

## Ehrlich Solid Tümörlerinde Kanser Kök Hücre Varlığının İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Gözde Özge ÖNDER <sup>1</sup>, Saim ÖZDAMAR <sup>2</sup>, Mehtap NİSARİ <sup>3</sup>, Tolga ERTEKİN <sup>4</sup>

### ÖZ

**Amaç:** Tümör gelişimi ve devamlılığında kanser hücrelerinin kendi başlarına hareket etmelerinin yanı sıra kanser kök hücrelerinin kanseri oluşturduğu, aynı zamanda kanserin nüks ve metastazında rolleri olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda, meme kanseri kökenli olduğu bilinen ve verildiği farede tümör oluşturabilen Ehrlich asit tümörünün (EAT) meme kanser kök hücre yüzey belirteçlerine sahip olup olmadığı ve niş oluşturup oluşturmadığı belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada deneysel kanser modeli oluşturmak için EAT hücreleri 13 adet Balb/C farenin ense bölgesine subkutan enjekte edilerek solid tümör gelişimi sağlandı. Deneyin 14. gününde anestezi altında tümör dokuları alındı. Dokulardan alınan kesitlere Hematoksilen&Eozin ve Masson'un üçlü boyaması uygulandı. Ayrıca dokular meme kanseri kök hücresi belirteçleri olan CD44 ve CD24 ekspresyonu ile birlikte niş belirteci olan periostin ekspresyonunu belirlemek için immunohistokimyasal olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Deneklere eşit sayıda hücre verilmesine rağmen denekler arasında tümör boyutları, hacimleri ve denek ağırlıklarının farklı olduğu gözlemlendi. Dokularda CD44'ün ve CD24'ün hem hücre sitoplazmasında hem de hücre membranında, periostin'in ekstraselüler matriksde eksprese olduğu belirlendi.

**Sonuç:** Hem sitoplazmik hem de membranda CD44 ekspresyonunun anormal olabileceği nedeniyle kanser kök hücresi varlığıyla ilgili bilgi elde etmemizi sınırlandırmıştır. Ayrıca hücrelerin CD24+ oluşu olgun kanser hücrelerinin tümör kitlesi içinde bulunduğunu göstermiştir. Bununla birlikte EAT, periostin ekspresyonunu artırmak yoluyla kendi nişini oluşturma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ehrlich solid tümör; kanser kök hücresi; immunohistokimya.

## Immunohistochemical Investigation of Availability of Cancer Stem Cells in Ehrlich Solid Tumors

### ABSTRACT

**Aim:** As well as cancer cells act their own in tumor growth and maintaining, it is thought that cancer stem cells generate cancer and play an important role in cancer relapse and metastasis. It's aimed to determine whether Ehrlich acid carcinoma(EAC), which is known to have breast cancer origin and can form a tumor in the mouse to which it is given, has breast cancer stem cell markers and whether they generate its own niche.

**Material and Methods:** To create an experimental cancer model, EAC cells were injected subcutaneously into the neck of 13 Balb/C mice and solid tumor was developed. Tumor tissues were removed under anesthesia on the 14th day of the experiment. Tumor sections were stained Hematoxylin&Eosin and Masson's Trichrome. Then, tissues were evaluated immunohistochemically to determine the expression of breast cancer stem cell markers, CD44, CD24, and the expression of the niche marker, periostin.

**Results:** Although the same numbers of EAC cells were injected to animal hosts, solid tumor's size and volume and animal host's weight were different from each other. CD44 and CD24 staining were detected both cytoplasm and

1 Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

2 Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

3 Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

4 Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

\*Bu çalışma 30 Nisan - 03 Mayıs 2016 tarihlerinde İzmir'de gerçekleşen XIII. Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Gözde Özge ÖNDER, e-mail: gozdekorkmaz@erciyes.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 09.06.2020, Kabul Tarihi / Accepted: 01.02.2021

membrane of tumor cells, periostin was expressed in extracellular matrix in solid tumor.

**Conclusion:** It limited to obtain information about the presence of cancer stem cells, since CD44 expression in both cytoplasmic and membrane may be abnormal. In addition, CD24+ cells showed that mature cancer cells are within the tumor mass. However, EAC has shown its ability to form its own niche by increasing the expression of periostin.

**Keywords:** Ehrlich solid tumor; cancer stem cell; immunohistochemistry.

## GİRİŞ

Meme kanseri, dünya genelinde kadınları etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (1). Günümüzde kadınlarda meme kanseri görülme sıklığında artma ancak mortalitede azalma olduğu dikkati çekmektedir. Bu durumun gelişen radyoloji ve nükleer tıp teknolojisi, ileri tedavi yöntemleri ile meme kanserli olguların erken teşhis imkanlarının fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (2). Bununla birlikte, bazı kişilerde tedaviye olumlu yanıt alınamaması ya da hastalığın nüksetmesi çok sık görülen bir durumdur (3). Son dönemde odaklanılan kanser kök hücresi teorisi ile bu durum daha iyi açıklanabilmektedir. Kanser oluşumunda, devamlılığında ve dağılmasında, tümör kitlesi içinde kontrolsüz bir şekilde davranış gösterebilen kanser kök hücrelerinin (KKH) rolü olduğu düşünülmektedir. KKH'leri kendini yenileyebilir ve tümörü oluşturup sürdürebilirler (4). Bu hücreler kemoterapi ve/veya radyoterapiye karşı dirençlidirler (5). Bundan dolayı, günümüzde kanserin teşhis ve tedavisindeki başarı oranını artırmak için tümör dokusundaki KKH'lerini tanımlamak ve bu hücreleri hedefleyip yok etmek düşüncesi üzerine odaklanılmaktadır.

Erken evrede tümör hücrelerini tanımlanmasında, tanısı konmuş hastaların tedavi protokollerinin oluşturulmasında ve uygulanan bu protokollerin hastadaki yanıtının değerlendirilmesinde tümör hücre yüzeylerinde bulunan yüzey antijenlerinden yararlanılmaktadır (6). Diğer birçok hücrede olduğu gibi KKH'lerinin de tanımlanmış yüzey antijenleri bulunmaktadır. Meme kanseri kök hücresi ise CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>-/low</sup> hücreler olarak tanımlanmışlardır (7). KKH'leri de dokular içerisinde bulunan özelleşmiş mikroçevre olarak tanımlanan spesifik nişleri içerisinde yaşamını sürdürmektedir. Bu mikroçevredeki sitokinler ve büyüme faktörleri gibi moleküller, kanser hücrelerinin yaşamını devam ettirmesi, birbirleriyle ya da diğer hücrelerle iletişim kurması, sinyal iletimi ve hücre kaderi için oldukça etkilidirler (8). Malanchi ve arkadaşları (9) çalışmalarında bir stroma proteini olan periostin'in, metastatik niş ortamı ile KKH arasındaki ilişkiyi düzenleyen protein olduğunu göstermişlerdir.

Son zamanlarda kanser tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda, hücre kültürü ve moleküler biyoloji teknikleri sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak tedavi için araştırılan bu maddelerin metabolizma yanıtına dair bu tekniklerin yetersiz kalması nedeniyle deneysel hayvan modellerinin kullanılması ön plana çıkmaktadır (10). Bununla birlikte, bu araştırmalar için uygun deneysel hayvan modelinin tercih edilmesi çok önemlidir. Bu

amaçla, farklı deneysel kanser modelleri geliştirilmiştir (11). Bu modellerden biri olan EAT, spontan meme adenokarsinomasıdır (12, 13). EAT'nin transplantasyon kapasitesi oldukça yüksektir (10). Araştırma amacına göre asit form veya solid form olarak kullanılabilir. Eğer tümör hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı farelere intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilirse asit (sıvı) form, subkutan olarak enjekte edilirse solid form elde edilmektedir (14, 15). Ancak EAT için sahip olduğu yüzey antijenlerine dair bilgiler oldukça kısıtlıdır. Biz de çalışmamızda kökeni meme kanseri olduğu bilinen ve farede tümör dokusu geliştirebilen EAT'nin, meme kanseri kök hücresi yüzey antijenlerine sahip olup olmadığını ve doku kitlesinde kendisine ait niş oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmanın etik kurul onayı 11/12/2013 tarih ve 13/146 no'su ile Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan alındı. Öncelikle Gaziantep Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2 adet peritonunda sıvı EAT hücreleri içeren stok fare temin edildi. Bu fareler çalışmamızda solid tümör oluşturulmasında kullanıldı (Şekil 1). Solid tümör modeli Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 13 adet Balb/C farede (8-10 haftalık) oluşturuldu. Stok farelerin peritonundan alınan EAT hücreleri sayıldıktan sonra  $1 \times 10^6$  hücre her bir farenin ense bölgesine subkutan olarak enjekte edildi. Ondördüncü günün sonunda elle palpe edildiğinde solid tümör dokularının gelişmiş olduğu belirlendi. Çalışmada ki farelerin ağırlıkları, EAT hücre süspansiyonunun subkutan enjeksiyonundan hemen sonra (birinci gün) ve dekapitasyondan önce 14.günde tartıldı. Solid tümör kitleleri anestezi altında çıkarıldı ve sürgülü kumpas ile boyutları ölçüldü. "Tümör hacmi(mm<sup>3</sup>)= En<sup>2</sup> x Boy x 0,52" formülüne göre tümör hacimleri hesaplandı (16).



**Şekil 1.** Solid tümör oluşturulmasında kullanılan stok fare. Stok farenin peritonundan enjektörle çekilen Ehrlich asit tümör sıvısı.

## Histopatolojik Uygulama

Histopatolojik incelemeler için tümör kitleleri %10'luk formaldehit solüsyonu ile fikse edildi. Dokular dereceli

artan etil alkol serilerinden geçirilip, ksilende şeffaflandırdıktan sonra parafin içerisinde bloklandı. Parafin bloklardan 5-6 µm'lik kesitler alınarak polilizin kaplı lamlara yayıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla hazırlanan lamlar Hematoksilin&Eozin (H&E) ve Masson'un üçlü boyama yöntemi ile boyanarak Olympus BX51 mikroskobu (Tokyo, Japonya) altında incelendi (17).

### İmmünohistokimyasal Uygulama

Tümör dokularındaki CD44, CD24 ve periostin ekspresyonu immünohistokimyasal olarak belirlendi. Bu amaçla lamlara avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı.

Öncelikle kesitlerin ksilen ile deparafinizasyonu sağlandı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip rehidrate edildi. Daha sonra %10'luk sitrat tamponunda (pH:6.0) 300W'da 10 dakika inkübasyona bırakılan kesitler, süre sonunda 10 dakika oda koşullarında bekletildi. %3 hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra Fosfat tamponu (PBS) ile yıkama yapıldı. Daha sonraki aşamalarda üretici firmanın direktifleri doğrultusunda Large Volume Detection System (Thermo Scientific, Waltham, Amerika) kiti uygulandı. Non-spesifik oluşumları engellemek üzere lamlara Ultra V block uygulandı. Hemen ardından kesitler nem kamarası içinde CD44 (1:200, Bioss, Boston, Massachusetts, Amerika)/CD24 (1:350, Novus Biologicals, Littleton, Amerika)/Periostin (1:100, Santa Cruz, Dallas, Teksas, Amerika) birincil antikoları ile +4°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol için PBS kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler 10 dakika biotinli-sekonder antikorda bekletildi. Yıkama işleminden sonra kesitlere 10 dakika streptavidin peroksidaz ile muamele edildi. Kromojen olarak 3,3-diamino benzinin 1-5 dakika uygulandıktan sonra kesitler distile su ile yıkandı. Gill hematoksilin ile çekirdek boyaması yapıldıktan sonra kesitler birkaç kez distile su ile yıkandı. Kesitlerin CD44/CD24/Periostin immunoreaktivitesi Olympus BX51 mikroskobunda (Tokyo, Japonya) incelendi (18).

### İstatistiksel Analiz

İmmünohistokimyasal sonuçlar değerlendirilirken, her bir proteinin immünreaktivite yoğunluğu Image J programı (ImageJ, Bethesda, Amerika) ile hesaplandı. Değerlendirme yapılırken kitle içerisinde nekrotik alanların dışında kalan ve çekirdeği belirgin olarak görülen hücre alanları dikkate alındı. Her bir fareye ait dokuların rastgele kesitlerinden 10 farklı alan (x40) ölçümde kullanıldı. Her bir denek için kendi ortalama immunoreaktivite yoğunluğu hesaplandıktan sonra tüm denekler için ortalama immunoreaktivite yoğunluğu belirlendi (18).

### BULGULAR

Deney sonunda farelerin ense bölgesinde çoğalarak farklı hacimlerde tümör kitleleri deri altında şişkinlik oluşturduğu belirlendi. On üçüncü günde deneklerden biri öldü ve çalışma dışı bırakıldı. Deney başlangıcında farelerin ağırlıkları 25–35 g arasında olmak üzere ortalama 30 g'dı. Deneyin son gününde ise deneklerin ağırlıkları 27–40 g arasında olup ortalama 34 g'dı. Deney süresince farelerin ağırlıkları ortalama 4 g artmıştı (Tablo

1). Tümör dokularının enleri ve boyları sürgülü kumpas ile ölçüldükten sonra hacimleri hesaplandı. En küçük tümör hacmi 319.80 mm<sup>3</sup> iken, en yüksek tümör hacmi 7977.11 mm<sup>3</sup>'dü. Ortalama tümör hacmi 2271.07 mm<sup>3</sup> olarak belirlendi (Tablo 2).

**Tablo 1.** Deneklerin birinci ve 14. gündeki ağırlıkları

Hayvan	1. gün ağırlık	14. gün ağırlık
1. Denek	29 g	31 g
2. Denek	30 g	30 g
3. Denek	30 g	27 g
4. Denek	25 g	30 g
5. Denek	33 g	36 g
6. Denek	29 g	37 g
7. Denek	27 g	33 g
8. Denek	32 g	36 g
9. Denek	30 g	36 g
10. Denek	32 g	37 g
11. Denek	29 g	40 g
12. Denek	35 g	38 g
<b>Ortalama ağırlık</b>	30 g	34 g

**Tablo 2.** Deneklerden elde edilen solid tümör boyutları ve hacimleri

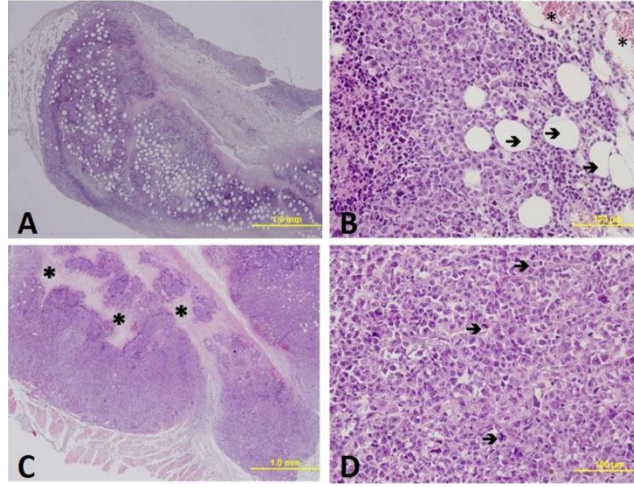
Hayvan	Tümör Boyutu		Tümör Hacmi
	Eni	Boyu	
1.Denek	7.1 mm	12.2 mm	319.80 mm <sup>3</sup>
2.Denek	9.51 mm	13.24 mm	622.66 mm <sup>3</sup>
3.Denek	10.10 mm	7.68 mm	407.39 mm <sup>3</sup>
4.Denek	12.61 mm	17.87 mm	1477.60 mm <sup>3</sup>
5.Denek	15.69 mm	12.39 mm	1586.06 mm <sup>3</sup>
6.Denek	14.62 mm	18.74 mm	2082.90 mm <sup>3</sup>
7.Denek	14.36 mm	10.68 mm	1145.21 mm <sup>3</sup>
8.Denek	21.95 mm	31.84 mm	7977.11 mm <sup>3</sup>
9.Denek	17.03 mm	24.23 mm	3654.15 mm <sup>3</sup>
10.Denek	11.82 mm	16.10 mm	1169.67 mm <sup>3</sup>
11.Denek	16.85 mm	27.56 mm	4068.95 mm <sup>3</sup>
12.Denek	17.09 mm	18.05 mm	2741.35 mm <sup>3</sup>
<b>Ortalama</b>	14.06 mm	17.55 mm	2271.07 mm <sup>3</sup>

### Işık Mikroskopik Bulgular

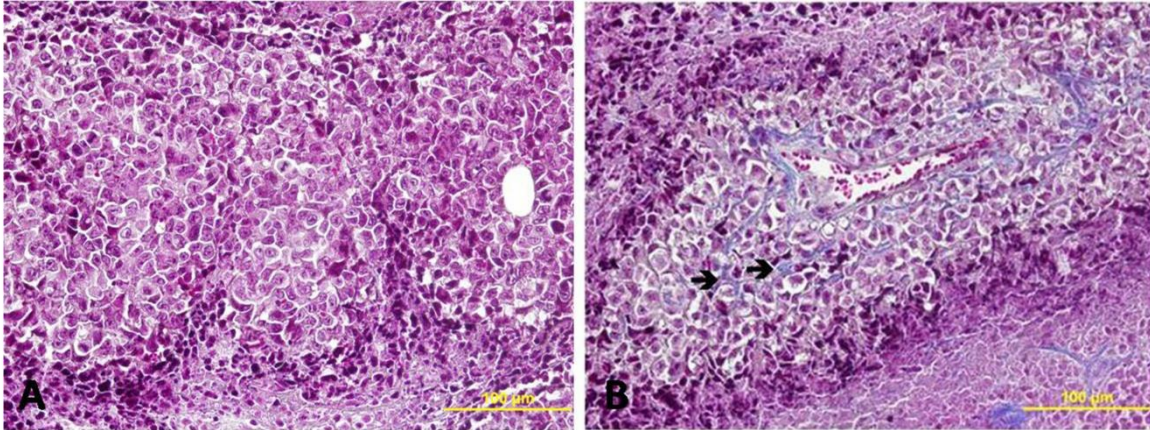
H&E ve Masson'un üçlü boyama tekniği ile boyanan tümör kesitleri incelendiğinde, dokunun etrafının bağ dokusu ile çevrelenmiş olduğu gözlemlendi. Tümör dokusunun piknotik çekirdeklerle ayırt edilen nekrotik alanlar ile lobülasyon benzeri görünüm sergilediği belirlendi. Ayrıca olgun tümör hücreleri arasında çok sayıda yağ hücresinin varlığı dikkati çekti (Şekil 2A). Bununla birlikte doku kitlesinin bol miktarda kan damarı içerdiği belirlendi. Canlı hücreler ökromatik nükleusları

ile nekrotik alanlardaki hücreler ise koyu nükleusları ile ayırt edildi (Şekil 2B). Ancak bazı bölgelerde nispeten daha az yağ hücresinin olduğu gözlemlendi (Şekil 2C). Tümör hücreleri incelendiğinde hücrelerin farklı büyüklük ve şekilde olduğu, hücrelerin bazılarının da

farklı mitotik evrelerde olduğu gözlemlendi (Şekil 2D). Dokulardaki kan damarlarının çevrelerinde ise bir miktar bağ doku alanlarının varlığı ve bu bölgede canlı hücrelerin yer aldığı izlendi (Şekil 3A-3B).



**Şekil 2.** A. Ehrlich solid tümörü genel görünümü (H&E, 4X). B. Ehrlich solid tümörü. Bol miktarda kan damarı (\*) ve yağ hücresinin (→) oluşturduğu stroma içerisinde farklı şekil ve büyüklükte çok sayıda hücre görülmektedir (H&E, 40X). C. Ehrlich solid tümörü. Tümör dokusunun derin bölgelerindeki nekrotik alanlar (\*) görülmektedir. (H&E, 4X). D. Ehrlich solid tümörü. Oklar mitotik figürleri göstermektedir (H&E, 40X).



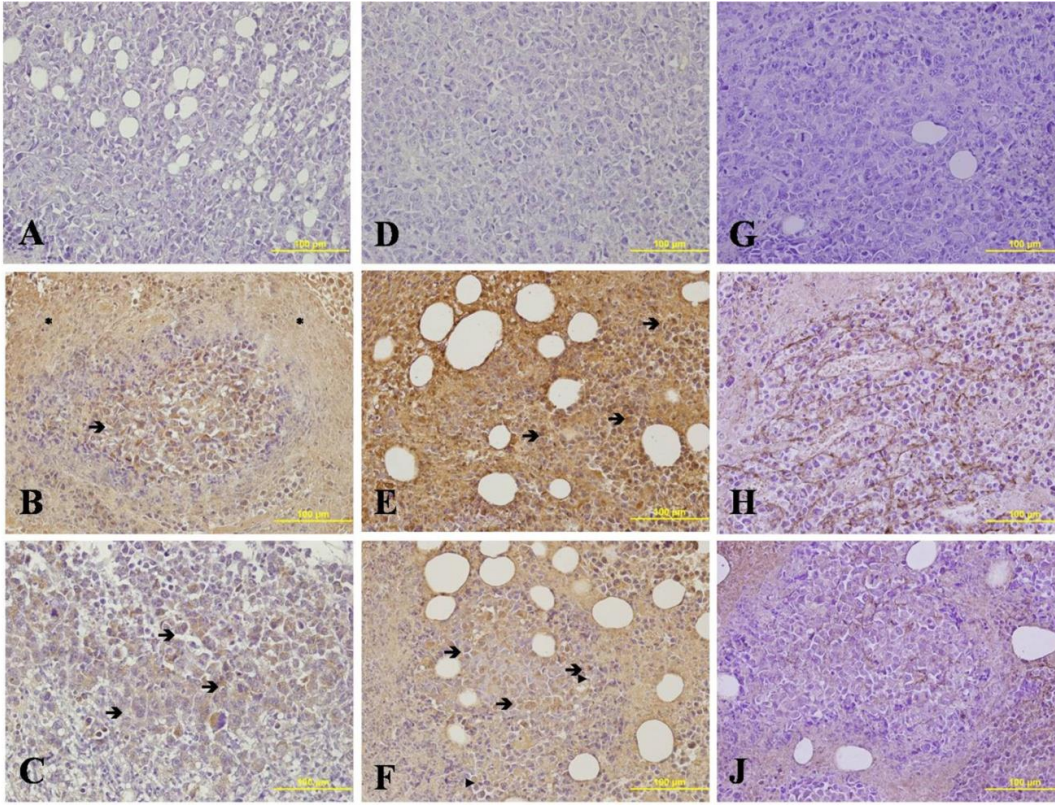
**Şekil 3.** A. Ehrlich solid tümörü. Bazı alanlarda tümör hücrelerinin arasında bağ dokusu gözlemlenmemiştir (Masson'un üçlü boyama, 40X). B. Ehrlich solid tümörü. Özellikle kan damarlarının bulunduğu alanlarda tümör hücrelerinin arasında bağ dokusu (→) gözlemlenmiştir (Masson'un üçlü boyama, 40X).

### İmmünohistokimyasal Bulgular

Tümör dokularında CD44, CD24 ve periostin ekspresyon düzeyleri immünohistokimyasal olarak belirlendi. CD44 ekspresyonları incelendiğinde tümör kitlesinde CD44'ün hücrelerin hem membran hem de sitoplazmasında eksprese olduğu gözlemlendi. Negatif kontrol dokusunda herhangi bir boyanma yoktu (Şekil 4A). CD44'ün bazı alanlarda yoğun (Şekil 4B), bazı alanlarda ise zayıf ekspresyon gösterdiği belirlendi. Tümör kitlesi içerisinde az da olsa CD44 ekspresyonu göstermeyen hücrelerde vardı (Şekil 4C).

Tümör dokularında CD24 ekspresyonu incelendiğinde, negatif kontrol dokusunda herhangi bir boyanmaya rastlanmadı (Şekil 4D). CD24'ün hücrelerin hem sitoplazmasında hem de membranında eksprese olduğu belirlendi. Bu ekspresyonun farklı yoğunluklarda olduğu ve aralarında CD24 eksprese etmeyen hücrelerin olduğu belirlendi (Şekil 4E-4F).

İmmünohistokimyasal boyama sonrasında periostin ekspresyonu incelendiğinde, negatif kontrol dokusunda herhangi bir periostin ekspresyonuna rastlanmadı (Şekil 4G). Periostinin ekstraselüler matrisi içerisinde farklı alanlarda farklı oranlarda eksprese olduğu gözlemlendi (Şekil 4H-4J).



**Şekil 4.** A. Ehrlich solid tümör dokusunda CD44 negatif kontrol dokusu görünümü. (CD44 immün işaretleme boyası, 40X). B. Ehrlich solid tümör dokusunda CD44 ekspresyonu görünümü. Tümör hücrelerini (→) nekrotik alanlar (\*) sarmış durumdadır (CD44 İmmünoperoksidaz boyası, 40X). C. Ehrlich solid tümör dokusunda CD44 ekspresyonu. Bazı deneklerde CD44 daha az yoğun (→) olarak görülmektedir (CD44 immünoperoksidaz boyası, 40X). D. Ehrlich solid tümör dokusunda CD24 negatif kontrol dokusu görünümü. (CD24 immünoperoksidaz boyası, 40X). E. Ehrlich solid tümör dokusunda CD24 ekspresyonu görünümü. Bazı alanlarda yoğun CD24 ekspresyonu gösteren hücreler (→) görülmektedir (CD24 İmmünoperoksidaz boyası, 40X). F. Ehrlich solid tümör dokusunda zayıf CD24 ekspresyonu gösteren hücreler (→) ve CD24- ekspresyon gösteren hücreler (◀) görülmektedir (CD24 İmmünoperoksidaz boyası, 40X). G. Ehrlich solid tümör dokusunda Periostin negatif kontrol dokusu görünümü. (Periostin immünoperoksidaz boyası, 40X). H. Ehrlich solid tümör dokusunda periostin ekspresyonu (Periostin immünoperoksidaz boyası, 40X). J. Ehrlich solid tümör dokusunda periostin ekspresyonu. Bazı alanlarda daha az yoğunlukta periostin ekspresyonu görülmektedir (Periostin immünoperoksidaz boyası, 40X).

## TARTIŞMA

Kontrolsüz çoğalan hücreler ile karakterize edilen kanser, çoğunlukla ölüme neden olan bir sağlık problemidir (19). Günümüzde kanser araştırmaları için farklı deneysel modeller geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan EAT, deneysel hayvan modellerinden biri olup araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir (12, 13). Ancak meme kanseri olduğu bilinen EAT'de tanımlayıcı herhangi bir yüzey antijeni tanımlanmamıştır. Bu çalışmada, EAT hücreleri ile oluşturulan solid tümör kitlesinin yapısını, gelişen tümör kitlesi içinde kanser kök hücresi belirteçlerinin eksprese edilip edilmediğini ve hücrelerin kendilerine ait nişe sahip olup olmadığını immunohistokimyasal yöntemlerle belirlemeyi amaçladık.

EAT ile deneysel kanser modeli oluşturmak üzere gerekli hücre sayısını Zeybek çalışmasında  $1 \times 10^6$ /ml olarak belirlemiştir. Hücre süspansiyonunu model oluşturulacak fareye subkutan enjekte ettiklerinde yaklaşık yedi gün sonra konak farede ölçülebilecek boyutlarda katı tümör kitlesi saptayabilmişlerdir (11). Ekinci ise çalışmasında solid tümör oluştuktan bir hafta sonrasında hücresel düzeyde kitleyi incelediklerinde merkezi bölgelerde nekrotik alanların varlığını ve aralarında farklı boyutlarda

hücrelerin bulunduğunu bildirmişlerdir (20). Ayrıca tümör kitlesi içinde proliferasyon gösteren hücrelerin varlığına da rastlanmıştır (21). Bizim çalışmamızda ise bu çalışmalara benzer şekilde bir hafta sonrasında farelerin ense bölgesinde tümör dokularının var olduğu gözlemlendi. Ancak çalışmada uygulanacak analizler için daha geniş tümör kitlesi gerektiğinden tümörün iki hafta kadar gelişmesi beklendi. Yapılan histolojik analizler sonucunda tümör dokusunun merkezi kısımlarında nekrotik alanların çevrelediği çekirdek varlığıyla ayırt ettiğimiz canlı hücrelerin, şekil ve büyüklüklerinin farklı olduğu belirlendi. Tümörün hızlı gelişimi sebebiyle farklı mitotik evredeki hücrelerin varlığı da dikkati çekti.

Meme kanseri kök hücreleri ile ilgili yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu insana ait tümör dokularında yapılmıştır. Meme kanseri kök hücrelerinin yüzey antijenlerinin tanımlanması ile birlikte, Wang ve ark (22), Ricardo ve ark (23) ve Abraham ve ark (24) 'nın çalışmalarında hücre membranında CD44 ekspresyonunun CD44+ olarak kabul edildiğini ve CD44+ CD24-/low hücrelerin meme kanser kök hücresi olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, CD44 ekspresyonunun hücrelere kök hücre benzeri özellik kazandırdığı bildirilmiştir (23). Ancak bazı çalışmalarda, CD44'ün

transmembran protein olarak tanımlanmasına rağmen kanser hücrelerinde sitoplazmada da eksprese olabileceği belirtilmiştir (25-28). Sitoplazmik CD44 ekspresyonunu Berner ve ark (30) Golgi aygıtlarındaki CD44 proteinleri ya da anormal CD44 moleküllerinin üretimi şeklinde açıklamışlardır. Bununla birlikte CD44'ün sitoplazmada da görülüp, membranda yetersiz ekspresyonunun hücre-ekstraselüler matriks ve hücre-hücre iletişimlerine karşı azalan adezyona yol açabileceğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışmada, EAT hücrelerinin yeni bir fareye transplante edildikten sonra oluşturdukları tümör kitlesi içerisinde CD44 ekspresyonunun hem sitoplazmik hemde membranda oluşu KKH hakkında bilgi verilmesini engellerken CD44+ olma özelliğinin dokudaki hücrelerin kök hücre benzeri özellikler taşıdığını göstermiştir.

Meme kanseri kök hücrelerinde CD24 ekspresyonunun olmadığı belirtilmesinin yanı sıra CD24 eksprese eden hücrelerde farklılaşmış epitelyal özelliklerin olduğu bildirilmiştir (23). Ayrıca hücrelerde CD24 ekspresyonu meme kanserlerinde metastazla ilişkilendirilmektedir (30-32). Mevcut çalışmada, EAT solid tümör dokusunda CD24'ün sitoplazmada ekspresyonu gözlemlendi. Hatta CD24+ hücrelerin yoğun bir şekilde görülmesi dokudaki hücrelerin olgunlaştığını göstermiştir. Ancak aralarda az da olsa görülen CD24- hücreler, kitle içerisinde farklılaşmamış hücrelerin olabileceğini düşündürmüştür. Nişten gelen sinyallerin, KKH'lerinin ilgili dokuya göç etmesi ve yerleşmesinin yanı sıra kemoterapiye direnç göstermesinin bir nedeni olabileceği bildirilmiştir (33). Malanchi ve arkadaşları çalışmalarında, sağlıklı ve tümör dokularında fibroblastların bir stroma proteini olan periostin'i sentezlediğini belirtmişlerdir. Diğer dokulara metastazı için tümör hücrelerinin, o dokuda bulunan fibroblastları yönlendirerek periostin ekspresyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, periostinin işlevinin engellenmesinin metastazı durdurduğunu belirtmişlerdir (9). Gillan ve ark ise, ovaryuma ait epitelyal kanser hücrelerinin periostin eksprese ettiklerini, periostinin migrasyon ve adezyon ile kanser hücrelerinin intraperitoneal yayılımını düzenleyebileceğini ileri sürmektedirler (34). Mevcut çalışmada da, EAT solid tümör kitlesinde periostinin ekstraselüler matrikste eksprese olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla periostin ekspresyonu, EAT hücrelerinin de kendi nişini oluşturarak enjekte edildikleri bölgede tümör kitlesi oluşturabildiklerini düşündürmüştür.

## SONUÇ

Sonuç olarak, çalışmamızda EAT hücreleri ile oluşturulan tümör kitlesinde meme kanseri kök hücresi belirteçleri olan CD44 ve CD24 ekspresyonlarına bakıldığında, CD44'ün hücre membranı yanı sıra sitoplazmada da eksprese olması KKH belirlenmesini sınırlandırmıştır. Bununla birlikte, kitle içerisinde yoğun CD24+ hücrelerin varlığının tümör dokusundaki hücrelerin çoğunluğunun farklılaşmış olduğunu göstermiştir. Ayrıca yoğun CD24 ekspresyonu, EAT hücrelerinin metastaz yapabilme yeteneğini ve yüksek transplantasyon gücünü CD24 ile sağlayabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte tümör kitlesi içerisinde periostin proteininin varlığı EAT'nin enjekte edildiği farede kendi nişini oluşturabildiğini göstermiştir.

**Yazarların Katkıları:** Fikir/Kavram: S.Ö.; Tasarım: G.Ö.Ö., S.Ö.; Veri Toplama: G.Ö.Ö., M.N., T.E.; Analiz ve Yorum: G.Ö.Ö., S.Ö., M.N., T.E.; Literatür Taraması: G.Ö.Ö.; Makale Yazımı: G.Ö.Ö.; Eleştirel İnceleme: S.Ö.

## KAYNAKLAR

1. Somunoğlu S. Meme kanseri: belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi. 2009; 4: 103-22.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics. CA Cancer J Clin. 2010; 60(5): 277-300.
3. Özmen V. Dünya'da ve Türkiye'de meme kanseri. Meme Sağlığı Dergisi. 2008; 4: 7-9.
4. Carke MF. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. Cancer Res. 2006; 66(19): 9339-44.
5. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2012; 44(12): 2144-51.
6. Türkçapar N, Özden A. Tümör markırları ve klinik önemi. Güncel Gastroenteroloji. 2005; 9(4): 271-81.
7. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci. 2003; 100(7): 3983-88.
8. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. Molecular Cell. 2010; 39(1): 133-44.
9. Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. Nature. 2012; 481(7379): 85- 9.
10. Zeybek Ü. Kanser araştırmaları ve deneysel modeller. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi. 2013; 2(5): 1-12.
11. Zeybek Ü. Deneysel kanser modelleri. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu;2003;s 283-320.
12. Aktaş E. Ehrlich Asit Sıvısının L- Hücrelerinin Çoğalma Hızına Etkisi [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul Üniversitesi; 1996.
13. Taşkın Eİ. Ehrlich ascites tümörü ile Balb/c ırkı farelerde oluşturulmuş solid tümör modelinde curcuminin apoptoz üzerine etkileri[Doktora Tezi]. İstanbul Üniversitesi; 2002.
14. Okay HG. Deneysel EAT oluşturulan fare karaciğer plazmasında nitrik oksit metabolizmasının incelenmesi[Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul Üniversitesi; 1998.
15. Zeybek Ü. En uygun Ehrlich ascites tümör modellerinin farklı soy ve cinsiyetteki farelerde gösterilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul Üniversitesi; 1996.
16. O'Reilly M, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell. 1997; 88(2): 277-85.
17. Yay A, Onder GO, Ozdamar S, Bahadır A, Aytekin M, Baran M. The effects of leptin on rat brain development; an experimental study. Int J Pept Res Ther. 2019; 25: 1605-16.

18. Yay A, Onses MS, Sahmetlioglu E, Ceyhan A, Pekdemir S, Onder GO, et al. Raman spectroscopy: A novel experimental approach to evaluating cisplatin induced tissue damage. *Talanta*. 2020; 207: 120343
19. Kayaalp SO. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik İlaçlar. In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 8. basım, cilt 1. Ankara: Feryal Matbaacılık; 1998.
20. Ekinci G. Katı Ehrlich Ascites Tümörünün büyüme kinetiği. [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2000.
21. Kabel AM. Effect of combination between methotrexate and histone deacetylase inhibitors on transplantable tumor model. *American Journal of Medicine Studies*. 2014; 2(1): 12-8.
22. Wang Z, Shi Q, Wang Z, Gu Y, Shen Y, Sun M, et al. Clinicopathological correlation of cancer stem cell markers CD44, CD24, VEGF and HIF-1 $\alpha$  in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: An immunohistochemistry-based pilot study. *Pathology-Research and Practise*. 2011; 207(8): 505-13.
23. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*. 2011; 64(11): 937-46.
24. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+ CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 1154-9.
25. Saegusa M, Hashimura M, Machida D, Okayasu I. Downregulation of CD44 standard and variant isoforms during the development and progression of uterine cervical tumours. *J Pathol*. 1999; 187(2): 173-83.
26. Berner HS, Nesland JM. Expression of CD44 isoforms in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2001; 65(1): 23-9.
27. Regauer S, Ott A, Berghold A, Beham A. CD44 expression in sinonasal melanomas: is loss of isoform expression associated with advanced tumour stage? *J Pathol*. 1999; 187(2): 184-90.
28. Beham-Schmid C, Heider KH, Hoefler G, Zatloukal K. Expression of CD44 splice variant v10 in Hodgkin's disease is associated with aggressive behaviour and high risk of relapse. *J Pathol*. 1998; 186(4): 383-9.
29. Berner HS, Suo Z, Risberg B, Villman K, Karlsson MG, Nesland JM. Clinicopathological associations of CD44 mRNA and protein expression in primary breast carcinomas. *Histopathology*. 2003; 42(6): 546-54.
30. Aigner S, Stoecker Z, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M et al. CD24, a mucin type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumors. *Blood*. 1997; 89(9): 3385-95.
31. Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *Faseb J*. 1998; 12(12): 1241-51.
32. Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *Journal of Molecular Histology*. 2004; 35(3): 255-62.
33. Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, Hijikata A, Kitamura H, Tanaka S, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(11): 1315-21.
34. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is ligand for  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  integrins and promotes cell motility. *Cancer Research*. 2002; 62(18): 5358-64.