6.
- Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology*, 15-8.
- Forastiere A KW, Trotti A, Sidransky D (2001). Head and neck cancer. *N Engl J Med*, 345, (26, 1890-900.
- Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A, 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 8, 5, 362.
- Friedl P, Wolf K, 2010. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of cell biology*, 188, 1, 11-9.
- Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall JF, Harrington K, Sahai E, 2007. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature cell biology*, 9, 12, 1392.
- Gao L, Zhang W, Zhong WQ, Liu ZJ, Li HM, Yu ZL, Zhao YF, 2018. Tumor associated macrophages induce epithelial to mesenchymal transition via the EGFR/ERK1/2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology reports*, 40, 5, 2558-72.
- Gharaei M, Xue Y, Mustafa K, Lie S, Fristad I, 2018. Human dental pulp stromal cell conditioned medium alters endothelial cell behavior. *Stem cell research & therapy*, 9, 1, 69.
- Goers L, Freemont P, Polizzi KM, 2014. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society Interface*, 11, 96, 20140065.
- Ha PK, Califano JA, 2003. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14, 5, 363-9.
- Hagemann T, Balkwill F, Lawrence T, 2007. Inflammation and cancer: a double-edged sword. *Cancer cell*, 12, 4, 300-1.
- Hanahan D, Weinberg RA, 2000. The hallmarks of cancer. *cell*, 100, 1, 57-70.

- Hanna E, Quick J, Libutti S, 2009. The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy. *Oral diseases*, 15, 1, 8-17.
- Harris AL, 2002. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, 2, 1, 38.
- Hess MW, Pfaller K, Ebner HL, Beer B, Hekl D, Seppi T, 2010. 3D versus 2D cell culture: implications for electron microscopy. In: *Methods in cell biology*. Eds: Elsevier, p. 649-70.
- Hida K, Klagsbrun M, 2005. A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer research*, 65, 7, 2507-10.
- Hirano T, 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *International reviews of immunology*, 16, 3-4, 249-84.
- Hohenester E, 2014. Signalling complexes at the cell-matrix interface. *Current opinion in structural biology*, 29, 10-6.
- Horst HA, Horny HP, 1991. Tumor-infiltrating lymphoreticular cells. Histologic and immunohistologic investigations performed on metastasizing squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer*, 68, 11, 2397-402.
- Hsieh C-C, Huang Y-S, 2016. Aspirin breaks the crosstalk between 3T3-L1 adipocytes and 4T1 breast cancer cells by regulating cytokine production. *PloS one*, 11, 1, e0147161.
- Iacopino F, Angelucci C, Sica G, 2012. Interactions between normal human fibroblasts and human prostate cancer cells in a co-culture system. *Anticancer research*, 32, 5, 1579-88.
- Ishiguro K, Yoshida T, Yagishita H, Numata Y, Okayasu T, 2006. Epithelial and stromal genetic instability contributes to genesis of colorectal adenomas. *Gut*, 55, 5, 695-702.
- Ishii G, Sangai T, Oda T, Aoyagi Y, Hasebe T, Kanomata N, Endoh Y, Okumura C, Okuhara Y, Magae J, 2003. Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochemical and biophysical research communications*, 309, 1, 232-40.
- Ishikawa T, Nakashiro K-I, Klosek SK, Goda H, Hara S, Uchida D, Hamakawa H, 2009. Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports*, 21, 3, 707-12.
- Itoh Y, Joh T, Tanida S, Sasaki M, Kataoka H, Itoh K, Oshima T, Ogasawara N, Togawa S, Wada T, 2005. IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine*, 29, 6, 275-82.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ, 2008. Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians*, 58, 2, 71-96.
- Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim KY, Williams D, Kim J, 2010. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *International journal of cancer*, 127, 2, 332-44.
- Kalluri R, Zeisberg M, 2006. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 5, 392-401.
- Kalyankrishna S GJ, (2006). Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 24, (17), 2666-72. .
- Kaneko T, Zhang Z, Mantellini MG, Karl E, Zeitlin B, Verhaegen M, Soengas MS, Lingen M, Strieter RM, Nunez G, 2007. Bcl-2 orchestrates a cross-talk between endothelial and tumor cells that promotes tumor growth. *Cancer research*, 67, 20, 9685-93.
- Kaplan-Türköz B, Jiménez-Soto LF, Dian C, Ertl C, Remaut H, Louche A, Tosi T, Haas R, Terradot L, 2012. Structural insights into *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA interaction with $\beta 1$ integrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 36, 14640-5.
- Kaplowitz N, 2005. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nature reviews Drug discovery*, 4, 6, 489.
- Karin M, Lawrence T, Nizet V, 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, 124, 4, 823-35.
- Karl E, Zhang Z, Dong Z, Neiva K, Soengas M, Koch A, Polverini P, Nunez G, Nör J, 2007. Unidirectional crosstalk between Bcl-x L and Bcl-2 enhances the angiogenic phenotype of endothelial cells. *Cell death and differentiation*, 14, 9, 1657.
- Khodarev NN, Yu J, Labay E, Darga T, Brown CK, Mauceri HJ, Yassari R, Gupta N, Weichselbaum RR, 2003. Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells. *Journal of cell science*, 116, 6, 1013-22.
- Kim B-G, Li C, Qiao W, Mamura M, Kasperczak B, Anver M, Wolfraim L, Hong S, Mushinski E, Potter M, 2006. Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature*, 441, 7096, 1015-9.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR, 1982. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 21, 24, 6188-93.

- Koontongkaew S, 2013. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of Cancer*, 4, 1, 66.
- Koontongkaew S, Amornphimoltham P, Monthanpisut P, Saensuk T, Leelakriangsak M, 2012. Fibroblasts and extracellular matrix differently modulate MMP activation by primary and metastatic head and neck cancer cells. *Medical oncology*, 29, 2, 690-703.
- Koontongkaew S, Amornphimoltham P, Yapong B, 2009. Tumor–stroma interactions influence cytokine expression and matrix metalloproteinase activities in paired primary and metastatic head and neck cancer cells. *Cell biology international*, 33, 2, 165-73.
- Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, Dolznig H, 2013. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752, 1, 10-24.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, 2009. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, Professional Edition: Expert Consult-Online, Elsevier Health Sciences, p.
- Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ, 2005. Hypoxia-induced tumor angiogenic pathway in head and neck cancer: an in vivo study. *Cancer letters*, 225, 2, 297-304.
- Lathers DM, Young MRI, 2004. Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cytokine*, 25, 5, 220-8.
- Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB, 1978. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature*, 272, 5653, 501.
- Lee J-I, Jin B-H, Kim M-A, Yoon H-J, Hong S-P, Hong S-D, 2009. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 107, 5, 678-84.
- Lewis CE, Pollard JW, 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer research*, 66, 2, 605-12.
- Leyva-Illades D, McMillin M, Quinn M, DeMorrow S, 2012. Cholangiocarcinoma pathogenesis: Role of the tumor microenvironment. *Translational gastrointestinal cancer*, 1, 1, 71.
- Li C, Shintani S, Terakado N, Nakashiro K-i, Hamakawa H, 2002. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports*, 9, 6, 1219-23.
- Li J, Chen L, Qin Z, 2012. Multifaceted tumor stromal fibroblasts. *Cancer Microenvironment*, 5, 3, 187-93.
- Li X, Tai H-H, 2013. Activation of thromboxane A2 receptor (TP) increases the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/chemokine (CC motif) ligand 2 (CCL2) and recruits macrophages to promote invasion of lung cancer cells. *PloS one*, 8, 1, e54073.
- Limame R, Wouters A, Pauwels B, Franssen E, Peeters M, Lardon F, De Wever O, Pauwels P, 2012. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PloS one*, 7, 10, e46536.
- Lindén SK, Driessen KM, McGuckin MA, 2007. Improved in vitro model systems for gastrointestinal infection by choice of cell line, pH, microaerobic conditions, and optimization of culture conditions. *Helicobacter*, 12, 4, 341-53.
- Lindström S, Andersson-Svahn H, 2012. Single-cell culture in microwells. In: *Single-Cell Analysis*. Eds: Springer, p. 41-52.
- Liu S-Y, Chang L-C, Pan L-F, Hung Y-J, Lee C-H, Shieh Y-S, 2008. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 44, 3, 277-85.
- Malina KC-K, Cooper I, Teichberg VI, 2009. Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood–brain barrier tightness. *Brain research*, 1284, 12-21.
- Mao L HW, Papadimitrakopoulou VA 2004. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell*, 5, 4, 311-6.
- Marcus B, Arenberg D, Lee J, Kleer C, Chepeha DB, Schmalbach CE, Islam M, Paul S, Pan Q, Hanash S, 2004. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma: The impact of tumor-associated macrophages. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 101, 12, 2779-87.
- Markwell S, Weed S, 2015. Tumor and stromal-based contributions to head and neck squamous cell carcinoma invasion. *Cancers*, 7, 1, 382-406.
- Mbeunkui F, Johann Jr DJ, 2009. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 63, 4, 571-82.
- Miranti CK, Brugge JS, 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature cell biology*, 4, 4, E83.
- Mitra AK, Zillhardt M, Hua Y, Tiwari P, Murmann AE, Peter ME, Lengyel E, 2012. MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer discovery*, 2, 12, 1100-8.

- Miyazaki H, Patel V, Wang H, Edmunds RK, Gutkind JS, Yeudall WA, 2006. Down-regulation of CXCL5 inhibits squamous carcinogenesis. *Cancer research*, 66, 8, 4279-84.
- Moreno-Layseca P, Streuli CH, 2014. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biology*, 34, 144-53.
- Mraz M, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, Ansell SM, Novak AJ, Kay NE, Witzig TE, 2011. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin α -4- β -1 (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br. J. Haematol.*, 155, 1, 53-64.
- Munro J, Stott FJ, Vousden KH, Peters G, Parkinson EK, 1999. Role of the alternative INK4A proteins in human keratinocyte senescence: evidence for the specific inactivation of p16INK4A upon immortalization. *Cancer research*, 59, 11, 2516-21.
- Muthuswamy SK, Li D, Lelievre S, Bissell MJ, Brugge JS, 2001. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nature cell biology*, 3, 9, 785.
- Na Y-R, Lee J-S, Lee S-J, Seok S-H, 2013. Interleukin-6-induced Twist and N-cadherin enhance melanoma cell metastasis. *Melanoma research*, 23, 6, 434-43.
- Naci D, Vuori K, Aoudjit F. Alpha2beta1 integrin in cancer development and chemoresistance. *Seminars in cancer biology*, 145-53.
- Neiva KG, 2009. Crosstalk between endothelial cells and tumor cells in head and neck cancer.
- Neiva KG, Zhang Z, Miyazawa M, Warner KA, Karl E, Nör JE, 2009. Cross talk initiated by endothelial cells enhances migration and inhibits anoikis of squamous cell carcinoma cells through STAT3/Akt/ERK signaling. *Neoplasia*, 11, 6, 583IN12-93IN14.
- Nelson CM, Bissell MJ. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Seminars in cancer biology*, 342-52.
- Network CGA, 2015. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517, 7536, 576.
- Nguyen PT, Kudo Y, Yoshida M, Iizuka S, Ogawa I, Takata T, 2011. N-cadherin expression is correlated with metastasis of spindle cell carcinoma of head and neck region. *Journal of oral pathology & medicine*, 40, 1, 77-82.
- Ninck S, Reisser C, Dyckhoff G, Helmke B, Bauer H, Herold-Mende C, 2003. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck. *International journal of cancer*, 106, 1, 34-44.
- Niwa H, Maeyama Y, Kikuchi S, Kawaguchi H, Daimon T, Furuya Y, Ito H, Mizuno N, Otsu M, Yasuhara H, 2015. Impacts of cancer-associated stromal cells on growth of human gastric cancer cell lines. *Cancer Cell & Microenvironment*, 2, 4.
- Noël A, 2012. New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Frontiers in pharmacology*, 3, 140.
- Novakovic GV, Eschenhagen T, Mummery C, 2014. Myocardial tissue engineering: in vitro models. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4, 3, a014076.
- Onoue T, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Yoshida H, Sato M, 2006. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *International journal of oncology*, 29, 5, 1133-8.
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA, 2005. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121, 3, 335-48.
- Paget S, 1889. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 133, 3421, 571-3.
- Paget S, 1989. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev*, 8, 98-101.
- Patel BP, Shah SV, Shukla SN, Shah PM, Patel PS, 2007. Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 29, 6, 564-72.
- Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ, Rønnev-Jessen L, 2003. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *The American journal of pathology*, 162, 2, 391-402.
- Pober JS, Sessa WC, 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7, 10, 803.

- Prime S, Davies M, Pring M, Paterson I, 2004. The role of TGF- β in epithelial malignancy and its relevance to the pathogenesis of oral cancer (part II). *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15, 6, 337-47.
- Prince ME AL-, 2008. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol*, 26, 17, 2871-5. .
- Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, 1996. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*, 56, 16, 3630-3.
- Roeder I, Loeffler M, Glauche I, 2011. Towards a quantitative understanding of stem cell–niche interaction: Experiments, models, and technologies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46, 4, 308-17.
- Roh MR, Zheng Z, Kim HS, Kwon JE, Jeung H-C, Rha SY, Chung KY, 2012. Differential expression patterns of MMPs and their role in the invasion of epithelial premalignant tumors and invasive cutaneous squamous cell carcinoma. *Experimental and molecular pathology*, 92, 2, 236-42.
- Roth A, Singer T, 2014. The application of 3D cell models to support drug safety assessment: opportunities & challenges. *Advanced drug delivery reviews*, 69, 179-89.
- Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, Valentino MD, Lyubsky S, Zucker S, Vaday GG, 2004. CXCR4-mediated adhesion and MMP9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer letters*, 214, 2, 231-41.
- Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS, 2013. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*, 4, 12, 2171.
- Schadendorf D, Möller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki B, 1993. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *The Journal of Immunology*, 151, 5, 2667-75.
- Schlomann U, Koller G, Conrad C, Ferdous T, Golfi P, Garcia AM, Höfling S, Parsons M, Costa P, Soper R, 2015. ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nature communications*, 6, 6175.
- Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresch DA, 2015. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in cell biology*, 25, 4, 234-40.
- Shao J, Sheng GG, Mifflin RC, Powell DW, Sheng H, 2006. Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2–stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. *Cancer research*, 66, 2, 846-55.
- Shekhar MP, Werdell J, Santner SJ, Pauley RJ, Tait L, 2001. Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation: implications for tumor development and progression. *Cancer research*, 61, 4, 1320-6.
- Shi Q, Abbruzzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K, 1999. Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clinical Cancer Research*, 5, 11, 3711-21.
- Singer CF, Kronsteiner N, Marton E, Kubista M, Cullen KJ, Hirtenlehner K, Seifert M, Kubista E, 2002. MMP2 and MMP9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast cancer research and treatment*, 72, 1, 69-77.
- Single A, Beetham H, Telford BJ, Guilford P, Chen A, 2015. A comparison of real-time and endpoint cell viability assays for improved synthetic lethal drug validation. *Journal of biomolecular screening*, 20, 10, 1286-93.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W, 1953. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6, 5, 963-8.
- Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G, 1992. Frequent p53 mutations in head and neck cancer. *Cancer Research*, 52, 21, 5997-6000.
- Soon P, Kiaris H, 2013. MicroRNAs in the tumour microenvironment: big role for small players. *Endocrine-related cancer*, 20, 5, R257-R67.
- Sparmann A, Bar-Sagi D, 2004. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer cell*, 6, 5, 447-58.
- Spinardi L, Rietdorf J, Nitsch L, Bono M, Tacchetti C, Way M, Marchisio PC, 2004. A dynamic podosome-like structure of epithelial cells. *Experimental cell research*, 295, 2, 360-74.
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K, 2002. Metastasis: lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 2, 8, 573.
- Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jäger U, Wagner O, Schwarzingler I, 2004. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 351, 3, 250-9.



- Sun Q, Zhou H, Binmadi NO, Basile JR, 2009. Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 46, 32066-74.
- Suter-Dick L, Alves PM, Blaauboer BJ, Bremm K-D, Brito C, Coecke S, Flick B, Fowler P, Hescheler J, Ingelman-Sundberg M, 2015. Stem cell-derived systems in toxicology assessment. *Stem cells and development*, 24, 11, 1284-96.
- Takabayashi T, Takahashi N, Okamoto M, Yagi H, Sato M, Fujieda S, 2009. Lipopolysaccharides increase the amount of CXCR4, and modulate the morphology and invasive activity of oral cancer cells in a CXCL12-dependent manner. *Oral oncology*, 45, 11, 968-73.
- Tan C-T, Chu C-Y, Lu Y-C, Chang C-C, Lin B-R, Wu H-H, Liu H-L, Cha S-T, Prakash E, Ko J-Y, 2008. CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13-dependent invasion via the ERK1/2/AP-1 pathway. *Carcinogenesis*, 29, 8, 1519-27.
- Tang C-H, Chuang J-Y, Fong Y-C, Maa M-C, Way T-D, Hung C-H, 2008. Bone-derived SDF-1 stimulates IL-6 release via CXCR4, ERK and NF- κ B pathways and promotes osteoclastogenesis in human oral cancer cells. *Carcinogenesis*, 29, 8, 1483-92.
- Thiery JP, Sleeman JP, 2006. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7, 2, 131.
- Uloza V, Liutkevičius V, Pangonytė D, Šaferis V, Lesauskaitė V, 2011. Expression of matrix metalloproteinases (MMP2 and MMP9) in recurrent respiratory papillomas and laryngeal carcinoma: clinical and morphological parallels. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 268, 6, 871-8.
- van der Meer AD, Orlova VV, ten Dijke P, van den Berg A, Mummery CL, 2013. Three-dimensional co-cultures of human endothelial cells and embryonic stem cell-derived pericytes inside a microfluidic device. *Lab on a Chip*, 13, 18, 3562-8.
- Van Der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D, 1994. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer research*, 54, 5, 1156-8.
- Van der Woude C, Kleibeuker J, Jansen P, Moshage H, 2004. Chronic inflammation, apoptosis and (pre-) malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Apoptosis*, 9, 2, 123-30.
- Walter V, Yin X, Wilkerson MD, Cabanski CR, Zhao N, Du Y, Ang MK, Hayward MC, Salazar AH, Hoadley KA, 2013. Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes. *PloS one*, 8, 2, e56823.
- Wang J, Zhang X, Thomas SM, Grandis JR, Wells A, Ferris RL, 2005. Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR. *Oncogene*, 24, 38, 5897.
- Wang M, Wu C-P, Pan J-Y, Zheng W-W, Cao X-J, Fan G-K, 2015. Correction: Cancer-Associated Fibroblasts in a Human HEp-2 Established Laryngeal Xenografted Tumor Are Not Derived from Cancer Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition, Phenotypically Activated but Karyotypically Normal. *PloS one*, 10, 5, e0128057.
- Wang W, Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Segall JE, Condeelis JS, 2005. Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends in cell biology*, 15, 3, 138-45.
- Wang Y, Shang Y, 2013. Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Experimental cell research*, 319, 2, 160-9.
- Weinberg RA, 2008. Twisted epithelial–mesenchymal transition blocks senescence. *Nature cell biology*, 10, 9, 1021.
- Wellen KE, Hotamisligil GS, 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 5, 1111-9.
- Williams KJ, Cowen RL, Stratford IJ, 2001. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer—tumour hypoxia: therapeutic considerations. *Breast Cancer Res*, 3, 5, 328-31.
- Wilson J, Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin. Cancer Biol.*, 113-20.
- Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS, Segall JE, 2000. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer research*, 60, 9, 2504-11.
- Xie K, 2001. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & growth factor reviews*, 12, 4, 375-91.
- Yilmaz M, Christofori G, 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28, 1-2, 15-33.
- Zeisberg M, Neilson EG, 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation*, 119, 6, 1429-37.

- Zeng Q, Li S, Chepeha DB, Giordano TJ, Li J, Zhang H, Polverini PJ, Nor J, Kitajewski J, Wang C-Y, 2005. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. *Cancer cell*, 8, 1, 13-23.
- Zhu P, Baek SH, Bourk EM, Ohgi KA, Garcia-Bassets I, Sanjo H, Akira S, Kotol PF, Glass CK, Rosenfeld MG, 2006. Macrophage/cancer cell interactions mediate hormone resistance by a nuclear receptor derepression pathway. *Cell*, 124, 3, 615-29.
- Zhu S, Ehnert S, Rouß M, Häussling V, Aspera-Werz R, Chen T, Nussler A, 2018. From the Clinical Problem to the Basic Research—Co-Culture Models of Osteoblasts and Osteoclasts. *International journal of molecular sciences*, 19, 8, 2284.
- Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Seminars in cancer biology*, 181-5.

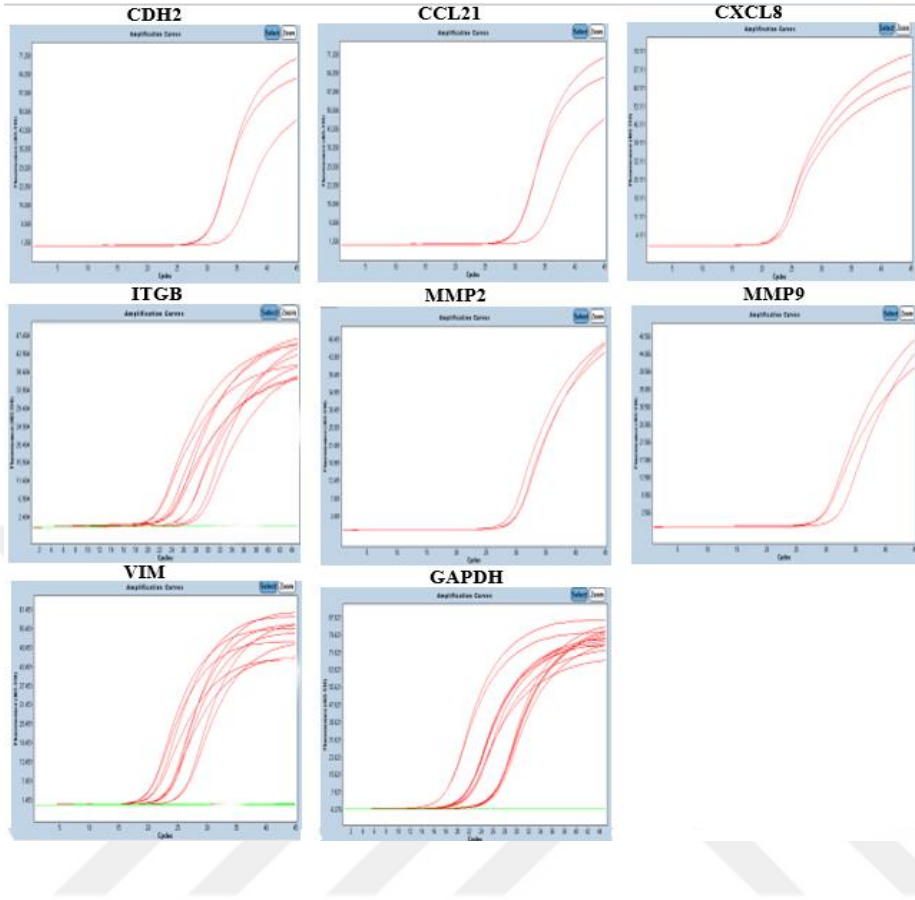


7. EKLER

EK-A. Etik Kurul Onay Belgesi

	T.C. SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI	
Toplantı Sayısı: 2017/13	Toplantı Tarihi : 26.07.2017
<p>Karar Sayısı 2017/212 S.Ü.Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Tülin ÇORA'nın "Endotel hücreleri ve larinks kanseri hücrelerinin karşılıklı konuşmalarının hücre çoğalması, invazyon ve metastaza etkilerinin incelenmesi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 08.06.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.</p> <p>Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra Prof.Dr.Tülin ÇORA'nın "Endotel hücreleri ve larinks kanseri hücrelerinin karşılıklı konuşmalarının hücre çoğalması, invazyon ve metastaza etkilerinin incelenmesi" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.</p>	
	

EK-B. CDH2, CCL21, CXCL8, ITGB, MMP2, MMP9, VIM, GAPDH genlerinin RT-qPCR amplifikasyon eğrileri.



8. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara’da doğdu. Ortaokulu Tevfik İleri Anadolu İmamhatip Lisesi’nde, liseyi Özel Muradiye Fen Lisesi’nde tamamladı. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü 2008 yılında bitirdi. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD’de yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2012 yılından itibaren Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD’de doktora eğitimine devam etmektedir. 2013 yılından beri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde (İLTEK) öğretim görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir oğlu vardır.

