Osmangazi Journal of Med, 2025;47(4):523-531
DOI: 10.20515/otd.1637816

Research Article
Araştırma Makalesi

Osmangazi Journal of Medicine
e-ISSN: 2587-1579

Hematopoetik Kök Hücrelerin Kemik Metastazındaki Rolü: Hayvan Modellerinde Tümör Gelişimi Üzerindeki Etkisi

The Role of Hematopoietic Stem Cells in Bone Metastasis: Effects on Tumor Progression in Animal Models

[1,2]Veli Kaan Aydın

[1]Sheffield Üniversitesi, Klinik Tıp Bölümü ve Mellanby Kas-iskelet Araştırmaları Merkezi, Sheffield, Birleşik Krallık.
[2]Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

ORCID ID of the authors
VKA. 0000-0001-8371-6239

Correspondence / Sorumlu yazar:
Veli Kaan AYDIN

1Sheffield Üniversitesi, Klinik Tıp Bölümü ve Mellanby Kas-iskelet Araştırmaları Merkezi, Sheffield, Birleşik Krallık.

2Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

e-mail: vkaydin@pau.edu.tr

Abstract: Despite being a treatable disease, metastatic breast cancer remains the second leading cause of cancer-related mortality among women. It frequently spreads to the bone, yet the precise biological mechanisms underlying this process are not fully understood. Literature suggests that hematopoietic stem cells (HSCs) play a key role in the metastatic niche, responding to microenvironmental cues similar to cancer cells. This interaction implies potential competition between HSCs and cancer cells for the bone marrow niche. Accordingly, HSC depletion has been shown to enhance the colonization of breast cancer cells in the endosteal niche, though its impact on tumor progression and clinical outcomes remains uncertain. This study explored the effects of HSC mobilization on tumor progression using both immunocompromised (xenograft) and immunocompetent (syngeneic) mouse models. BALB/c Nude mice received AMD3100 (CXCR4 antagonist) for five days, followed by intracardiac injection of MDA-MB-231 cells to establish a metastatic model, with tumor progression tracked with in vivo imaging (IVIS). Additionally, HSC mobilization was induced in BALB/c and C57BL/6j mice using AMD3100 and G-CSF, identifying BALB/c–G-CSF as the most effective combination. A syngeneic model was then developed using intracardiac injection of 4T1 mouse breast cancer cells, mimicking the xenograft approach. Results revealed that HSC mobilization accelerated tumor formation in both models but did not significantly affect disease progression or metastasis to other organs. These findings underscore the critical role of HSCs in bone metastasis and suggest their potential as therapeutic targets in metastatic breast cancer.
Keywords: Hematopoietic Stem Cells, Breast Cancer, Animal Model, Mobilization, Bone Metastasis

Özet: Meme kanseri tedavi edilebilir olmasına rağmen metastatik formu, kadınlarda kanser kaynaklı ölümlerin ikinci en sık nedenidir. Meme kanseri sıklıkla kemik metastazı yapar; ancak bu sürecin biyolojik mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Literatürde, hematopoetik kök hücrelerin (HKH) metastatik nişte önemli bir rol oynayabileceği ve kanser hücreleri ile benzer mikro çevresel sinyallere yanıt verebileceği öne sürülmektedir. Bu durum, HKH'lerin ve kanser hücrelerinin kemik iliğinde ortak bir niş paylaşabileceğini ve rekabet halinde olabileceklerini düşündürmektedir. Bu hipotez doğrultusunda, HKH'lerin ortamdan uzaklaştırılması durumunda meme kanseri hücrelerinin endosteal nişe daha fazla yerleştiği gözlemlenmiştir. Ancak, bu sürecin tümör gelişimi üzerindeki etkileri ve klinik yansımaları henüz netlik kazanmamıştır. Bu çalışmada, HKH mobilizasyonunun tümör gelişimine etkilerini incelemek amacıyla bağışıklığı baskılanmış ksenograft ve eş genetik (syngeneik) tümör modelleri kullanılmıştır. İlk olarak, BALB/c Nude farelerine 5 gün boyunca AMD3100 (CXCR4 antagonisti) uygulandıktan sonra MDA-MB-231 hücreleri intrakardiyak yol ile enjekte edilerek metastatik bir model oluşturulmuş ve tümör gelişimi in-vivo görüntüleme (IVIS) yöntemiyle takip edilmiştir. Daha sonra, BALB/c ve C57BL/6j farelerinde AMD3100 ve G-CSF kullanılarak HKH mobilizasyonu syngeneik model seçimi amacıyla gerçekleştirilmiş; yapılan koloni analizleri sonucunda en verimli mobilizasyonun BALB/c–G-CSF kombinasyonu ile gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu bulgu sonucunda ksenograft çalışmasına benzer bir syngeneik model 4T1 fare meme kanserinin G-CSF uygulamasından sonra intrakardiyak enjeksiyonuyla oluşturulmuş ve tümör gelişimi IVIS yöntemiyle takip edilmiştir. Deney sonuçları, her iki modelde de HKH mobilizasyonunun tümör oluşumunu hızlandırdığını, ancak ilerleyen hastalık süreci ve diğer organ metastazları üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermiştir. Bulgular, HKH'lerin kemik metastazındaki kritik rolünü vurgulamakta ve bu hücrelerin metastatik sürecin yönetiminde potansiyel terapötik hedefler olabileceğini göstermektedir.
Anahtar Kelimeler: Hematopoetik Kök Hücreler, Meme Kanseri, Hayvan Modeli, Mobilizasyon, Kemik Metastazı

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma Sheffield Üniversitesi Hayvan Refahı ve Etik İnceleme Kurumu tarafından incelenip onaylanmıştır. (Tarih: 01.01.2022, ISP: VKA7, PIL: ID5F9D530)
Telif Hakkı Devir Formu: Yazar tarafından Telif Hakkı Devir Formu imzalanmıştır.
Hakem Değerlendirmesi: Hakem değerlendirmesinden geçmiştir.
Yazar Katkı Oranları: Bu çalışma tek yazarlı bir çalışma olup, çalışmanın tasarımı, veri toplama, analiz, yorumlama ve makalenin yazımı dahil tüm aşamaları VKA tarafından gerçekleştirilmiştir.
Çıkar Çatışması Bildirimi:
Yazar, bu çalışma ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.
Destek ve Teşekkür Beyanı: Bu çalışma 1416 sayılı kanun kapsamında Türkiye Cumhuriyeti Millî Eğitim Bakanlığı, Yurt Dışı Lisansüstü Eğitim bursu tarafından karşılanmıştır.

Received : 11.02.2025
Accepted 18.04.2025
Published :.06.05.2025

How to cite/ Atıf için: Aydın VK. Hematopoetik Kök Hücrelerin Kemik Metastazındaki Rolü: Hayvan Modellerinde Tümör Gelişimi Üzerindeki Etkisi, Osmangazi Journal of Medicine, 2025;47(4):523-531

1. Giriş

Günümüzde meme kanseri 70-80% oranında tedavi edilebilir durumdadır. Buna rağmen metastatik meme kanseri, akciğer kanserinden sonra kadınlarda kanser kaynaklı ölümlerden sorumlu ikinci kanser türüdür [1]. Tümör hücreleri akciğer ve kemik başta olmak üzere pek çok farklı uzak organa yayılım gösterebilirler ancak girişimsel tedavinin kısıtlı olması sebebiyle kemik doku büyük bir tehlike oluşturmaktadır [2]. Daha önce yapılmış çalışmalar kemik dokusu içerisine kanserin yayılım gösterirken hangi süreçleri takip ettiğini incelemiş ve hayvan modelleri kullanarak CXCR4/CXCL12 gibi sinyal yolaklarının önem arz edebileceği üzerinde durmuşlardır [3]. Ancak karmaşık süreçler ve birden fazla faktörün etki etmesi sebebiyle meme kanserinin kesin yayılım süreci, uykuda kalıp kalmama mekanizmaları ya da tümör gelişiminin tetiklenme süreci tam olarak açıklanabilmiş değildir.

Yapılmış çalışmalar gösteriyor ki hematopoetik kök hücrelerin (HKH) bulunduğu endosteal niş meme kanserinde metastatik niş ile ortak olabilir. HKH'lerde CXCR4/CXCL12 yol izini kullanarak hem endosteal nişe tutunur hem de büyüme gelişme gibi önemli metabolik faaliyetlerde bu yolu kullanırlar [4]. AMD3100 ve G-CSF'in (Granülosit koloni-uyarıcı faktör), kemik iliğinden HKH mobilizasyonu ve kemik oluşum mekanizmaları üzerindeki etkileri bilinen bir bilgiydi [5] ancak yapılan çalışmalar ayrıca HKH'lerin kemik metastazında önemli rolü olabileceği vurgusunu yapmaktadır [4,6,7]. Allocca ve arkadaşları (2019), dişi BALB/c Nude fareleri AMD3100 (bir CXCR4 antagonisti olarak HKH mobilizatörü) uyguladıktan sonra kemiğe metastaz gösteren meme kanseri modeli kurduklarında, AMD3100 uygulanmış grubun endosteal niş bölgesinde daha fazla meme kanseri hücresine rastladılar [8]. Bunu yanında HKH'ler için kemotaktik madde görevi gören annexin 2 (hücre bağlanma faktörü) ve CXCL12'nin aynı zamanda meme kanserinin endosteal nişe yerleşmesinde rol oynayabileceği önerilmiştir [6,9]. Yine HKH'leri dormanside (dinlenme) tutan ya da aktifleştiren diğer faktörlerin (oksijen miktarı, büyüme faktörleri vb.) de tümör dormansisinde anahtar rol oynayabileceği tartışılmaktadır [10,11]. Bu bilgiler HKH'nin kemik metastazında potansiyel olarak kanser hücresi ile bir yarış içerisinde olduğu hipotezini ortaya çıkartmaktadır.

Hem AMD3100 hem de G-CSF klinikte HKH uyarmakta kullanılsalar da mekanizmaları farklıdır. AMD3100 ajanı CXCR4'e bağlanarak CXCL12 bağlanmasını engellerken [12,13], G-CSF'nin bir uyarıcı faktör olduğundan, biyolojik bütün mekanizmaları net olarak bilinmese de kemik iliğindeki CSCL12 miktarını azaltarak HKH mobilizasyonunu sağladığı bulunmuştur [14].

Konu hakkında yapılan bütün bu çalışmalar HKH'leri endosteal nişte meme kanseri ile benzer özellikler göstererek niş içerisinde aynı besin, büyüme faktörleri ve yolakları kullanmak için çatışma halinde oldukları hipotezini güçlendiriyor. Bu çalışmada da HKH'lerin ortamdan uzaklaştırılmasının tümör gelişiminde etkilerini ksenograft fare modelleri ile araştırıp, farklı ajanlar ile potansiyel syngeneik HKH mobilizasyon modeli geliştirip, her iki modelin tümör gelişimi ve birbirleri ile karşılaştırması hedeflenmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, metastatik meme kanseri öncelikli olmak üzere, kemik metastazının HKH ile ilişkisi anlaşılarak detaylı biyolojik ve terapötik hedeflerin belirlenmesine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntemler

CXCR4/CXCL12 yol izinin kanserin metastazında etkili rolü olup olmadığını denemek için *in-vitro* ve *in-vivo* deney düzenekleri kuruldu. Bu çalışma kapsamında sırasıyla; daha fazla meme kanserinin kemik iliğine metastazının tümör gelişimine etkisi, farklı fare türü ve fenotipleri kullanılarak, iki farklı Hematopoetik Kök Hücre (HKH) mobilizatörünün (AMD-3100 ve G-CSF) etkisi, farklı fenotiplerde benzer etkinin varlığı araştırıldı.

Hayvan Deneyleri Etik İzni

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen bütün hayvan deneyleri, 1968 İngiltere Hayvanlar (Bilimsel Prosedürler) yasası, Birleşik Krallık iç işleri bakanlığı yönetmeliğine ve Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun olarak İngiltere İçişleri Bakanlığından onaylı Sheffield Üniversitesi Araştırma Etik Komitesi (Sheffield, İngiltere) tarafından gözden geçirilip, onaylanmıştır (Tarih: 01.01.2022, ISP: VKA7, PIL: ID5F9D530).

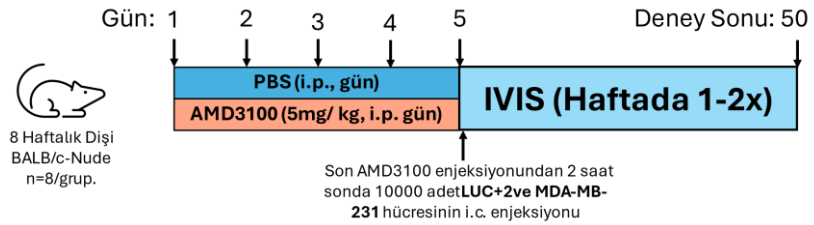
Kullanılan Hücreler ve Hücrelerin Bakımı.

Bu çalışma kapsamında, LUC+2ve MDA-MB-231-IV (Dr. Vicky Cookson (Sheffield Üniversitesi, İNGİLTERE)[15] tarafından lüsiferin geni ile transfekte edilmiş ve yüksek kemik metastazı gösteren GFP+ MDA-MB-231 klonu) ve 4T1 LUC BONE (Lüsiferaz transfekte edilmiş, BALB/c fare triple negatif meme kanseri)[16] hücre türleri

kullanıldı. İki hücre hattı da %10 FCS (Sigma-Aldrich, Birleşik Krallık) içeren RPMI 1640 (1X) + GlutaMAX™ (ThermoFisher Scientific, Birleşik Krallık) hücre ortamında 37°C ve %5 CO_2'li inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücre bakımı, pasajı ve deney için gerekli sayıya ulaşıldığında 2 ml %0.25 Tripsin-EDTA (ThermoFisher Scientific, UK) içeren fosfatlı tampon çözeltisi (PBS) ile yüzeyden kaldırılmış ve 10% FCS içeren besi ortamıyla toplanarak 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilerek pelet elde edilmiştir. Elde edilen peletteki hücreler sayılarak *in-vivo* deneyler de kullanılmıştır.

AMD3100 ile endosteal nişten HKH'lerin mobilizasyonu sonrası tümör büyümesinin ksenograft modelleme ile araştırılması

Kemik iliğindeki metastaz olmuş meme kanserinin sayısının artmasının tümör gelişimine etkisinin araştırılması için, 8 haftalık dişi bağışıklık sistemi baskılanmış (BALB/c Nude) fareleri, her bir grupta 8 fare olacak şekilde 5 gün boyunca intraperitoneal (i.p) olarak PBS ya da 5mg/kg dozunda AMD3100 enjekte edildi. Son enjeksiyondan 6 saat sonra 10^5 adet LUC+2ve MDA-MB-231 (Lüsiferin geni transfekte edilmiş) triple negatif meme kanseri hücresi intrakardiyak enjeksiyonu gerçekleştirildi. Haftada 1 ya da 2 defa IVIS ile tümör gelişimi gözlendikten sonra, bütün hayvanlar 50. günde sakrifiye edilip deney sonlandırıldı (Figür 1).



Figür 1. AMD3100 ile hematopoetik kök hücrelerin (HKH) mobilizasyonunun ardından ksenograft modelde tümör gelişiminin izlenmesi

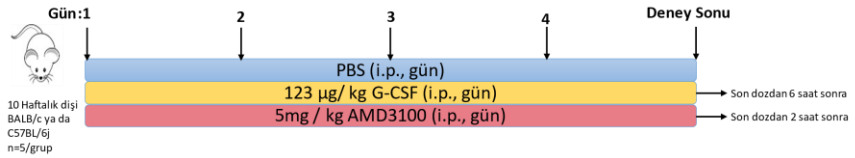
BALB/c Nude farelere 5 gün boyunca AMD3100 (5 mg/kg) veya PBS uygulanmıştır. Ardından 1x10⁵ MDA-MB-231 hücresi intrakardiyak olarak enjekte edilmiştir. Tümör gelişimi IVIS ile izlenmiş, fareler 50. günde sakrifiye edilmiştir.

Farklı HKH mobilizatörlerinin (AMD3100, GCS-F) farklı bağışıklık sistemi yeterli fare türleri üzerindeki etkisinin araştırılması.

AMD3100 ve GCS-F iki farklı yol izini izleyerek çalışan ve klinikte kullanılan HKH mobilazötörleridir. HKH'nin farklı tür (BALB/c ve C57BJ/6j) fareler üzerindeki etkilerini gözlemlemek ve syngeneik model için uygun fare/ilaç seçmek amacıyla BALB/c ve C57BL/6j türleri için i.p olarak PBS, 5mg/kg dozunda AMD3100 ya da 123 µg/kg G-CSF (Filgrastim) enjekte edildi. Hayvanlar için bu G-CSF dozu yüzey alanı doz dönüşümüne göre hesaplanmış [17] ve literatürdeki diğer G-CSF uygulamaları ile bağlantılıdır [18,19]. Kısaca;

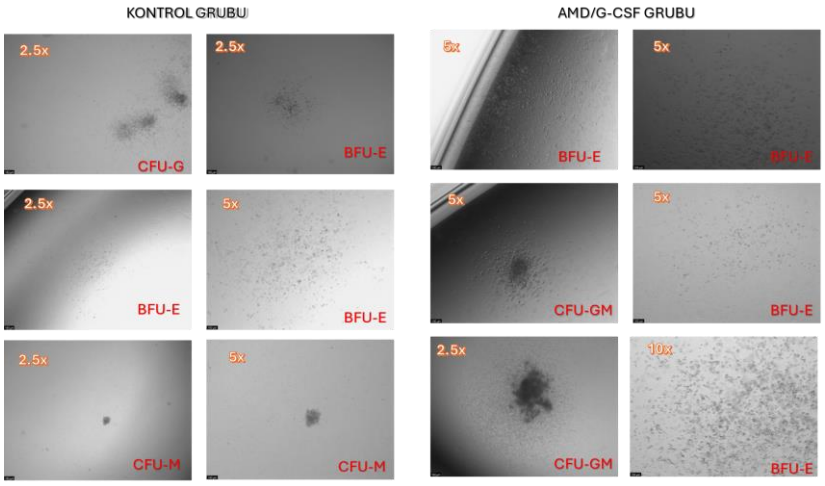
$$Hayvan\ Dozu\ (AED)\left(\frac{mg}{kg}\right) = İnsan\ Dozu\ \left(\frac{mg}{kg}\right) \times K_m oranı$$

Denklemi kullanılmıştır, referans alınan Nair ve Jacob (2016)'un çalışmasında K_m oranı 3 olarak verilmiştir, periferal kandan HKH toplaması için tavsiye edilen insan dozu 10 µg/kg/gün olarak verilmiş ve buna göre 123 µg/kg hesaplanmıştır. AMD3100 enjeksiyonu edilmiş hayvanlar 2 saat sonra, G-CSF enjeksiyonu yapılmış havanlar 6 saat sonra sakrifiye edilip, 500µl periferal kan 50µl %4 sodyum sitrat içerisine toplandı. Kırmızı kan hücreleri lizis tamponu (RBC Lysis Buffer, ThermoFisher, Birleşik Krallık) ile uzaklaştırdıktan sonra, üreticinin protokolü takip edilerek MethoCult GF M3434 (STEMCell, Birleşik Krallık) HKH koloni formasyon analizi yapıldı (Figür 2-3).



Figür 2. BALB/c ve C57BL/6j farelerde farklı HKH mobilizatörlerinin etkilerinin karşılaştırılması

BALB/c ve C57BL/6j farelerin kontrol gruplarına PBS i.p yol ile uygulanırken, AMD3100 (5 mg/kg) ve G-CSF (123 µg/kg) çalışma gruplarına günde bir defa 5 gün uygulanmıştır. G-CSF'nin son dozundan 6 saat, AMD3100'ın son dozundan 2 saat sonra olacak şekilde gruplardaki farelerin periferal kanları toplandı.

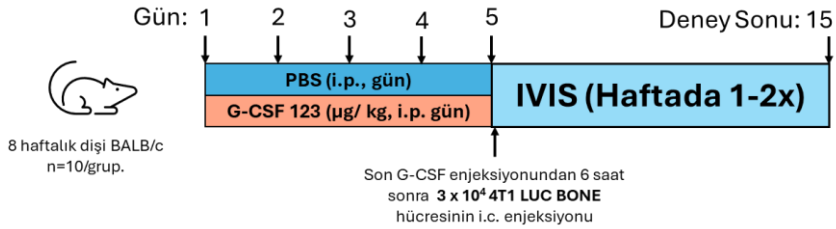


Figür 2. Hematopoetik Kök Hücre Koloni Analizinde Sayılan Koloni Türlerinin Örnek Görselleri

Koloni analizinde sayılan kolonilerin kontrol ve deney gruplarının bazılarının görselleri.(Burst-forming birim-eritrosit (BFU-E), Koloni-Oluşturan birim-granülosit (CFU-G), Koloni-Oluşturan birim-makrofaj (CFU-M) ve Koloni-Oluşturan birim-granülosit-makrofaj (CFU-GM))

G-CSF ile HKH mobilizasyonu sonrası tümör büyümesinin syngeneik modelleme ile araştırılması

G-CSF ile HKH mobilizasyonu sonrasında tümör büyümesinin izlenmesi için 8 dişi (BALB/c) fareleri, her bir grupta 10 fare olacak şekilde 5 gün boyunca i.p olarak PBS ya da 123 µg/kg dozunda G-CSF enjekte edildi. Son enjeksiyondan 6 saat sonra $3x10^4$ adet 4T1 LUC BONE triple negatif fare meme kanseri hücresinin intrakardiyak enjeksiyonu gerçekleştirildi. Haftada 1 ya da 2 defa IVIS ile tümör gelişimi gözlendikten sonra, tümörlerin hızlı gelişmesinden dolayı bütün hayvanlar 14. günde sakrifiye edilip deney sonlandırıldı (Figür 4).



Figür 3. G-CSF uygulaması sonrası syngeneik modelde tümör gelişimi

BALB/c farelere 5 gün boyunca G-CSF (123 µg/kg) veya PBS uygulanmıştır. Ardından $3x10^4$ adet 4T1 meme kanseri hücresi intrakardiyak enjeksiyonla verilmiştir. Tümör gelişimi IVIS ile takip edilmiş, tüm hayvanlar 14. günde sakrifiye edilmiştir.

In-Vivo Görüntüleme Sistemi

Tümör model çalışmalarında kullanılan bütün hücre hatları ateşböceği lüsiferin geni ile transfekte edilmesi sebebiyle tümör büyümesi In-Vivo Görüntüleme Sistemi (IVIS) LUMINA II (Calliper Life Sciences) ile takip edilmiştir. Görüntüleme yapılmadan 5 dakika önce bütün hayvanlar deri altı enjeksiyon ile 100 µl D-Lüsiferin (30 mg/kg) enjekte edilmiştir. Bütün işlemler hayvanlar %2-3 izofluran (Zoetis, Birleşik Krallık) ile anestezi altındayken gerçekleştirilmiş, görüntüler Living Image Software (Calliper Life Science) ile incelenerek tümör gelişimi takip edilmiştir.

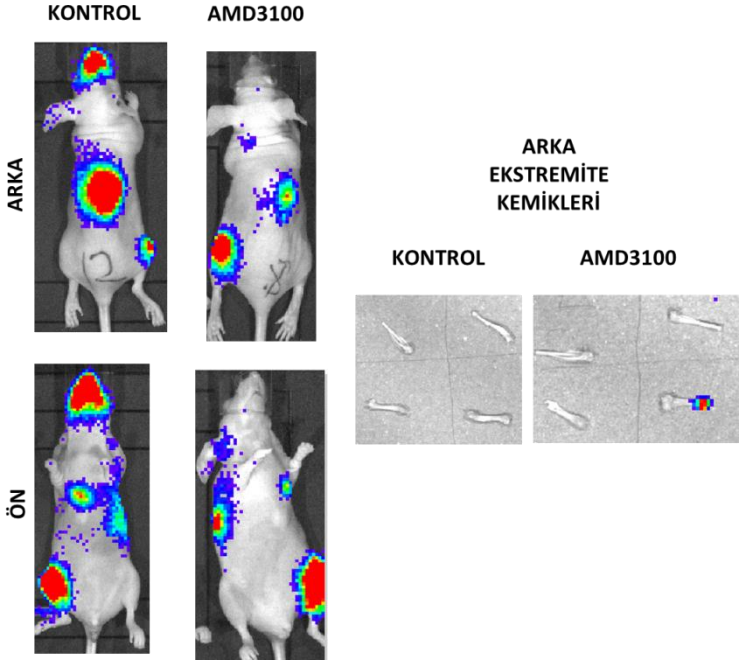
İstatistiksel Analiz

Bu çalışmadan elde edilen bütün veriler GraphPad Prism (v8.0) kullanılarak görselleştirilmiş ve standart t-testi ve Mantel-Cox (Log-Rank) analizleri ile istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar araştırılmıştır. Bu anlamlı farklılık derecesi $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) ve $p \leq 0.0001$ (****) olarak gösterilmiştir.

3. Bulgular

Ksenograft Deney Düzeneğinde Tümör Gelişiminin Gözlenmesi

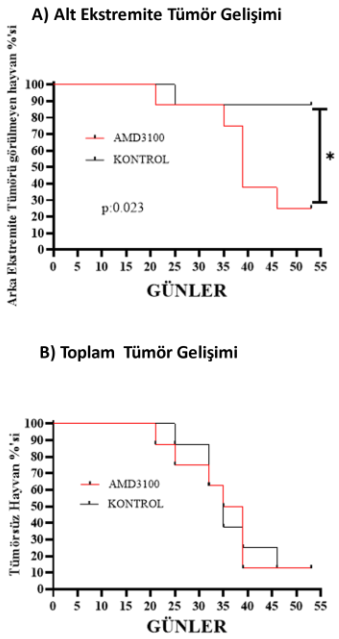
Deney sonunda kontrol ve AMD3100 grupları arasında hem genel tümör adeti (kontrol 0.14±00.38, AMD: 0.38 ± 0.51, p:0.35) hem de arka ekstremitelerindeki tümör adeti (kontrol 2.13±1.25, AMD: 2.5 ± 1.69, p:0.62) arasında istatistiksel anlamlı bir fark görülmemiştir (Figür 5).



Figür 4. Ksenograft modelde deney sonunda elde edilen IVIS görüntüleri

Solda kontrol, sağda AMD3100 grubu olmak üzere arka (üst) ve ön (alt) pozisyonlardan alınan IVIS görüntüleri sunulmuştur. Alt ekstremite kemiklerinde tümör yayılımı görselleştirilmiştir.

Ancak deney sonunda boyutları ya da genel tümör ve kemikteki tümör sayıları arasında hiçbir fark görülmemesine rağmen, gerçekleştirilen Mantel-Cox analizi sonuçlarına göre; AMD3100 ile öncesinde HKH uzaklaştırılmış grupta arka ekstremitede gözlemlenen tümörler ortalama 21. günde tespit edilirken, kontrol grubunda 39. günde tespit edilmiştir (p:0.023) (Figür 6).

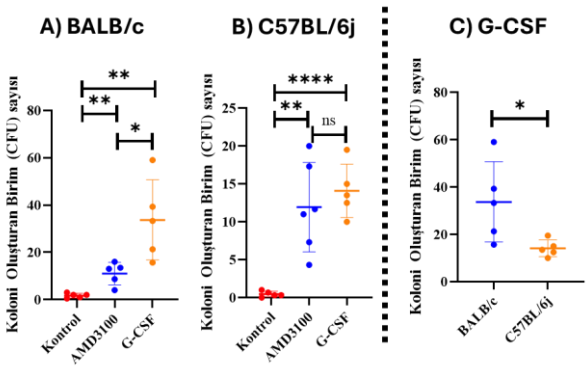


Figür 5. Ksenograft modelde tümörlerin ilk tespit zamanına göre gelişim grafikleri

*A) AMD3100 grubunda alt ekstremite tümörleri, kontrol grubuna kıyasla daha erken dönemde saptanmıştır (**p = 0.023**, Mantel-Cox analizi). B) Toplam tümör gelişimi açısından anlamlı fark gözlenmemiştir.*

Syngeneik tümör deney modeli için tür ve ajan seçimi

AMD3100 ve G-CSF farklı yollardan HKH'leri kemik iliğinden kana geçirirler. BALB/c ve C57BL/6j fare türlerinin hem AMD3100 hem de G-CSF uygulandıktan sonra periferal kandan elde edilen koloni sayılarına göre. BALB/c'de AMD3100 (11.03 ± 4.74) ve G-CSF (33.73 ± 16.96) kontrole (1.7 ± 0.97) oranla istatistiksel bir farkla HKH sayısı gösterirken ($p_{AMD3100\text{-}KONTROL}$: 0.0026, $p_{G\text{-}CSF\text{-}KONTROL}$: 0.0029), G-CSF grubunda AMD3100'e göre daha çok HKH kolonisi bulundu ($p_{AMD3100\text{-}G\text{-}CSF}$: 0.0204) (Figür 7A). C57BL/6j türünde ise; AMD3100 (11.94 ± 5.9) ve G-CSF (14.1 ± 3.52) kontrole (0.47 ± 0.38) oranla istatistiksel bir farkla HKH sayısı gösterirken ($p_{AMD3100\text{-}KONTROL}$: 0.002, $p_{G\text{-}CSF\text{-}KONTROL}$: <0.0001), birbirleri arasında anlamlı bir farka rastlanmadı ($p_{AMD3100\text{-}G\text{-}CSF}$: 0.49) (Figür 7B). BALB/c'de G-CSF bariz bir şekilde AMD3100'den daha fazla HKH'sini mobilize edebildiği için, C57BL/6j ve BALB/c karşılaştırmasında G-CSF değerleri yüzdesel bir biçimde normalize edilerek hangi türde daha çok etkili olduğu incelendi. Sonuçlar G-CSF'nin BALB/c (33.73 ± 16.96) türünde C57BL/6j (14.1 ± 3.53) türüne kıyasla daha fazla HKH'yi mobilize ettiği saptanmıştır (p:0.035) (Figür 7C).

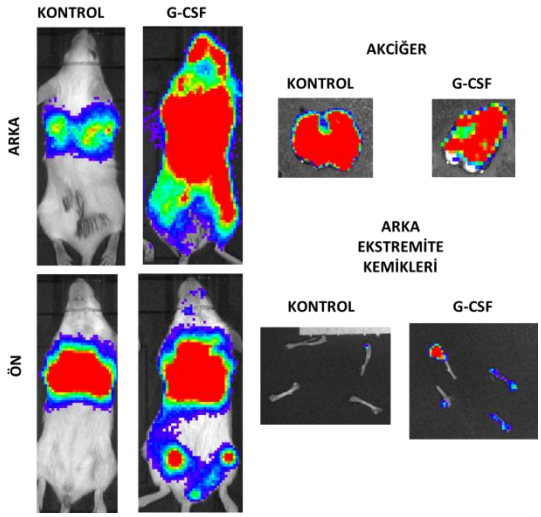


Figür 6. BALB/c ve C57BL/6j farelerde HKH mobilizasyonuna yönelik koloni analizleri

*A) BALB/c farelerde G-CSF grubu, kontrol ve AMD3100 gruplarına göre anlamlı şekilde daha fazla koloni oluşturmuştur (**p <0.01**). B) C57BL/6j farelerde her iki ajan kontrol grubuna göre etkili olmuş; ancak aralarında fark bulunmamıştır. C) Normalize değerler, G-CSF'nin BALB/c farelerde daha etkili olduğunu göstermiştir (**p = 0.035**).*

Syngeneik Deney Düzeneğinde Tümör Gelişiminin Gözlenmesi

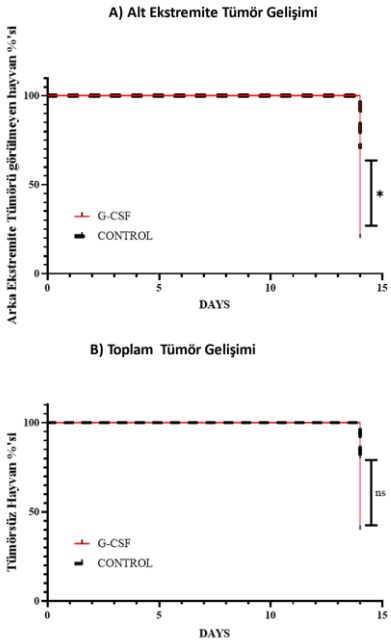
BALB/c ile G-CSF ajanı arasında HKH mobilize analizi için istatistiksel anlamlı bir sonuç bulundu, bu sebeple G-CSF ile kemik iliğinden uzaklaştırılan HKH'lerin yerine fare triple negatif meme kanseri hücre hattı olan 4T1 LUC BONE ile kemik metastaz modeli kuruldu. Oldukça agresif ve kemik arayan bir hücre hattı olan bu model, sadece iki hafta içerisinde deney düzeneğindeki farelerin yarısında şiddetli olarak metastaz gösterdi. Özellikle akciğer metastazı yoğun karşılaşıldığı için etik sebepler gözetilerek deney erken sonlandırıldı (Figür 8).



Figür 8. Syngeneik modelde deney sonu IVIS görüntüleri

Solda kontrol, sağda G-CSF grubu IVIS görüntüleri arka (üst) ve ön (alt) pozisyonlarda sunulmuştur. Diseksiyon sonrası akciğer ve kemik dokularında metastaz gözlenmiştir.

Ancak bu kısa sürede bile, ksenograft modeline benzer bir sonuç gözlendi. G-CSF ajanı uygulanmış gruptaki farelerin genel tümör gelişimi ile kontrol grubu arasında istatistiksel fark tespit edilemese de alt ekstremite kemiklerinde tümör görülmesi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu (Kontrol: 3/10 hayvan, G-CSF: 8/10 hayvan) (Figür 9).



Figür 7. Syngeneik modelde tümör gelişim zamanlaması

*G-CSF grubunda alt ekstremite kemiklerinde tümör saptanma oranı kontrol grubuna göre yüksektir (G-CSF: 8/10, Kontrol: 3/10; **p = 0.0381**). B) Toplam tümör gelişimi açısından gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir.*

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, hematopoetik kök hücrelerin (HKH) kemik mikro çevresinden uzaklaştırılmasının tümör gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. HKH'lerin metastatik niş oluşturma sürecindeki potansiyel rolleri, tümör hücrelerinin kemik iliğinde kolonize olmasını nasıl etkilediği ve bu sürecin ksenograft ile syngeneik fare modellerinde nasıl farklılık gösterdiği incelenmiştir. Araştırma, CXCR4 antagonisti olan AMD3100 ve G-CSF kullanılarak HKH mobilizasyonunun sağlanmasının, tümör yayılımı ve metastaz üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere tasarlanmıştır.

Hematopoetik Kök Hücrelerin Ortamdan Uzaklaştırılmasının Tümör Gelişimi Üzerine Etkileri

HKH'ler kemik iliği içerisinde endosteal niş yapısının temelini oluşturan hücrelerden biridir ve aynı zamanda meme kanserinde kemik metastazında, tümörün kemiğe tutunması ve gelişmesinde etkili bir rolü olabileceği öne sürülmektedir [4]. Daha önceki fare çalışmasında HKH'lerin AMD3100 kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldığı zaman endosteal nişe metastaz olmuş meme kanseri sayısında artış gözlenmiştir [8]. Bu çalışmada da benzer yöntem takip edilerek, BALB/c Nude fareleri 5 gün AMD3100 uygulandıktan sonra insan meme kanserinin intrakardiyak enjeksiyonu ile ksenograft deney düzeneği kuruldu ve elde edilen sonuçlar gösterdi ki hastalığın ilerleyen aşamasında tümör gelişimleri benzer olmasına rağmen, AMD3100 uygulanmış grupta kemik metastazları anlamlı olarak daha önce gözlemlendi.

Literatürde buna benzer çalışma bulunmamasına rağmen AMD3100 ve G-CSF sadece kök hücre naklinde değil [20,21] aynı zamanda lösemi gibi kanser türlerinde tedavi arasında HKH miktarını çoğaltmak için kullanılmakta ve bunun son dönemlerde tedaviye yanıtta kötü bir etki bıraktığı rapor edilmektedir [22]. Ancak CXCL4 yolağının katı tümörler ve lösemi üzerindeki mobilize etme etkileri gösterilmiştir [23]. Bu çalışma ve literatürdeki bilgiler ışığında klinikte kullanılan kanser tedavileri arasında kemik iliğindeki HKH'leri toparlamak amacıyla kullanılan bu ajanların aynı zamanda olası kanser dormansi tetiklenmesi ya da primer kanserin (varsa ya da kaldıysa) kemik dokusuna metastazının arttırma ihtimalleri göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak kemik iliğinde dormansi halinde korunaklı bulunan kanser hücrelerinin aktif hedeflenmesi ve hemen ardından kemoterapi uygulanması gibi yeni yaklaşımlar da ileriki çalışmaların konusunu oluşturabilir. Her iki durumda da hem HKH'lerin hem de CXCR4/CXCL12 ilişkisinin kemik metastazındaki önemi yine bu çalışma ile altı çizildi.

Syngeneik Fare Modeli Seçimi ve Endosteal Nişteki Hematopoetik Kök Hücre Miktarının Tümör Gelişimine Etkisinin Syngeneik Modeldeki Etkileri

Literatürde syngeneik fare modellerinin meme kanseri ve özellikle kemik metastazında kullanılmasını kapsayan pek çok çalışma ve derleme bulunmaktadır [24–26]. Bu çalışmaların en önemli ortak özelliği bağışıklık sisteminin etkisinin de deney düzeneğinde incelenmesidir. Ksenograft modeller ile incelenemeyen etki, tam olarak insan bağışıklık yanıtını gösteremese de syngeneik modeller ile bu etkinin analizine yaklaşılabilmektedir. Tabi her hipoteze göre model oluşturulması gerekse de HKH'lerin aynı zamanda bağışıklık hücreleri olan B, T, NK Hücreleri, Nötrofil, Bazofil, Makrofaj gibi pek çok tipinin oluşumuna etkisi olduğu da düşünülünce, bağışıklığın varlık durumu göz ardı edilmemesi gereken bir konu olmaktadır [27,28].

Daha önce amacı kanser araştırmaları ya da HKH ile kanserin ilişkisinin incelenmesi için syngeneik bir model oluşturulmamış olsa da temel kök hücre araştırmaları insanda kullanılan AMD3100 ve G-CSF gibi ajanların fare türleri üzerinde etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Lee ve arkadaşları (2014), hem AMD3100 hem de G-CSF'in en sık kullanılan iki fare türünde de (C57BL/6j ile BALB/c) başarılı bir biçimde HKH'lerin periferik kana mobilize edildiğini göstermişlerdir [29]. Bu gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları da her iki ajanında mobilize edici etkisini göstermiştir. Bu çalışma ile Lee ve arkadaşlarının (2014) çalışmasının sonuçları karşılaştırıldığında, G-CSF BALB/c için daha iyi bir mobilizer olduğu iki çalışmada da gösterilmiş ancak farklı olarak Lee ve arkadaşlarının (2014) çalışmasında C57BL/6j türünde AMD3100 daha etkili bir ajan olduğu gösterilmiştir [29]. Bu çalışmada C57BL/6j türü için AMD3100 ve G-CSF arasında anlamlı bir fark gözlemlenemedi. Bu iki çalışmanın sonuçlarına göre, daha fazla HKH hareketi hedeflendiğinde, syngeneik model olarak BALB/c türü seçilmelidir. Ayrıca BALB/c ksenograft modelde kullanılan BALB/c Nude ile de aynı türün farklı fenotipleridir. Bu yüzden iki fenotipin karşılaştırılma imkânı da yaratmaktadır. Bu yüzden bu çalışmanın hipotezi için en uygun model BALB/c – G-CSF çifti seçilmiştir.

Hali hazırda agresif bir yayılma gösteren triple negatif meme kanseri, syngeneik fare modelinde ksenograft modele göre daha da hızlı ve agresif bir tutum sergilemiştir. Aralarındaki en temel farklardan biri de insan meme kanseri hücreleri daha çok kemik dokusuna metastaz ederken, fare meme kanserleri öncelikli olarak akciğerlere metastaz etmeleridir [25]. Aynı zamanda fare meme kanseri hücresinin insan meme kanseri hücresinin aksine östrojenden etkilenmediği de göz önünde bulundurulduğunda tümör gelişimi daha hızlı gerçekleşmiştir [24,25]. Bu çalışmada da syngeneik modelde ağırlıklı olarak hızlı bir akciğer metastazı görülmüştür. Buna rağmen ksenograft deneydeki sonuçlardan farklı olarak, G-CSF ajanı uygulanmış grupta anlamlı olarak daha fazla alt ekstremite tümörü keşfedildi. Ancak devamında kontrol grubunda da yine ksenograft gibi benzer bir sonradan kemik metastazı oluşumu, yoğun akciğer metastazından dolayı deney hayvanları etiği ön planda tutularak incelenemedi. Dolayısıyla benzer tümörler gösterip göstermeyeceği bilinilmese de G-CSF uygulanan grupta erkenden kemik tümörü gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile HKH'lerin kemik metastazındaki öneminin sadece benzer yol izleri paylaşması değil, azlığı durumunda potansiyel olarak artan kemik metastazı ihtimalinin altı çizildi. Aynı zamanda literatürdeki bilgiler de göz önünde bulundurulduğunda yine bu çalışma HKH'lerin metastatik meme kanseri ile yarışma halinde ve kanser tedavisinde HKH'ler ile bilinen biyolojik yolaklarının potansiyel bir araştırma konusu olduğunu gösterdi.

Teşekkür

Bu çalışma 1416 sayılı kanun kapsamında Türkiye Cumhuriyeti Millî Eğitim Bakanlığı, Yurt Dışı Lisansüstü Eğitim bursu tarafından karşılanmıştır. Bu burs kapsamındaki araştırma bütçemin verimli ve doğru kullanılmasında ve doktora eğitimi sürecimde farklı hipotezlerimi de araştırma imkânı sunup bilgi birikimleri ile katkı sağlayan değerli tez danışmanlarım Prof. Dr. Ingunn Holen ile Prof. Dr. Nicola J. Brown'a teşekkürü borç bilirim.

KAYNAKLAR

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2024;74:229–63.
2. Bussard KM, Gay C V, Mastro AM. The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? Cancer and Metastasis Reviews 2008;27:41–55.
3. Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. CXCR4 over-expression and survival in cancer: A system review and meta-analysis. Oncotarget 2015;6:5022–40.
4. Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Hematopoietic stem cell niche is a potential therapeutic target for bone metastatic tumors. Clinical Cancer Research 2011;17:5553–8.
5. Winkler IG, Pettit AR, Raggatt LJ, Jacobsen RN, Forristal CE, Barbier V, et al. Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation. Leukemia 2012;26:1594–601.
6. Forest AE, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. The Hematopoietic Stem Cell Niche and Bone Metastasis. Madame Curie Bioscience Database [Internet] Austin (TX): Landes Bioscience 2013. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169225/ (accessed October 4, 2020).
7. Hiraga T. Bone metastasis: Interaction between cancer cells and bone microenvironment. J Oral Biosci 2019;61:95–8.
8. Allocca G, Hughes R, Wang N, Brown HK, Ottewell PD, Brown NJ, et al. The bone metastasis niche in breast cancer-potential overlap with the haematopoietic stem cell niche in vivo. J Bone Oncol 2019;17.
9. Jung Y, Wang J, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Havens A, et al. Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation. Blood 2007;110:82–90.
10. Schuettpelz LG, Link DC. Niche competition and cancer metastasis to bone. Journal of Clinical Investigation 2011;121:1253–5.
11. Decker AM, Jung Y, Cackowski F, Taichman RS. The role of hematopoietic stem cell niche in prostate cancer bone metastasis. J Bone Oncol 2016;5:117–20.
12. Rosenkilde MM, Gerlach L-OO, Jakobsen JS, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW. Molecular Mechanism of AMD3100 Antagonism in the CXCR4 Receptor: TRANSFER OF BINDING SITE TO THE CXCR3 RECEPTOR*. Journal of Biological Chemistry 2004;279:3033–41.
13. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. Clinical Cancer Research 2010;16:2927–31.
14. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. Nat Immunol 2002;3:687–94.
15. Holen I, Nutter F, Wilkinson JM, Evans CA, Avgoustou P, Ottewell PD. Human breast cancer bone metastasis in vitro and in vivo: a novel 3D model system for studies of tumour cell-bone cell interactions. Clin Exp Metastasis 2015;32:689–702.
16. Canuas-Landero VG, George CN, Lefley D V, Corness H, Muthana M, Wilson C, et al. Oestradiol Contributes to Differential Antitumour Effects of

Adjuvant Zoledronic Acid Observed Between Pre- and Post-Menopausal Women . Frontiers in Endocrinology 2021;12.
17. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. J Basic Clin Pharm 2016;7:27–31.
18. Patterson AM, Pelus LM. G-CSF in stem cell mobilization: new insights, new questions. Ann Blood 2016;2:10–10.
19. Hoggatt J, Tate TA, Pelus LM. Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mobilization in Mice, 2014, p. 43–64.
20. Koç Ö, Doğan Ö, Şahin U, Kircali E, Koyun D, Arat M, et al. The effects of plerixafor on the hemostatic system in patients undergoing stem cell mobilization. Hematol Oncol Stem Cell Ther 2024;17:211–8.
21. Gokarn A, Reddy L, Hiregoudar S, Poojary M, Parab S, Punatar S, et al. A comparison of mobilization regimens used in Hodgkin lymphoma and factors that influence peripheral blood stem cell mobilization. Cytotherapy 2025.
22. Weng P, Yang S, Xu S, Zhang S, Wu Y, Chen Y. Application of G-CSF in high-leukocyte acute myeloid leukemia is a poor prognostic factor. Hematology 2023;28.
23. Liu T, Li X, You S, Bhuyan SS, Dong L. Effectiveness of AMD3100 in treatment of leukemia and solid tumors: from original discovery to use in current clinical practice. Exp Hematol Oncol 2015;5:19.
24. Wright LE, Ottewell PD, Rucci N, Peyruchaud O, Pagnotti GM, Chiechi A, et al. Murine models of breast cancer bone metastasis. Bonekey Rep 2016;5:804.
25. Ottewell PD, Lawson MA. Advances in murine models of breast cancer bone disease. J Cancer Metastasis Treat 2021;7:11.
26. Ottewell PD, Coleman RE, Holen I. From genetic abnormality to metastases: Murine models of breast cancer and their use in the development of anticancer therapies. Breast Cancer Res Treat 2006;96:101–13.
27. Sugiyama T, Nagasawa T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. Inflamm Allergy Drug Targets 2012;11:201–6.
28. Alsamraae M, Cook LM. Emerging roles for myeloid immune cells in bone metastasis. Cancer Metastasis Rev 2021;40:413–25.
29. Lee H, Che J-H, Oh JE, Chung SS, Jung HS, Park KS. Bone marrow stem/progenitor cell mobilization in C57BL/6J and BALB/c mice. Lab Anim Res 2014;30:14–20.

©Copyright 2025 by Osmangazi Tıp Dergisi - Available online at tip.ogu.edu.tr©Telif Hakkı 2025 ESOGÜ Tıp Fakültesi - Makale metnine dergipark.org.tr/otdweb sayfasından ulaşılabilir.