

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERİNDE İMMUNOTERAPİYE YANITTA KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ROLÜ

YEGANE KOUVELA ÖZCAN

TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970190

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MESANE KANSERİNDE İMMUNOTERAPİYE YANITTA KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ROLÜ

YEGANE KOUVELA ÖZCAN

TEMEL ONKOLOJİ

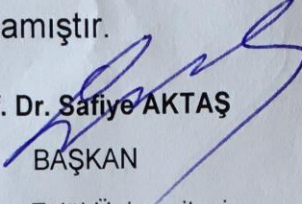
DOKTORA TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2014.KB.SAG.052 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970190

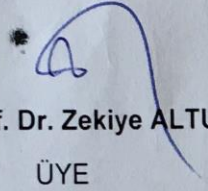
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı,
Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Yegane Kouvela Özcan
**'MESANE KANSERİNDE İMMUNOTERAPİYE YANITTA KANSER
KÖK HÜCRELERİNİN ROLÜ'** konulu Doktora tezini 19.06.2017
tarihinde başarı ile tamamlamıştır.


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

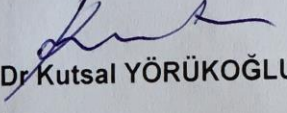

Prof. Dr. Zekiye ALTUN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Onkoloji Enstitüsü

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

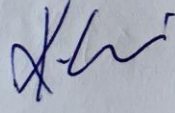

Prof. Dr. Kutsal YÖRÜKOĞLU

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Kemal ERGİN

ÜYE

Adnan Menderes Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Gülten DİNİZ

ÜYE

Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi

Patoloji Kliniği

Prof. Dr. Nur OLGUN

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Onkoloji Enstitüsü

Pediyatrik Onkoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Semra DEMOKAN

YEDEK ÜYE

İstanbul Üniversitesi

Onkoloji Enstitüsü

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	1
1.2. Araştırmanın Amacı.....	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
2. GENELBİLGİLER.....	2
2.1.Mesane Kanseri.....	2
2.2. Kanser Kök Hücresi.....	5
2.3. Bacillus Calmette Guerin (BCG).....	6
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	7
3.1. Araştırmanın Tipi.....	7
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	7
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	7
3.4. Çalışma Materyali.....	7
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	8
3.6. Veri Toplama Araçları.....	8
3.6.1.Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	8
3.6.2.Çalışma Akış Şeması	11
3.6. 3. Hücre Kültürü.....	12
3.6.4. CD44+ Mesane Kanseri Kök Hücre İzolasyonu.....	14

3.6.5. İzole Edilen Kök Hücrelerin Flow Sitometrik Konfirmasyonu.....	14
3.6.6. Deney Modeli	14
3.6.7. BCG <i>IL-2</i> , <i>Mononükleer Hücre</i> Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	15
3.6.8. WST-1 ile Hücre Proliferasyonunun Tayini.....	16
3.6.9. Flow sitometrik Annexin V-FITC/PI Boyaması.....	16
3.6.10. RNA İzolasyonu.....	16
3.6.11. cDNA çevirimi.....	17
3.6.12. RT-PCR Array Analizi.....	19
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	20
3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	21
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	21
3.10. Etik Kurul Onayı.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Akım Sitometri İle Annexin-V/ PI Boyanması Sonucu Apoptoz Bulguları.....	22
4.2. Real Time- PCR Array Bulguları.....	27
4.2.1. JMSU-1 Hücreleri.....	27
4.2.2. 5637 Hücreleri.....	30
4.2.3. T24 Hücreleri.....	33
4.2.4. JMSU-1 kök hücreleri.....	35
4.2.5. 5637 kök hücreleri.....	38
4.2.6. T24 kök hücreleri.....	41
4.2.7. Üç mesane kanseri hücre hattında ortak artan ve azalan gen ekspresyon sonuçları.....	43
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	51
7. KAYNAKLAR.....	52

8. EKLER	55
8.1. Kurum İzin Belgesi.....	55
8.2. Etik Kurul Onayı.....	56
8.3. Özgeçmiş.....	57
8.4. İngilizce Yayın.....	60



TABLO DİZİNİ

Tablo 1. RNA örnek miktarları ve cDNA çevirim miktarları

Tablo 2. Tüm deney gruplarında BCG ve kombine uygulanmasının neden olduğu apoptoz yüzdeleri



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. KKH 'lerine ve total mesane kanseri hücreleri ilaç uygulama planı

Şekil 2. JMSU-1 mesane kanseri hücrelerinin mikroskopik görünümü

Şekil 3. T-24 mesane kanseri hücrelerinin mikroskopik görünümü

Şekil 4. 5637 mesane kanseri hücrelerinin mikroskopik görünümü

Şekil 5. Apoptozun akım sitometri ile değerlendirilmesinde yapılan *dot plot* analizi ve kapılamalar

Şekil 6. JMSU-1 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranları

Şekil 7. T-24 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranları

Şekil 8. 5637 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranları

Şekil 9. JMSU hücreleri ve JMSU BCG alan hücrelerin karşılaştırmalı heatmapleri

Şekil 10. JMSU hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

Şekil 11. 5637 hücrelerinin BCG uygulama sonrası kontrol ile karşılaştırmalı heatmap analiz sonucu.

Şekil 12. 5637 hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

Şekil 13. T24 hücrelerinde BCG uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

Şekil 14. T24 hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

Şekil 15. JMSU hücre hattı kök hücrelerinin kontrol hücreler ile immun ilişkili gen ekspresyonlarının kat değişimlerini gösteren heatmap

Şekil 16. JMSU kök hücreleri ve JMSU kök hücre BCG alan hücrelerin karşılaştırmalı heatmapleri

Şekil 17. JMSU kanser kök hücrelerinde BCG, IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap

Şekil 18. 5637 hücre hattı kök hücrelerinin kontrol hücreler ile immun ilişkili gen ekspresyonlarının kat değişimlerini gösteren heatmap.

Şekil 19. 5637 kanser kök hücrelerine BCG uygulandığında immun ilişkili gen ekspresyonunun heatmap analiz sonuçları.

Şekil 20. 5637 kanser kök hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

Şekil 21. T24 hücre hattı kök hücrelerinin kontrol hücreler ile immun ilişkili gen ekspresyonlarının kat değişimlerini gösteren heatmap

Şekil 22. T24 kanser kök hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap

Şekil 23. BCG uygulanan her üç hücre hattında ekspresyon ortalamalarının kontrol hücreler ile karşılaştırılması

Şekil 24. BCG, IL-2, MNH uygulanan her üç hücre hattında ekspresyon ortalamalarının kontrol hücreler ile karşılaştırılması

Şekil 25. BCG uygulanan her üç hücre hattı kanser kök hücrelerinde ekspresyon ortalamalarının kontrol hücreler ile karşılaştırılması

Şekil 26. Gruplar arasında her üç hücre hattı avaraj kat değişimi gösteren kemokinlerin grafik gösterimi. Kontrol Grup: Kontrol hücreler, Grup 1.: BCG uygulanan hücreler, Grup 2: BCG+ IL2+ mononükleer hücre uygulanan hücreler, Grup 3: Kanser kök hücreler, Grup 4: BCG uygulanan kanser kök hücreler, Grup 5: BCG+ IL2+ mononükleer hücre uygulanan kanser kök hücreler

KISALTMALAR

BCG: Bacillus calmette guerin

BT: bilgisayarlı tomografi

FBS: Fetal Bovin Serum

FITC: Floresan Isotiyosiyanat

IL-2: Interlökin2

KKH: kanser kök hücreleri

MNH: Mononükleer Hücre

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MVAC: metotreksat, Vincristin, doksorubisin, sisplatin

NIBC: intramuskular invaziv mesane kanseri

NMIBC: invaziv mesane kanseri

PI: Propidium Iodide

PMN: polimorfik nükleer nötrofiller

RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TNF: Tümör nekrozis faktörü

TEŞEKKÜR

Bana, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda doktora yapabilme şansını sunan; Onkoloji Enstitü Müdürü Prof. Dr. Nur OLGUN'a;

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı başkanı ve danışman hocam Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a;

Saygıdeğer hocam Prof. Dr. Zekiye ALTUN'a;

Tez izleme komitesi üyesi Prof Dr Kutsal YÖRÜKOĞLU'na;

Tez Projesini destekleyen DEÜ BAP komisyonuna,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda, bilgi ve tecrübesiyle bana yol göstermiş saygıdeğer tüm hocalarıma, Onkoloji Enstitüsü idari personeline;

Sağlık Bilimleri Enstitüsü İdari Personeline;

Temel Onkoloji Yüksek Lisans ve Doktora programındaki tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

MESANE KANSERİNDE İMMUNOTERAPİYE YANITTA KANSER KÖK HÜCRELERİNİN ROLÜ

Dr. Yegane Kouvela Özcan

Yazışma Adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir

Mesane kanseri mesanenin en içte bulunan tabakasından köken alır. Sık rekürrenslerle karakterizedir. Rekürrenslerin ana kaynaklarından biri olarak CD44+ kanser kök hücreleri (KKH) düşünülebilir. Mesane kanserinde transüretal rezeksiyon altın standart tedavidir. Buna karşın rekürrensler ile oldukça sık karşılaşılmaktadır. Bacillus calmette guerin (BCG) mesane kanserlerinin rekürrenslerinde tedavide yaygın kullanılmaktadır. Yine de rekürrensler izlenmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmanın amacı mesane kanserinde BCG tedavileri sonrası rekürrenslerden KKH lerinin sorumlu olup olmadığının sorgulanması, mesane kanseri hücre kültürlerinde BCG tedavisi ile mesane kanseri kök hücreleri arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Bu çalışmada, farklı karakteristiklerdeki (T24, 5637 ve CLS439) insan mesane kanseri hücre hatları ve manyetik boncuk izolasyon yöntemi ile (Miltenyl Magtech) izole edilmiş, CD44+ fenotipindeki KKH 'leri kullanılmıştır. Mesane kanseri hücre hatları ve bunlardan izole edilmiş KKH'leri, 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren nemli ortamda komplet DMEM ve RPMI 1640 ortamlarında üretildikten sonra BCG, interferon alfa, interlökin 2, mononükleer hücre ve kombinasyonları, 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanmıştır. İlaç ve kontrol gruplarındaki apoptotik ve nekrotik hücre oranları tayin etmek için Anneksin V-PI testi uygulanmıştır. Uygulamalardan sonra RNA izolasyonu yapılarak, cDNA ya çevrim yapıp Real Time PCR ile immün yanıtta görevli olan inflamatuvar sitokinler ve reseptörleri PCR array yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kantitatif olarak kat değişimleri değerlendirilmiştir. Genlerin ekspresyonlarının kat değişimleri gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Sitokin ve kemokin standart array (Biorad)'de 84 gen RT-PCR ile kantitatif olarak analiz edildi.

7,32 mikrogram/ml dozda BCG ile IL-2 (1000IU/ml) ve mononükleer hücre (1000 hücre/ml) mesane kanseri hücrelerine en etkili olarak saptandı. Her üç hücre hattına ait KKH'lerine BCG ve kombinasyonlar uygulandığında, BCG tedavisi kanser hücreleri

yanında KKH'lerine de sitotoksik etkili bulundu. Kansere hücreleri ile karşılaştırıldığında üç hücre hattına ait KKHlerinde CXCL5, CCL8, CNTF, CSF yüksek bulunmuştur. KKH ile karşılaştırıldığında kanser hücrelerinde, IL6, TNFSF11, FASLG, CXCL9 yüksek bulunmuştur. Tüm hücre hatlarında, BCG uygulaması CXCL5 ve LTB ifadeleri arttarken; CCL20 ve IL6 azalmıştır. BCG; IL2 ve MNH ile birlikte uygulandığında, CXCL10, CXCL5, IFNG artmış; ve CXCL12, IL6, TNFSF11 azalmıştır. KKH üzerine BCG uygulaması ADIPOQ, CXCL10, CXCL1 de artışa ve CCL8 de azalışa sebep olmuştur. BCG ile IL2 ve MNH kombinasyonu, bir çok kemokin ve sitokin ifadesini azaltmıştır.

BCG uygulaması mesane kanserinde bir çok sitokin ve kemokin ifadesini değiştirmektedir. Üç hücre hattında ve onların KKH' leri arasında ekspresyonlar farklıdır. Her olgunun immün modülasyonu kendi aralarında farklılıklar göstermektedir. Mesane KKH üzerine BCG temelli immünoterapinin etkinliğini MNH ve IL2 kombinasyonları azaltabilecektir. Bulgularımız, mesane kanserinde BCG tedavisi sonrasında rekürrenslerin nedeninin temel olarak KKH hipotezi ile açıklanamayacağını göstermektedir. Mesane kanseri yüzey epitelinin farklı loküslerinden gelişen sistemik bir hastalık olarak düşünülebilir. Bundan sonraki hedefimiz hastalardan elde edilen kanser hücreleri üzerinde BCG etkisini ex vivo değerlendirmektir.

Anahtar Kelimeler: Mesane Kanseri, Basil Kalmet Guerin, Kansere Kök Hücreleri

ABSTRACT

ROLE OF CANCER STEM CELLS IN RESPONSE TO IMMUNOTHERAPY IN BLADDER CANCER

Dr. Yegane Kouvela Özcan

Corresponding Address: Dokuz Eylul University, Institute of Oncology,
Department of Basic Oncology, IZMIR

Bladder cancer originates from innermost layer of the bladder. It is characterised with frequent recurrences. CD44+ cancer stem cells (CSCs) might be one of the main reasons of recurrence. Although transurethral resection is a gold standard therapy, recurrences frequently occurs. Bacillus Calmette Guerin (BCG) has become an immunotherapy method for recurrent tumors, but after treatment, the recurrences are frequently occurring. Upon this knowledge, the aim of this study was to evaluate the responsibility of CSCs from recurrences after BCG. The changes of cytokine and chemokine expressions in bladder cancer and cancer stem cell cultures in vitro on which BCG treatment in combination with other immunotherapeutic agents applied.

In this study, three cell lines with different characteristics (T24, 5637 and JMSU-1) of human bladder cancer cells and CD44+ bladder CSCs isolated by magnetic bead isolation (Miltenyl Magtech) were used. Bladder cancer cell lines, and bladder CSCs in complete medium were cultured under humidified conditions of 37 °C temperature in 5% CO₂. BCG, interferon alpha, interleukin 2, mononuclear cells and their combination were applied on bladder cancer cell lines, and bladder CSCs for 24, 48 and 72 hours. Annexin V- PI was used to detect the percentages of apoptotic and necrotic cells in treatment groups and control groups. After treatments, total RNAs were isolated and converted to cDNA for each group and controls. Quantitative fold changes in terms of gene expression were measured by RT –PCR array and fold changes for expression levels of genes were compared among groups. 84 genes in standard array of chemokines and cytokines (Biorad) were analyzed.

BCG treatment at 7.32 microgram/ml dose in combination with IL-2 (1000IU/ml) and mononuclear cells (MNC) (1000 cells/ml) was found to be most effective in bladder cancer cells. When BCG and its combinations were applied to CSCs of each three cell line, BCG treatment showed cytotoxic effect on CSCs as well as cancer cells. CSCs of three cell lines over expressed CXCL5, CCL8, CNTF, CSF2 compared with cancer cells. Cancer cells over expressed IL6, TNSFF11, FASLG, CXCL9 compared with CSCs. In all three cell lines; BCG application increased expression of CXCL5 and LTB; besides decreased CCL20 and IL6. When BCG was combined with IL-2 and MNCs CXCL10, CXCL5, IFNG were increased and CXCL12, IL-6, TNSF11 were decreased. BCG treatment on CSCs caused increase in ADIPOQ, CXCL10, XCL1 and decrease in CCL8. When IL-2 and MNCs were combined with BCG; expression of many of the cytokines and chemokines were decreased.

BCG treatment differs many of the cytokines and chemokines expression in bladder cancer. The expression differs on three different cell lines and their CSCs. Immun modulation of each case differs among each other. The affectivity of BCG based immunotherapy in bladder cancer on CSCs might decrease with combination of MNCs and IL-2. Our results indicate that recurrences after BCG treatment in bladder cancer may not be mainly based on CSC hypothesis considering bladder cancer as a systemic disease occurring at different loci of surface epithelium. Our next step will be evaluating BCG effect ex vivo on cancer cells obtained from patients with bladder cancer.

Key Words: Bladder cancer, Bacillus Calmette Guerin, Cancer Stem Cells

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Mesane kanseri (ürotelyal karsinom) mesanenin en iç tabakasından kaynaklanan bir kanser tipidir. Ekonomik açıdan gelişmiş ülkeler arasında tüm kanserler içinde yüksek prevalans gösteren kanserlerden birisidir. Mesane kanserlerinin büyük çoğunluğu transisyonel hücreli karsinomdur ve invaziv mesane kanseri (NMIBC) ve intramuskular invaziv mesane kanseri (MIBC) olmak üzere iki alt tipi vardır. Erken evrede tedavi edilebilen bir hastalık olmasına karşın yüksek rekürrens ile karakterizedir. Bu durumun asıl sebeplerinden birisi olarak CD44+ kanser kök hücreleri (KKH) düşünülmektedir. *Bacillus calmette guerin* (BCG) mesane kanseri tedavisinde altın standart immüterapi halini almıştır. Nötrofilleri tümör mikroçevresine çekerek etkisini göstermektedir. BCG, IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, GM-CSF, tümör nekrozis faktörü (TNF) gibi kemokinlerin ürotelyal hücrelerde indüklenmesine neden olmaktadır. BCG tedavisine yanıt veren hastaların %40- 50 'sinde 5 yıl içerisinde sıklıkla rekürrensler görülmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu çalışma ile mesane kanserinde uygulanan BCG immunoterapisinin mesane kanseri kök hücrelerine etkin olup olmadığı sorgulanarak sık rekürrenslerin altında hangi immunolojik mekanizmaların olduğu sorusuna yanıt aranmıştır. Mesane kanserinde kök hücreler CD44 pozitifliği ile tanımlanmıştır. Ancak mesane kök hücrelerine BCG tedavisinin etkisi ve immunolojik mekanizmalarını sorgulayan çalışma literatürde yer almamaktadır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Bu araştırmanın hipotezi, “mesane kanserinde BCG immunoterapisi sonrasında sık rekürrenslerden kanser kök hücreleri sorumludur” şeklinde önermemizdir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Kanseri:

Mesane tümörlerinin büyük çoğunluğu epitelyal kökenlidir. Bu grupta en sık görülen ürotelyal karsinomdur ve erkeklerde birkaç kat daha sıktır. Karsinom gelişiminde sigara, analjezikler, bazı karsinojenlere meslek gereği maruz kalma ve şistozomiyazis sorumlu tutulmaktadır. Ürotelyal kanserlerin sınıflamasında, son yıllarda WHO/ISUP sistemi yaygınlık kazanmaktadır. Ayrıca karsinomlar grade 1,2,3 yerine düşük yüksek dereceli olarak iki grupta toplanmıştır. Transizyonel epitel yerine de, ürotelyum kullanılması önerilmektedir. Derece 1 karsinom düşük dereceli, derece 2 ve 3 ise yüksek dereceli karsinom ile eşdeğerdir.

Ürotelyal karsinom histopatolojik olarak çoğunlukla papiller veya papiller yapı oluşturmeyen solid morfolojide izlenir. Tümör derecesi ve evresi en önemli prognostik kriterlerdir.

Yeni tanı alan hastaların büyük kısmında tümörler, yüzeysel ve düşük dereceli olup prognozları mükemmeldir. Ancak hastaların %30-70'inde rekkürrens izlenmekte ve bunların da %10-30'unda invaziv kanser gelişebilmektedir. Bu nedenle mesane kanseri olan hastalarda, erken rekürrens ve ilerlemeyi tespit edebilmek ve erken müdahale yapabilmek için sık aralıklarla sistoskopi ve idrar sitolojisi ile yakın takip gereklidir. Sistoskopinin invaziv bir (2) işlem olması, sitolojinin ise yeterli duyarlılığının olmaması nedeniyle günümüzde, idrar bazlı tümör belirleyicilerin mesane tümörü tanı ve takibinde önemi artmıştır.

Mesane kanseri birçok hastada makroskopik veya mikroskopik hematüri, üriner semptomlar veya her ikisinin de birlikte görüldüğü bir semptomatik hastalıktır. Diğer kanserlerin aksine mesane tümörleri otopsilerde nadiren görülmektedir. Mesane kanseri yüksek hayati risk taşıyan ve hem hasta, hem de toplum bakımından sorun oluşturan bir kanser türüdür. Bu gözlemler, taramanın ve erken tanının hastaların prognozlarını olumlu yönde etkilediği hipotezini desteklemektedir.

Mesane kanserinin en sık görülen semptomu ağrısız hematüri olup, hastaların %85'inde görülür. Mikroskopik hematüri ise tamamında vardır. Bu, hastayı hemen hekime başvurmaya zorlayan bir semptom olup, her hekim tarafından ciddiyle araştırılmalıdır. Öyle ki hematüriyi açıklayacak bir bulgunun varlığında bile mesane

tümörü yönünden gerekli araştırma yapılmalıdır. Hematüri derecesi hastalığın şiddeti ile korele değildir. Hematüri mikroskobik de olsa, aralıklı olacağından hematürik bir tetkik sonrasında normal bir idrar tetkiki olması sistoskopiye ekarte ettirmemelidir. Pollaküri, ani sıkışma hissi ve dizüriden oluşan mesane irritatif semptomları, ikinci sıklıkta görülen semptomlar olup hastaların %20'sinde görülür. Bu yakınmalar genelde yaygın karsinoma in-situ (CIS) ya da invazif mesane kanserini düşündürür. Üreteral obstrüksiyona bağlı (3) şiddetli yan ağrısı ve akut piyelonefrit gelişmesine bağlı olarak üşüme, titreme görülebilir. Diğer semptomlar ise pelvik kitle ve lenfatik obstrüksiyona bağlı olarak görülen alt ekstremitte ödemidir. Küçük bir grup hasta ise ilerlemiş veya yayılmış mesane kanserine bağlı olarak iştahsızlık, kilo kaybı, halsizlik, karın ağrısı ve kemik ağrısı gibi metastatik yakınmalar ile başvurur. Mesanede en sık ürotelial karsinom görülürken, %5'den az skuamöz hücreli karsinom, nadiren metastatik ve primer adenokarsinomlar görülebilir (4-5).

Mesane kanserinde tanıda en sık sistoskopi kullanılır. Floresans endoskopi eskiden denenmiş ama yan etkiler nedeniyle terk edilmiş bir yöntemdir. İntravenöz piyelografi, ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme, sanal sistoskopi, PET tanıda, evrelemede ve takipte kullanılabilen yardımcı görüntüleme yöntemleridir (6-7).

Özetle, mesane kanseri tanısındaki altın standart sistoskopidir. Mesane kanseri için en sık kullanılan testler, hematüri açısından yapılan idrar analizi ve idrar sitolojisidir. Her iki testin de ayrı güçlü ve zayıf oldukları yanlar bulunmakta ve mesane kanseri tespitini güçlendirmek için sıklıkla birlikte kullanılmaktadırlar. Hiçbir test uygun bir tarama gereci olamamıştır.

Sistoskopik olarak tespit edilebilen olguların tümünde hematüri bulunmakla beraber, hastaların %85'inde başlangıç semptomunun ağrısız hematüri olduğu bilinmektedir. Hematüriyi saptamada kullanılan mevcut yöntemler duyarlı, ucuz ve güvenilirdir. Bu yöntemler içerisinde üriner sedimentin mikroskobik incelemesi ve santrifüje edilmemiş kısmın özel bir çubuk "dipstick" ile incelemesi bulunmaktadır. Her ne kadar teknik olarak daha zor ve zaman alıcı olsa da mikroskobik inceleme, hemoglobüri ve myoglobüri gibi yanlış negatif sonuçlara neden olacak durumlara engel olmaktadır.

Üriner sitoloji, dökülen ürotelyal hücrelerin mikroskopik değerlendirilmesi ile yapılmaktadır. Yüksek dereceli malign hücrelerin karakteristik bir görünümü bulunmakta ve normal ürotelyum hücrelerinden rahatlıkla ayırt edilebilmekte iken; düşük dereceli mesane kanserinin bu yöntemle tespiti genellikle zordur. Birçok araştırmacı yüksek dereceli tümörler için %70-85 arasında, düşük dereceli tümör için %30-40 oranlarında duyarlılık bildirmektedir. Deneyimli bir inceleme ile sitolojinin özgüllüğü, %90'ları aşan mükemmel değerlere sahiptir (5).

Mesane kanseri genel olarak mesanenin en içte bulunan tabakasını meydana getiren üroepitelyum adı verilen dokudan kaynaklanan ve ürotelyal karsinom olarak da isimlendirilen bir kanser çeşididir. Mesane kanseri ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde en yüksek prevalans gösteren kanserlerden biri olup ürolojik maligniteler arasında Çin 'de birinci sırada, ABD 'de ikinci sırada görülmektedir (1-5). Malign mesane kanserlerinin büyük çoğunluğu ürotelyal epitelden gelişen ürotelyal karsinomdur. Ürotelyal karsinom, histopatolojik olarak kasa invaze olmayan mesane kanseri (NMIBC) ve kasa invaze mesane kanseri (MIBC) olmak üzere iki grupta değerlendirilir. Hastaların %70 -80 'inin ilk teşhisinde mukoza ile sınırlı NMIBC ile karşılaşmaktadır. Mesane kanserlerinin büyük kısmı kanserin en iç tabakada geliştiği ve yüksek oranda tedavinin sağlanabildiği erken evrede teşhis edilmektedir. Hastalığın progresyonu ile birlikte mesane dokusuna ve mesane çevresinde yer alan yağ dokusuna doğru invaze olmaktadır (5, 6). En sık metastaz yaptığı dokular akciğer, beyin, karaciğer ve kemiktir. Erken evrede tedavi gerçekleştirilmesine karşın hastalığın rekürrensleri oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Bu nedenle mesane kanseri olup tedavi sonrası iyileşen hastaların rekürrens riskine karşılık belirli periyodlar ile kontrol edilmesi gerekmektedir (7).

2.2. Kanser Kök Hücresi:

Kanser kök hücresi (KKH) hakkındaki ilk direkt kanıt, 1997’de Dick J. ve arkadaşlarının yayımladıkları makale ile gelmiştir. Dick J. ve grubu, akut myelojenik lösemili (AML) hastaların kanlarından izole ettikleri lösemik hücrelerin küçük bir grubunun (yaklaşık 10 000 hücrede <1 hücrenin), diyabetik olmayan ağır immünsupresif (NOD/ SCID) farelerde orijinal tümörü oluşturabildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, bu hücre grubunun normal hematopoetik kök hücrelerin fenotipinde olduğunu (CD 34+ /CD 38-) tesbit etmiş ve kanserin normal kök hücrelerden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (8).

Daha sonraki yıllarda başka araştırmacılar, Dick J. ve arkadaşlarının açtığı yoldan ilerleyerek, bu grubun “lösemik kök hücreleri” izole ettiği ve bu hücrelerin kök hücre özelliklerini test ettiği yöntemleri, solid tümörlere adapte etmişlerdir. Bu bağlamda meme kanseri ve glioblastomlarda yapılan araştırmalar başı çekmiş (2003 ve 2004) ve ardarda kolon kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanseri gibi birçok solid tümörde “kanseri kök hücreleri” gösterilmiştir (9).

Bir tümör içindeki hücreler görece homojendir ve tümörün oluşmasına ve ilerlemesine yol açan genetik değişiklikler bütün hücrelerde oluşurlar. Sonuçta tümörejenik yolların anlaşılması ve tümörün eradike edilmesini sağlayacak tedaviler, tümördeki hücrelerin hepsini kapsamalıdır. KKH ‘leri tümörü başlatan nadir bir hücre popülasyonu olup biyolojik ve fonksiyonel olarak diğer hücrelerden farklıdır.. Dolayısıyla, kanser relapsını efektif olarak önleyebilecek tedavilerin geliştirilebilmesi için araştırmalar KKH’leri üzerinde yoğunlaştırılmalıdır. İn-vivo olarak tümör oluşumunu başlatabilecek kapasiteye sahip olan kök hücrelerin prospektif olarak tümörün geri kalan büyük kısmından izole edilmesi üzerine KKH ‘lerin moleküler ve biyolojik temelleri araştırılmaktadır (8, 9).

KKH ‘lerin tanımlandığı birçok belirteç bulunmaktadır. Lösemiler için CD34+CD38-, meme kanserinde CD44+CD24-/düşük, beyin, kolon ve akciğer kanserlerinde CD133+, karaciğer kanserinde CD90+ CD45- fenotipleri ile tanımlanan kanser tipine özgü çeşitli KKH’leri tanımlanmıştır. Mesane kanserlerinde güncel çalışmalarda tanımlanan KKH ‘leri CD44+ fenotip ile karakterizedir. Yüksek rekürrens oranlarına sahip agresif bir kanser tipi olan mesane kanserlerinde rekürrens kaynağı olarak CD44+ KKH ‘leri öne sürülen sebeplerden biridir (8-10).

2.3. Bacillus Calmette Guerin (BCG):

Bacillus calmette guerin (BCG) mesane kanserlerinin tedavisinde altın standart haline gelmiş bir immunoterapidir (2, 11, 12). Etki mekanizmasını nötrofilleri tümör mikroçevresine yönlendirerek gerçekleştirmektedir. BCG 'ye maruz kalan ürotelial hücrelerde birçok kemokin uyarılmaktadır. IL-1, IL-6, IL-8, IL-17 interlokinleri, GM-CSF, tümör nekrozis faktör (TNF) bunlar arasındadır. Mesane kanserinde BCG intravezikal immünoterapisi özellikle NIMBC rekürrensini ve progresyonu azaltmak için en etkili adjuvan tedavi şeklidir. BCG tedavisi küçük residuel tümörlerin %50- 60'ında, karsinoma in-situlerin %70-75 'inde tam yanıt oranlarına sahiptir. Ancak hastaların b   k bir kısmı BCG başlangıç tedavisine yanıt vermemekte ve yanıt verenlerin %40-50 'sinde 5 yıl içinde rekürrens görülmektedir. MIBC 'da ise sisplatin temelli MVAC (metotreksat, doksorubisin, sisplatin) standart tedavidir (13- 18).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın tipi

Bu araştırma, ilaç dışı girişimsel olmayan deneysel bir laboratuvar çalışmasıdır. Hasta örnekleri içermemektedir. Araştırma insan kanser hücre hatlarıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma DEÜ Onkoloji Enstitüsü Onkoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Proje 24 aylık planlandı. İlk altı ay, kimyasal malzemelerin alınması; sonraki üç ayda, deney modellerinin optimizasyonu; daha sonraki altı aylık sürede in vitro deneylerin gerçekleştirilip analizlerinin yapılması ve sonraki 6 ayda literatürlerin toplanması, yeniden gözden geçirilmesi, verilerin derlenmesi, sonuçların istatistiksel analizi ve yorumlanması, son 3 aylık dönemde yayın haline getirilmesi şeklinde gerçekleştirildi.

3.3 Araştırmanın evreni ve örnekleme:

Bu çalışmada kullanılan hücre hatlarından T-24, 81 yaşındaki kadın hastanın primer mesane karsinomundan (transisyonel hücreli kardinom, grade 3) elde edilmiş bir ticari hücre hattıdır. Bir diğer hücre hattı olarak 5637 kullanıldı. Bu hücreler 68 yaşında erkek hastanın primer mesane karsinomundan elde edilmiş bir ticari hücre hattıdır. Üçüncü kullanılan hücre hattı JMSU-1 ise, 75 yaşında mesane kanseri erkek hastanın malign assitik sıvısından orijinlenmiş olan epitel hücreli ticari bir hücre hattıdır. Tümörojenik fare deneylerinde de kullanılabilir özelliktedir. Bu hücre hatları 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/ streptomisin ilaveli 10% fetal bovin serum içeren DMEM ve RPMI 1640 ortamlarında kültüre edildi. Haftada 2 veya 3 defa ortamları tazelenerek 37°C de % 5 CO₂ 'lik etüvde inkübe edildi. Kök hücre izolasyonu için uygun miktarda hücre popülasyonuna ulaşana dek kültür süreci devam ettirilecektir.

3.4 Çalışma materyali

Bu çalışmada üç tip mesane kanseri hücre hattı kullanılarak kültüre edildi;

- JMSU-1: 75 yaşında mesane kanseri erkek hastanın malign assitik sıvısından orijinlenmiş olan epitel hücreli, mesane kanseri hücre hattı

- T-24: 81 yaşında mesane kanseri mesane kanseri tanılı kadın hastanın primer tümöründen orijinlenmiş olan transisyonel hücreli karsinom
 - 5637: 68 yaşında mesane kanseri tanılı erkek hastanın primer tümöründen orijinlenmiş olan grade II karsinom
- Hücre hatlarının her üçü de tümörojenik fare deneylerinde de kullanılabilir özelliktedir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bu çalışmada mesane kanseri ve kanser kök hücrelerinin immun ilişkili gen ekspresyonları bağımsız değişken, immunoterapiler ile canlılık ve gen ekspresyon değişimleri bağımlı değişkenlerdir.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

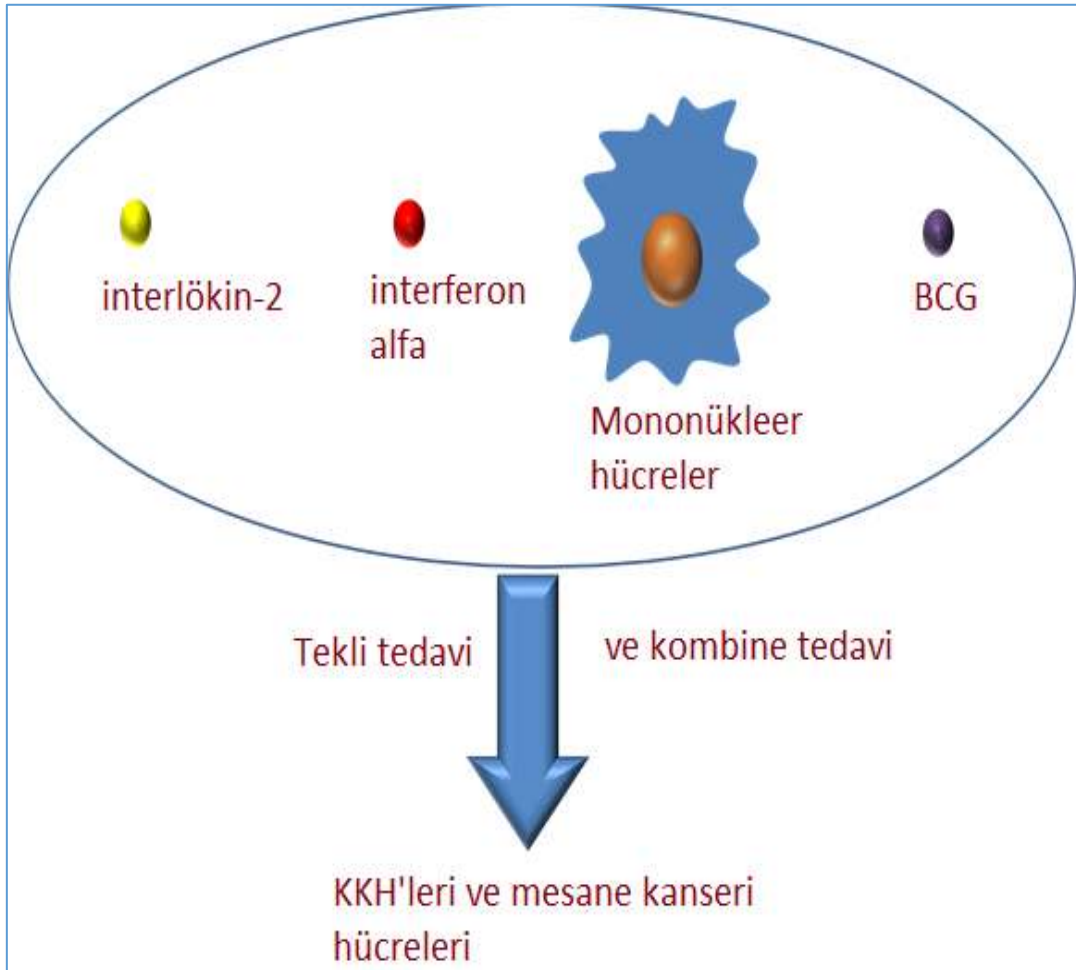
Kültüre ediliş hedeflenen hücre sayılarına ulaşıldıktan sonra aşağıdaki materyallerle deneyler gerçekleştirildi;

- İnkübatör İçi Su Küveti
- CD44 Monoklonal Antikor (50 Testlik)
- Pipet Tabancası 1-100 ml (Pipette Aid)
- Pipet Ucu Mavi 0-1000 ul
- CD44 Manyetik İzolasyon Boncuğu (25 Testlik)
- Alüminyum Folyo En:45 Cm
- Lam Polilizin Kaplı
- Test Plates 96 Kuyucuk/Flat
- PCR Tüpü 0,5 ml Flat Cap
- Serolojik Pipet 2 Ml (Tek Tek Poşetli, Steril)
- Hücre Proliferasyon Reaktifi WST-1
- Farmasidal Solüsyon (İnkübatör Sterilizasyonu)
- PCR Tüpü 2,0 Ml
- Serolojik Pipet 5 Ml (Tek Tek Poşetli)
- Otomatik Pipet Seti (0,5-10; 10-100; 100-1000 Ul)

- DMEM [Dulbecco'S Modified Eagle Medium] 500 Ml.
- Annexin V Antikoru
- RNA İzolasyon Kiti
- Lamel 24x50 100lük
- FBS Fetal Dana (Fetal Bovine) Serum İnaktif Edilmiş
- Penisilin / Streptomisin
- Hücre Hattı 5637 Mesane Kanseri
- Vakumlu Filtre Sistemi 1000 ml'lik
- Savlon Solüsyon
- Kriyo-ependorf kutusu (4ad/Pk) (2 Ml'lik Vialler İçin)
- Kriyo Tüp 1-2 Ml
- Petri Kutusu (100x20mm) Hücre Kültürü
- Petri Kutusu (35x10mm) Hücre Kültürü
- Lam Tasima Kutusu (50 lt'lik.)
- Flask 75 cm²
- Pastör Pipeti 3 ml
- DMSO
- Tripsin EDTA Solüsyonu
- Propidyum İyodür [Propidium İyodide]
- Pipet Ucu Sarı 20-200 ul
- Kriyotüp Dondurma Konteynırı (*Mr. Frosty*)
- Polistren Flow Sitometri Tüpü (Filtreli, Kapaklı 5 Ml)
- Flask 25 Cm²
- PCR Tüpü 1,5 ml
- Serolojik Pipet 10 ml (Steril, poşetli)
- RPMI 1640 (2,0 G/L NaHCO₃ ilaveli)
- Enjektör 10 ml Steril
- Hücre Hattı T-24 Mesane Kanseri
- Hepafiltre (CO₂ İnkübatörü İçin)
- Vakumlu Filtre Sistemi 500 Ml'lik
- Test Plates 6 kuyucuklu/Flat
- Amfoterisin B Flakon

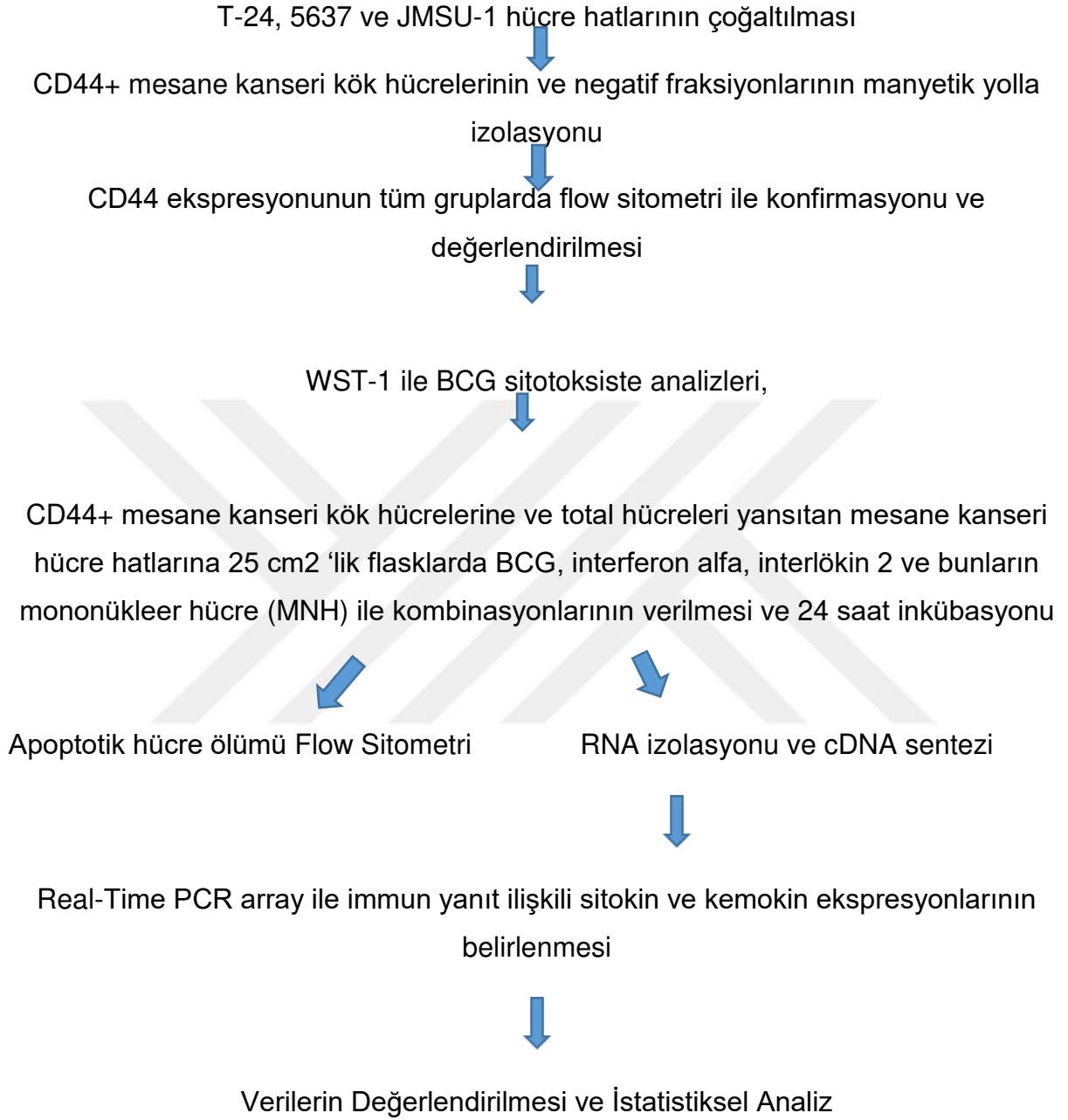
- Fosfat Tamponlu Tuz Ca^{2+} Mg^{2+} içermeyen (*Phosphate Buffered Saline, PBS*)
- L-Glutamin
- Real Time Profiller PCR Array
- İnsülin Enjektörü 1 cc Hacimli
- Real Time Profiller PCR Array

(Şekil 1)



Şekil 1. KKH 'lerine ve total mesane kanseri hücreleri ilaç uygulama planı

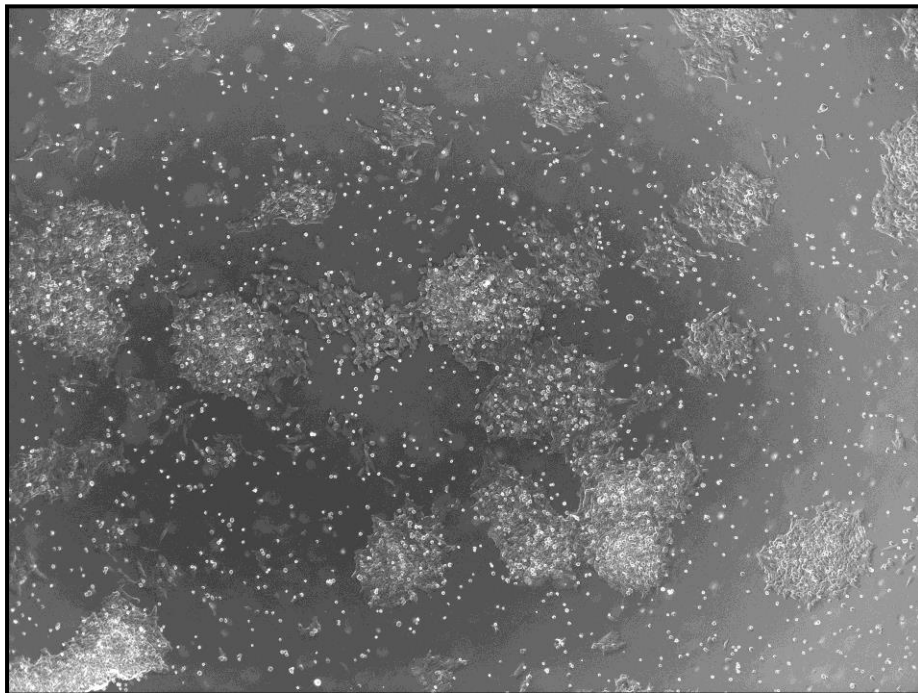
3.6.2 Çalışma Akış Şeması



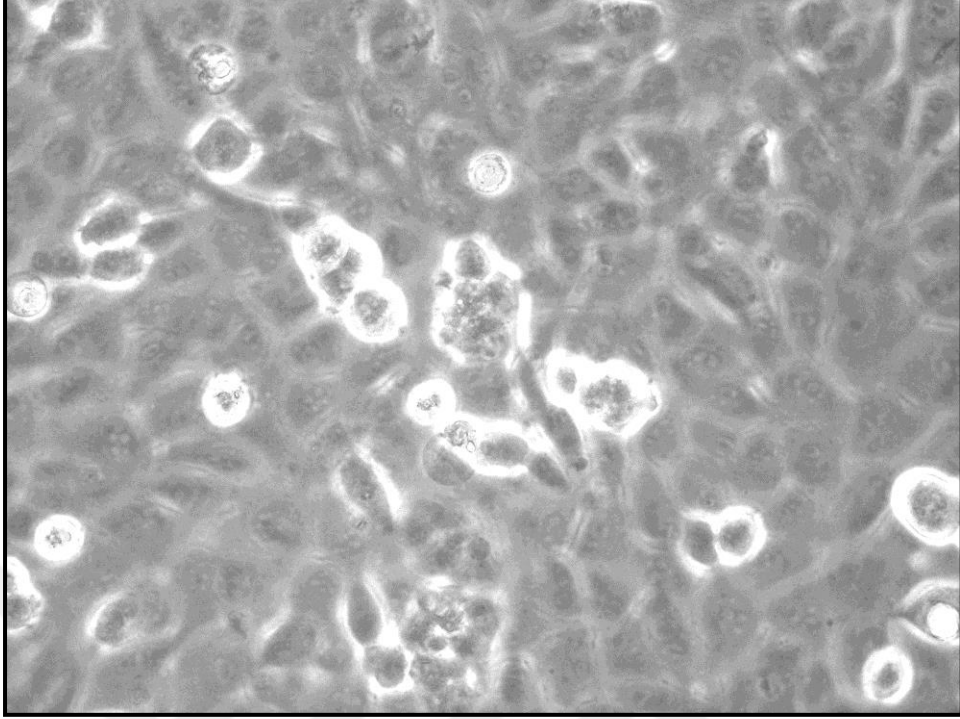
3.6.3. Hücre Kültürü:

Bu araştırmada üç tip mesane kanseri hücre hattı (JMSU-1: DSMZ, ACC-505, T-24: ATCC, HTB-4 ve 5637: ATCC, HTB-9) ile çalışıldı. Bu hücre hatları 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/ streptomisin ilaveli 10% fetal bovin serum içeren DMEM ve RPMI 1640 ortamlarında kültüre edildi. Hücre hatları ticari olarak satın alınıp kuru buz içinde soğuk zincirle nakledilip laboratuvarımıza ulaştırıldı. Teslim alınan hücreler hızlıca 37°C su banyosu içinde steril koşullara uyarak çözüldü ve her hücre hattı için uygun komplet ortamlar içinde inkübe edildi. 25cm² flasklara alınan hücreler 4 cc komplet ortam ile karıştırıldı. 37 derece %5 CO₂ ve hava içeren, küvet içinde 1 litre steril distile su içeren inkübatör içinde nemli ortamda inkübe edildi. 2 cc kriyovial içinde (donmaya dayanıklı burgulu kapaklı tüp) teslim alınan hücreler, hücreler çekildikten sonra tüpün dibinde kalan yaklaşık 10 mikrolitre olan hücreler üzerine 10 mikrolitre tripan mavisi boyası eklenerek Thoma lamında canlılık değerlendirildi. Şeffaf hücreler canlı, ölü hücrelerde sitoplazmik membranlarda oluşan porlardan boya girebildiği için mavi gözlenen hücreler ölü kabul edildi. Her bir hücre hattı için 200 hücre sayıldı. Hücrelerin canlılık yüzdeleri T24 için %82, 5637 için %78, JMSU-1 için %89'du.

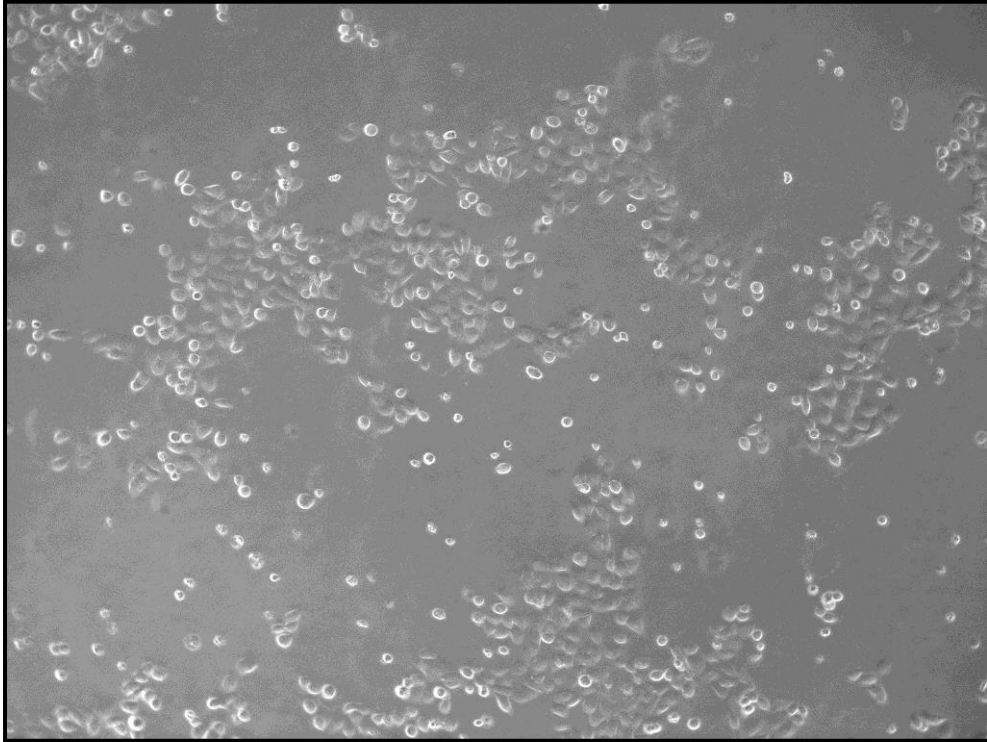
Haftada 2 veya 3 defa ortamları tazelenerek 37°C de % 5 CO₂ 'lik etüvde inkübe edildi. Kök hücre izolasyonu için uygun miktarda hücre popülasyonuna ulaşana dek kültür süreci devam ettirildi. JMSU-1, T-24 ve 5637 mesane kanseri hücrelerinin mikroskopik görüntüleri sırasıyla şekil 2,3 ve 4 de yer almaktadır.



Şekil 2. JMSU-1 mesane kanseri hücrelerinin mikroskopik görünümü



Şekil 3. T-24 mesane kanseri hücrelerinin mikroskopik görünümü



Şekil 4. 5637 mesane kanseri hücrelerinin mikroskopik görünümü

3.6.4. CD44+ Mesane Kanseri Kök Hücre İzolasyonu:

75cm² flasklarda kültüre edilen her üç hücre hattına ait hücreler %80-90 konfluent (doluluk oranı) oldukları zaman, hücrelerin ortamları uzaklaştırılıp ve PBS ile yıkandı. PBS ile yıkama için 5 cc PBS verilip flaskın kapağı kapatılıp, bir kez hafifçe yatay yallanıp klas iki kabiner içinde hepafiltre aktif çalışırken inkübe edildi. Daha sonra PBS pipet tabancası ve 5ml uzun pipet ucu ile çekilip atıldı. Daha sonra cell scraber (hücre kazıyıcı) ile hücrelerin kalkması sağlandı. Hücreler toplanırken sarı pipet ucu ile inceltme yapılarak hücrelerin tek hücre süspansiyonu oluşmasına katkı sağlandı. Daha sonra hücreler 50 mikrometre porları olan steril filtreden geçirildi. 1:1 oranda ortamlar eklenip hücreler falkon tüpler içinde santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler manyetik ayırma tamponu ile resüspanse edildikten CD44 monoklonal antikoru ile inkübe edildi. Manyetik işaretleme için CD44+ olan hücrelere bağlanacak ferritin solüsyonu ile inkübe edildi. Daha sonra tüpler manyetik alana yerleştirilip, magnete tutunmayan CD44- hücreleri içeren süpernatant uzaklaştırıldı. Magnete tutunan manyetik işaretli CD44+ manyetik partikülü uzaklatıracak solüsyonla inkübe edilip magnete koyuldu. CD44+ hücreleri içeren süpernatant toplandı. Böylece CD44+ mesane kanseri kök hücreleri izole edilmiş oldu.

3.6.5. İzole Edilen Kök Hücrelerin Flow Sitometrik Konfirmasyonu

CD44+ mesane kanseri kök hücreleri mesane kanseri hücreleri CD44 monoklonal antikoru ile oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk inkübe edildikten sonra PBS ile yıkanarak flow sitometrik olarak izole edilen hücrelerin saflığı açısından değerlendirildi. İzole edilen hücreler %97 CD44 pozitif.

3.6.6. Deney Modeli

1. grup: Kontrol CD44+ ve CD44- hücrelerin birlikte bulunduğu total hücre popülasyonu (Ortam eklenmiş) her üç hücre hattı için
2. grup: CD44+ ve CD44- hücrelerin birlikte bulunduğu total hücre popülasyonu (BCG eklenmiş) her üç hücre hattı için

3. grup: CD44+ ve CD44- hücrelerin birlikte bulunduğu total hücre popülasyonu (BCG+MNH+ IL2) her üç hücre hattı için
4. grup: CD44+ mesane kök hücreleri (Ortam eklenmiş) her üç hücre hattı için
5. grup: CD44+ mesane kök hücreleri (BCG) her üç hücre hattı için
6. grup: CD44+ mesane kök hücreleri (BCG+MNH+ IL2) her üç hücre hattı için

Yukarıda belirtildiği şekilde her hücre hattı için 6 'şar grup oluşturuldu. Sonuç olarak toplam 18 grup elde edildi.

3.6.7. BCG, IL-2, Mononükleer Hücre Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

Hücre kültürlerinde BCG'nin hücre canlılığı üzerine etkisi WST-1 testi ile, apoptotik hücre ölümü flow sitometrik olarak değerlendirildi. WST-1 yöntemi kullanılarak BCG ile muamele edilen hücrelerin %50 oranında canlılığını kaybettiği BCG konsantrasyonu belirlendi. Tespit edilen bu doz daha sonra yukarıda belirtilen gruplara 24 cm² lik flasklarda verilerek 24 saatlik inkübasyonun ardından nükleik asit izolasyonu ve RT-PCR deneyleri yapıldı. BCG için mesane kanserinde tedavide kullanılan Onco-tice (Merck) 2ml ampül kullanıldı. Hasta tedavi dozu bir ampülü 50 cc ye tamamlama şeklinde dilüsyondur. Bir ampül 5x10⁸CFU BCG tice suşu içermektedir. Dilüsyon sonrası birim doz 1x10⁷CFU/ml dir. Bu dozun 1/100, 1/50, 1/25, 1/10, 1/5, 1, 5, 10, 25,50, 100 kat dozları 96 well platelere ekilmiş hücrelere eklenerek 24 ve 48 saat sonrası etkileri WST-1 testi ile kontrol ile karşılaştırmalı olarak ELİSA okuyucuda değerlendirilmiştir. Mononükleer hücreler için ORh negatif insana ait araştırma arşivimizde bulunan aferez ürünü kullanılmıştır. 10⁴ hücre/ml olacak şekilde ekleme yapıldı. IL-2 için Proleukin (Novartis) ampül kullanılmıştır. Liyofilize toz olan ticari ürün 1 ml SF le sulandırılır. 10⁶IU/ml interlökin-2 içerir. 10⁴ IU/ml olacak şekilde hücre kültüründe ekleme yapılmıştır. 1 ml de çözölen toz karışımından 10 ml ortam içine 100mikrolitre eklenerek final konsantrasyona ulaşılmıştır. Denemeler sonrası mililitrede 10⁷CFU içeren BCG, 10⁴ IU içeren IL-2 ve 10⁴ mononükleer hücre apoptoz ve RT PCR çalışmaları için kullanılmıştır.

3.6.8. WST-1 ile Hücre Proliferasyonunun Tayini:

Hücrelerin bulunduğu 96 kuyucuklu plate içinde boş bir kuyucuğa da sadece ortam koyularak kör olarak kullanıldı. 100 µl/kuyucuk hücre için her kuyucuğa 10 µl/kuyucuk WST1 hücre proliferasyon reaktifi eklenerek (1:10 dilüsyon) hücreler 37°C %5 CO₂ lik etüvde 2 saat inkübasyona bırakıldı. Plate çalkalayıcıda 1 dk çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda 450 nm de okutuldu. Referans dalga boyu olarak 600 nm den fazlası (630 nm) seçildi. Kontrol grubunun absorbans ortalamaları %100 canlılık olarak kabul edilerek diğer absorbanslar karşılaştırılarak hücre canlılık yüzdeleri tayin edildi.

3.6.9. Flow sitometrik Annexin V-FITC/PI Boyaması

Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) boyaması apoptotik hücre ölüm oranını belirlemek için uygulandı. Hücreler Annexin V-FITC apoptoz deteksiyon kiti kullanılarak protokole uygun olarak boyandı. 5 ul Annexin-V-FITC ve 10 ul PI reaktifleri 100 ul PBS içerisinde süspanse edilmiş olan ilgili deney gruplarındaki hücrelere verildi. 15 dakika karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübasyonun ardından, 10x den 1x e seyreltilmiş olan Annexin-V bağlayıcı solüsyondan her örneğe 400 ul eklendi. BD Accuri C6 akım sitometri cihazında örnekler okutulduktan sonra BD Accuri C6 yazılımı ile uygun kapılamalar yapılarak apoptoz oranları tespit edildi.

3.6.10. RNA İzolasyonu

İzole edilen CD44+ kök hücreleri ile total mesane kanseri hücreleri ve BCG uygulanmış alt grupları uygun seyreltme işlemleri ardından TOMA lamı ile sayıldı. Buna göre 1×10^6 hücre başına yaklaşık 15 µg RNA eldesi için prosedür şu şekilde gerçekleştirildi. Hücreler 200 µl PBS içinde resüspanse edildi. 400 µl liziz ve bağlanma tamponu eklenip 15 sn vortekslenip, yüksek saflıkta filtreli tüp koleksiyon tüpüne takıldı. Örnek üstteki filtreli tüpe aktarılıp, 15 sn 8000 g de santrifüjlendi. Filtreli tüp koleksiyon tüpünden çıkarıldı. Koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüpler tekrar takıldı. Örnek başına 90 µl DNAaz inkübasyon tamponu reaksiyon tüpüne eklendi. 10 µl DNAaz I eklenip karıştırılıp bu karışım filtreli tüpe ilave edildi ve 15 dk

oda sıcaklığında inkübe edildi. Filtreli tübe 500 µl yıkama tamponu I eklenip 15 sn 8000 g de santrifüjlendi. Alttaki koleksiyon tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüpler tekrar takıldı. Filtreli tübe 500 µl yıkama tamponu II eklenip ve 15 sn 8000 g de santrifüjlendi. Alttaki koleksiyon tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra aynı tüpler tekrar takıldı. 200 µl yıkama tamponu II filtreli tüpe eklenip 2 dk max. hızda santrifüjlendi (13000 g). Daha sonra koleksiyon tüpü atılıp, filtreli tüp yeni bir steril 1.5 ml 'lik mikrosantrifüj tüpüne takıldı. RNA elüsyonu için 50-100 µl elüsyon tamponu filtreli tüpe eklendi. 1 dk 8000 g de santrifüjlendi. Elde edilmek istenen RNA artık alttaki 1.5 ml 'lik mikrosantrifüj tüpünde bulundu. Bu RNA cDNA sentezi ve ardından RT-PCR çalışmasında kullanılmak için -80 °C 'de saklandı.

3.6.11. cDNA çevirimi:

Elde edilen RNA miktarları Qubit cihazında ölçüldü. Bazı örneklerden elde edilen RNA miktarları, hücre azlığı kaynaklı olarak çok azdır. Bu nedenle RNA örneklerinden cDNA çevirimi için alınabilecek maksimum miktarda RNA alınmış ve iScript™ cDNA Sentez kiti (BioRad) ile üretici firmanın açıkladığı şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA örnek miktarları ve cDNA çevirim miktarları Tablo 1'de belirtildi.

Tablo 1. RNA örnek miktarları ve cDNA çevirim miktarları

Hücre Adı	RNA konsantrasyonu (ng/μl)	cDNA için alınan miktar (μl)	cDNA'ya çevrilen miktar (ng)
JMSU hücre	155,2	6	931
JMSU hücre+BSG	20,8	13	270,4
JMSU hücre + BSG+ MNH+ IL2+ IFNα	16,4	13	213,2
JMSU kök hücre	2,50	13	32,5
JMSU kök hücre + BSG	1,46	13	18,98
JMSU kök hücre + BSG+ MNH+ IL2+ IFNα	14,1	13	183,3
5637 hücre	92,8	10	92,8
5637 hücre+BSG	40	13	520
5637 hücre + BSG+ MNH+ IL2+ IFNα	72	13	936
5637 kök hücre	2,42	13	31,46
5637 kök hücre+BSG	5,28	13	68,64
5637 kök hücre + BSG+ MNH+ IL2+ IFNα	6,08	13	79,4
T24 hücre	27,2	13	353,6
T24 hücre +BSG	22,4	13	291,2
T24 hücre + BSG+ MNH+ IL2+ IFNα	33,2	13	431,6
T24 kök hücre	9,44	13	122,72
T24 kök hücre+BSG	6,96	13	90,48
T24 kök hücre + BSG+ MNH+ IL2+ IFNα	11	13	143

cDNA'ların kalitesi RT-PCR reaksiyonu ile array'e konmadan önce test edildi. 0,1µM'lık 1X'lik primer-enzim karışımı ara stoğu hazırlandı ve kullanıma kadar -20oC'de muhafaza edildi. cDNA-SYBR Green Master mix (BioRad) karışımı, 100 gen örneğine göre aşağıdaki şekilde hazırlandı.

100 X cDNA Master-mix karışımı

<u>dH₂O</u> (Nuclease-free)	480 µl
<u>cDNA</u>	20 µl
<u>SYBR Green Master Mix</u> (BioRad)	500 µl

Hazırlanan bu cDNA-SYBR Green Master mix karışımı, 1,5ml'lik mikrosantrifuj tüplerine hazırlanıp, vortekslendi ve 9'ar µl, 96 kuyucuklu plate'in her bir kuyucuğuna dağıtıldı. Karışımın üzerine 1'er µl hazırlanan primer-enzim ara stok karışımından eklendi. Toplamda 10µl final hacmindeki PCR-array plate'in üzeri seal ile kapatılıp, 2000rpm'de 1 dk boyunca çevrildi ve PCR gerçekleştirildi. PCR şu aşamaları içerdi:

Primer konsantrasyonu 0.1 µM

Program: 95°C – 10 s, 58°C 45 s (45 siklus)

Elde edilen Cq değerleri 'Qiagen Bioscience' programında analize alındı.

3.6.12. RT-PCR Array Analizi

cDNA 'lar uygun PCR karışımlarına DNA kontaminasyonundan özenle kaçınılarak eklendi. Real-time PCR analizi arrayi olarak immün yanıtta etkili inflamatuvar sitokinler ve reseptörleri için hazırlanmış bir kit kullanıldı. Yapılan veri analizinde şu genlerin ekspresyonları hakkında bilgi edinildi:

Kemokinler: C5, CCL1 (I-309), CCL11 (Eotaxin), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1D), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3A), CCL22, CCL23 (MPIF-1), CCL24 (Eotaxin-2), CCL26, CCL3 (MIP-1A), CCL4 (MIP-1B), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CX3CL1, CXCL1 (IL8RA), CXCL10 (INP10), CXCL11 (I-TAC/IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL2 (IL8RB), CXCL3, CXCL5 (ENA-78/LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9.

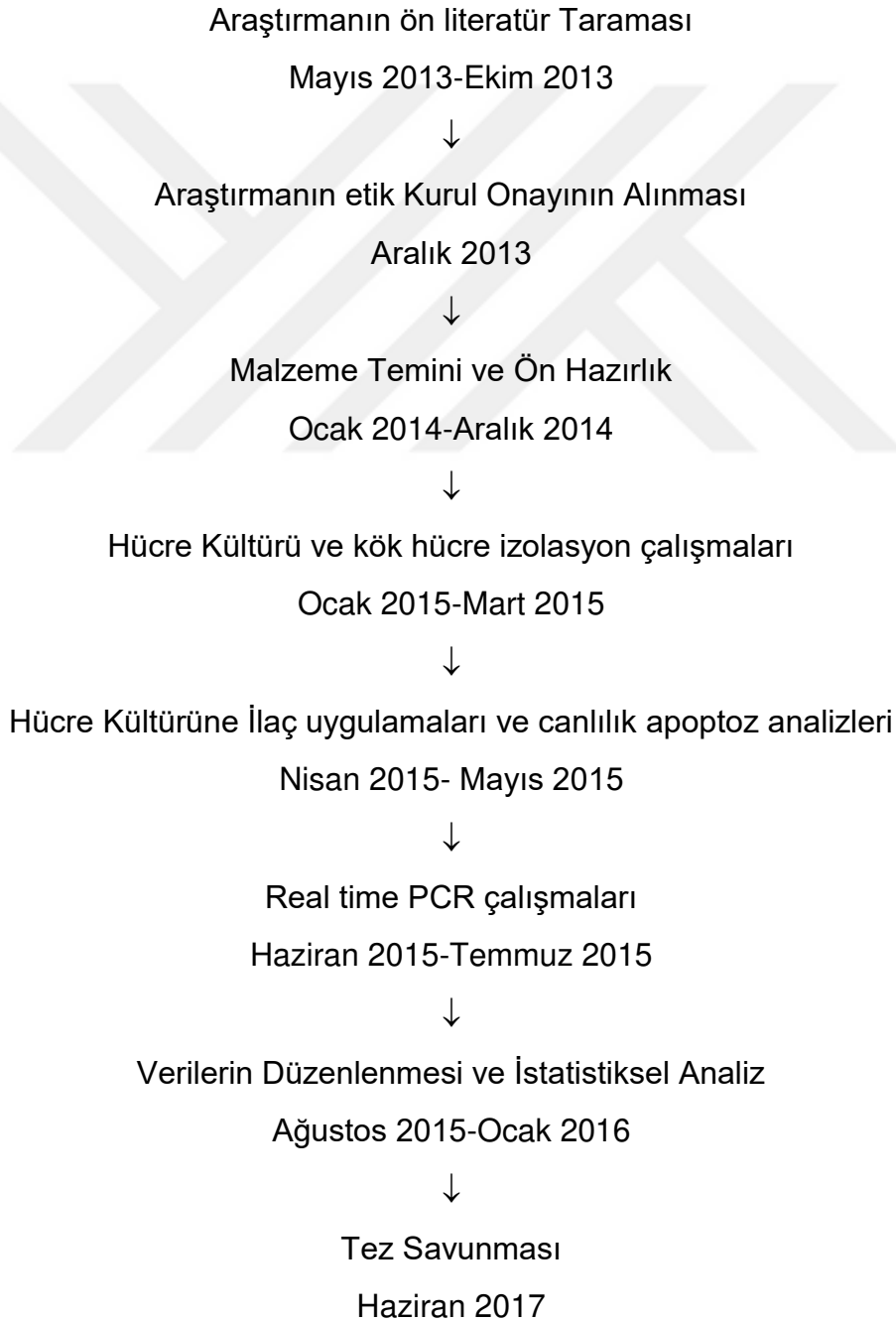
Kemokin reseptörleri: CCL13 (MCP-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CX3CR1, CXCR1, CXCR2.

İnterlökinler: IL13, IL15, IL16, IL17A, IL17C, IL17F, IL1A, IL1B, IL1RN, IL21, IL27, IL3, IL33, IL5, IL7, IL8, IL9.

İnterlökin reseptörleri: IL10RA, IL10RB, IL1R1, IL5RA (CD125), IL9R.

Diğer sitokinler: AIMP1 (SCYE1), BMP2, CD40LG (TNFSF5), CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FASLG (TNFSF6), IFNA2, IFNG, LTA (TNFB), LTB, MIF, NAMPT, OSM, SPP1 (Osteopontin), TNF, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11, TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF4 (OX40L), VEGFA. Diğer sitokin reseptörleri: TNFRSF11B.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Gen ekspresyon kat değişimi (*fold change*) kontrol grubuyla ve gruplar birbiri ile karşılaştırıldı. 3 kat ve fazlası ekspresyon farkı anlamlı kabul edildi. *Heat map* ve *clustergramlar* ile gen ekspresyon analizleri desteklendi. Bu analizler SA Bioscience'ın ücretsiz olarak kullanılabilen *data analysis expression* sayfasında yapıldı. Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde incelendi. Bulgular Ki kare ve Mann Whitney U testiyle analiz edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu araştırmanın sınırlılıkları başında hasta örneği içermemesi gelmektedir. Preanalitik bir laboratuvar çalışmasıdır. Devamında hasta örneklerinden çalışılacaktır. Bir diğer sınırlılık RT-PC tekrar sayısının maddi nedenlerle azlığıdır.

3. 10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu: 05.12.2013 tarihli 2013/44-03 onayı alındı.

4. BULGULAR

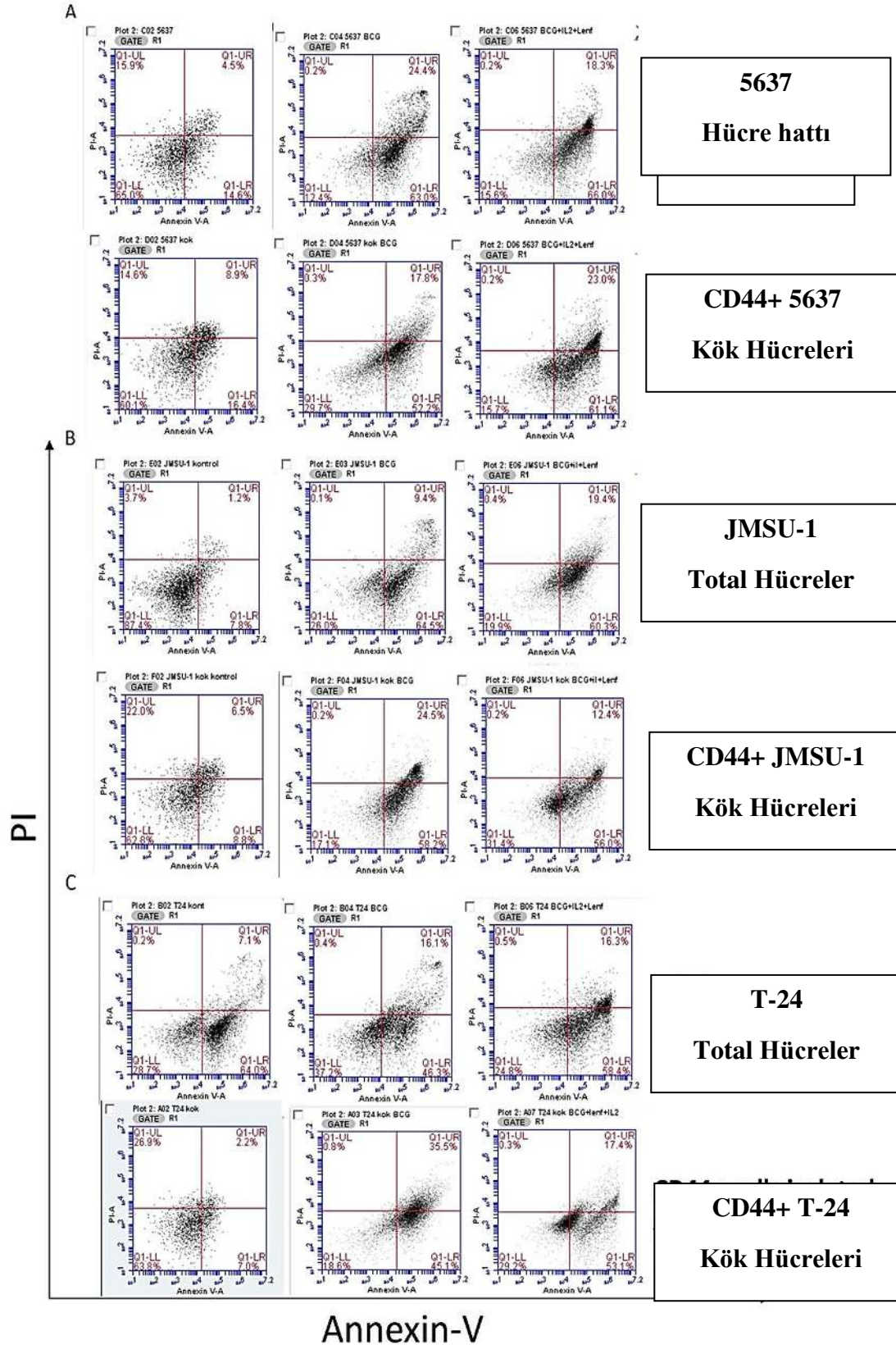
4.1. Akım Sitometri İle Annexin-V/ PI Boyanması Sonucu Apoptoz Bulguları

Anneksin-V ve PI boyanmasına göre BCG 'nin 5637 hücrelerinde %63 oranında erken apoptoza, %24,4 oranında geç apoptoza neden olduğu görüldü. BCG+MNH+IL2 grubunda da tek başına uygulanması ile belirgin bir fark görülmedi. CD44+ 5637 hücrelerinde ise BCG %52,2 oranında erken apoptoza, %17,8 oranında ise geç apoptoza neden oldu. Ancak MNH ve IL2 kombinasyonu ile beraber uygulanan BCG bu hücrelerde %61 oranında erken apoptoz, %23 oranında geç apoptoza neden olarak daha yüksek etki gösterdi. JMSU-1 hücrelerinde ise BCG %64,5 oranında erken apoptoza, oranında %9,4 geç apoptoza neden olurken BCG+MNH+IL2 kombinasyonu %60,3 oranında erken apoptoz, %19,4 oranında geç apoptoza neden olmuştur. Benzer apoptoz indükleyici etkisi BCG nin tek ve kombine uygulanması sonucunda CD44+ JMSU-1 hücrelerinde de görülmüştür. BCG nin tek ve kombine olarak T-24 hücrelerine uygulanması kontrol ile kıyaslandığında belirgin bir farka neden olmamıştır. Ancak CD44+ T24 hücrelerinde BCG uygulanması %45 erken apoptoza, %29,2 geç apoptoza neden olmuştur. Kombine uygulama sonunda ise %53,1 erken apoptoz, %17,4 geç apoptoz görülmüştür. Tüm gruplara ait veriler Tablo 2 de verilmektedir. Bu verilerin elde edilmesinde yapılan kapılamalar Şekil 5 de görülmektedir. Kök hücrelerle kanser hücreleri karşılaştırıldığında kontroller arasında canlılık, apoptoz ve nekroz yüzdelerinde Mann Whitney U nonparametrik ortalamaların karşılaştırılması testinde $p < 0,05$ düzeyinde beklendiği üzere fark çıkmamıştır. Yine aynı istatistik yöntemle kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin BCG uygulaması ve BCG+MNH+IL-2 uygulaması sonrası istatistiksel anlamlı fark çıkmaması kanser hücreleri ile kanser kök hücrelerindeki her grupta benzer hücre yüzdesi saptanması bu kök hücre grubuna benzer etkiler olduğu bulgusunu getirmiştir. P değerleri tablo 2'de en alt satırda görülmektedir. Ortalamaların karşılaştırılması eşleştirilmiş örnekler testinde BCG kanser hücrelerine canlılık düzeyinde etkili ($p=0,046$), kanser kök hücrelerine etkili ($p=0,015$) bulunmuştur. Bu etki kanser kök hücre grubunda apoptoz ve nekroz birlikte etki olarak saptanırken, kanser kök hücre grubunda apoptoz ön plandadır ($p=0,01$). Aynı testte BCG+MNH+IL-2 kanser hücrelerine etkili ($p=0,024$) ve yine kanser kök hücrelerine ($p=0,011$) bulunmuştur. Kanser hücrelerine etki hem apoptoz hem nekroz düzeyinde iken kanser kök hücrelerinde BCG ye IL-2 ve MNH eklenmesi ile apoptoz

etkisi daha ön plana çıkmıştır. Ancak yine aynı testte BCG ve BCG+MNH+IL-2 karşılaştırıldığında hem kanser hem kanser kök hücrelerinde canlılık apoptoz ve nekroz düzeylerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

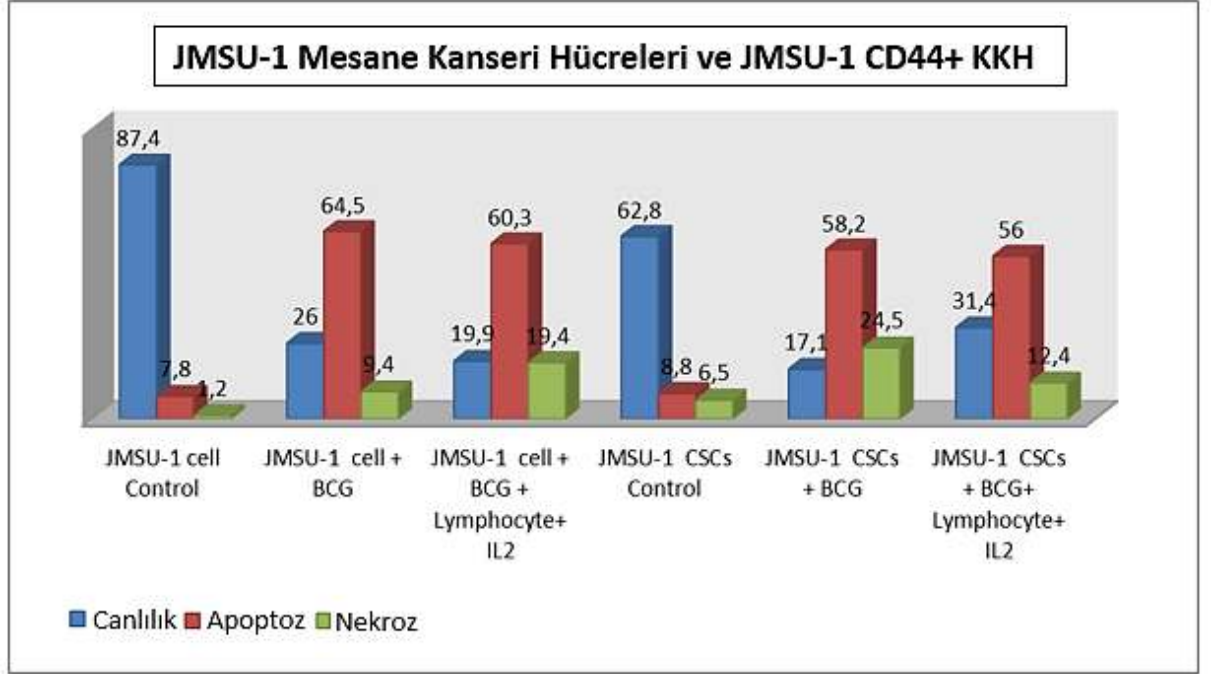
Tablo 2. Tüm deney gruplarında BCG ve kombine uygulanmasının neden olduğu apoptoz yüzdeleri

Hücre hattı	Kontrol (Tedavi verilmeyen)			BCG uygulanmış hücreler			BCG+MNH+IL2 uygulanmış hücreler		
	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz / Nekroz	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz / Nekroz	Canlı	Erken Apoptoz	Geç Apoptoz / Nekroz
JMSU-1	87,4	7,8	1,2	26	64,5	9,4	19,9	60,3	19,4
5637	65	14,6	4,5	12,4	63	24,4	15,6	66	18,3
T24	64	28,7	7,1	37,2	46,3	16,1	24,8	58,6	16,3
P Kontrol x				0,046	0,075	0,082	0,024	0,026	0,034
CD44+ JMSU-1	62,8	8,8	6,5	17,1	58,2	24,5	31,4	56,0	12,4
CD44+ 5637	60,1	16,4	8,9	29,7	52,2	17,8	15,7	61,1	23,0
CD44+ T24	63,8	7,0	2,2	18,6	45,0	35,5	29,2	53,1	17,4
P Kontrolx				0,015	0,010	0,106	0,011	0,001	0,057
P hücre/kök hücre	0,1	0,7	0,7	1	0,4	0,2	0,4	0,4	1



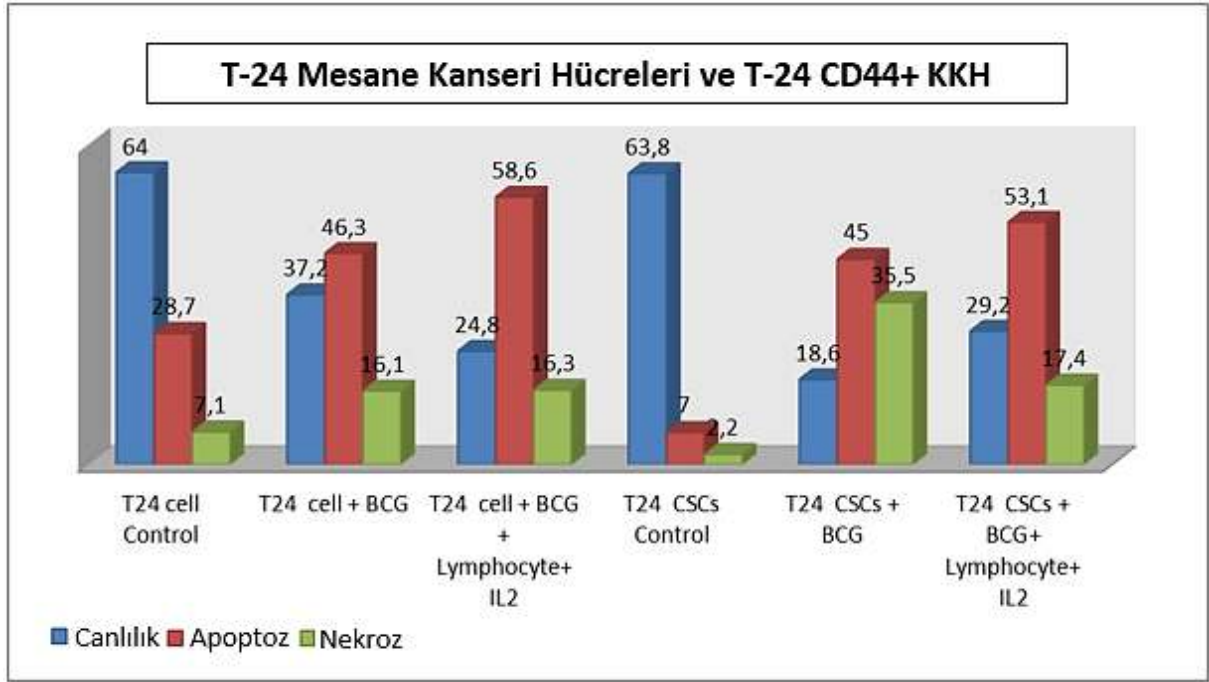
Şekil 5. Apoptozun akım sitometri ile değerlendirilmesinde yapılan *dot plot* analizi ve kapılamalar

Yapılan analizler sonucu JMSU-1 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranlarının kıyaslandığı grafik şekil 6 da yer almaktadır.



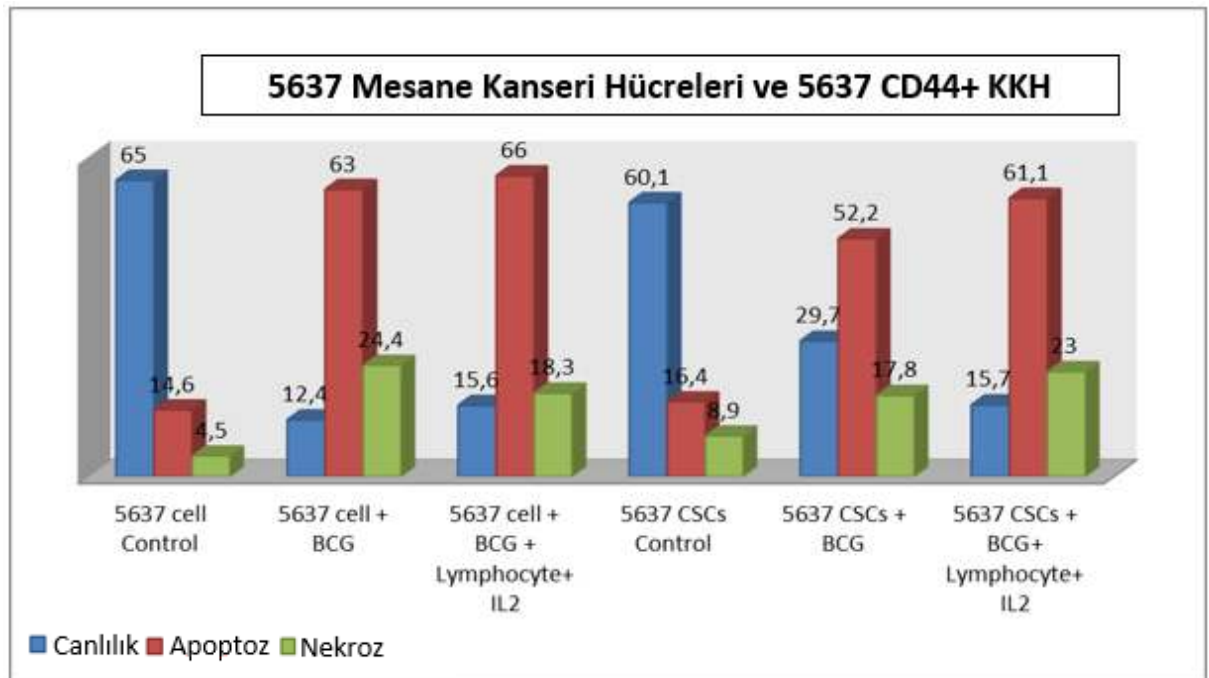
Şekil 6. JMSU-1 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranları

Yapılan analizler sonucu T-24 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranlarının kıyaslandığı grafik şekil 7 da yer almaktadır.



Şekil 7. T-24 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranları

Yapılan analizler sonucu 5637 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranlarının kıyaslandığı grafik şekil 8 da yer almaktadır.



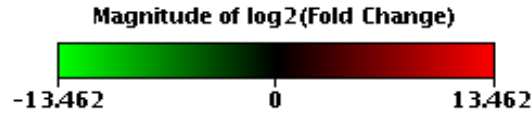
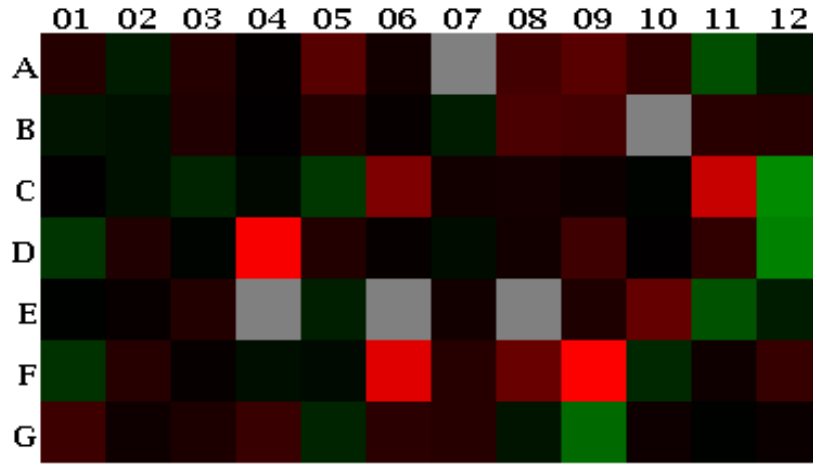
Şekil 8. 5637 total mesane kanseri hücreleri ile kendi CD44+ kök hücrelerindeki apoptoz oranları

4.2. Real Time- PCR Array Bulguları

4.2.1. JMSU-1 Hücreleri:

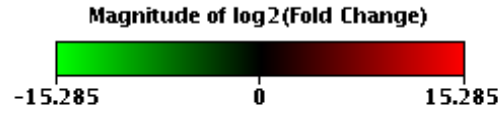
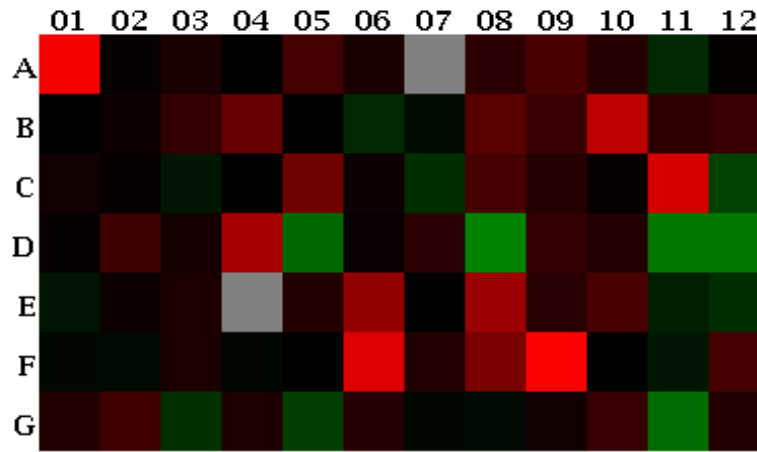
JMSU-1 hücrelerinin gen ekspresyonu BCG verilmiş olan JMSU-1 hücreleri ile kıyaslandığında BCG sonrasında CCL11, CCL13, CCL7, CCL8, CXCL5, CXCL11, IFN γ , IL24, IL9, LTA ve LTB ekspresyonlarının arttığı, CXCL9, CCL18, IL17, IL27, TNFSF11 ekspresyonlarının azaldığı görülmüştür. JMSU hücreleri ve JMSU BCG alan hücrelerin karşılaştırmalı heatmap sonucu şekil. 9'da görülmektedir. BCG+MNH+IL2 kombine uygulanması sonucunda ise ADIPOQ, CCL22, CD40L, CXCL10, CXCL5, IL22 ekspresyonlarının arttığı görülmüştür. IL10, IL12, IL16, IL17 ekspresyonlarında ise azalma görülmektedir (Şekil 10).





Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADIPOQ 3.78 B	BMP2 -2.88 OKAY	BMP4 3.76 OKAY	BMP6 1.16 OKAY	BMP7 23.98 B	C5 1.86 OKAY	CCL1 4.38 C	CCL11 10.84 B	CCL13 25.54 OKAY	CCL17 5.65 OKAY	CCL18 -17.46 B	CCL19 -1.99 B
B	CCL2 -2.11 OKAY	CCL20 -1.82 OKAY	CCL21 3.13 OKAY	CCL22 1.04 A	CCL24 3.61 B	CCL3 1.21 A	CCL5 -2.79 OKAY	CCL7 14.79 B	CCL8 12.47 B	CD40LG 4.38 C	CNTF 4.32 OKAY	CSF1 4.01 OKAY
C	CSF2 1.09 OKAY	CSF3 -1.77 OKAY	CX3CL1 -3.68 OKAY	CXCL1 -1.30 OKAY	CXCL10 -7.40 B	CXCL11 101.56 B	CXCL12 1.94 OKAY	CXCL13 2.13 B	CXCL16 1.54 OKAY	CXCL2 -1.18 OKAY	CXCL5 1495.05 B	CXCL9 -167.38 B
D	FASLG -6.66 OKAY	GPI 3.23 B	IFNA2 -1.15 OKAY	IFNG 9715.23 A	IL10 3.37 A	IL11 1.27 OKAY	IL12A -1.53 OKAY	IL12B 1.93 OKAY	IL13 9.96 OKAY	IL15 1.05 OKAY	IL16 6.00 OKAY	IL17A -120.69 A
E	IL17F -1.07 B	IL18 1.32 OKAY	IL1A 3.57 OKAY	IL1B 4.38 C	IL1RN -3.05 OKAY	IL2 4.38 C	IL21 1.92 OKAY	IL22 4.38 C	IL23A 2.94 OKAY	IL24 37.57 OKAY	IL27 -19.55 A	IL3 -2.77 A
F	IL4 -6.26 B	IL5 4.03 B	IL6 1.27 OKAY	IL7 -1.67 OKAY	IL8 -1.44 OKAY	IL9 3915.54 B	LIF 3.89 OKAY	LTA 44.79 A	LTB 11287.62 A	MIF -4.35 OKAY	MSTN 1.66 OKAY	NODAL 7.01 OKAY
G	OSM 8.88 OKAY	PPBP 1.71 OKAY	SPP1 2.70 A	TGFB2 7.84 OKAY	THPO -3.80 B	TNF 4.61 OKAY	TNFRSF11B 3.90 OKAY	TNFSF10 -2.13 OKAY	TNFSF11 -49.98 B	TNFSF13B 1.73 B	VEGFA -1.05 OKAY	XCL1 1.43 OKAY

Şekil 9. JMSU hücreleri ve JMSU BCG alan hücrelerin karşılaştırmalı heatmapleri



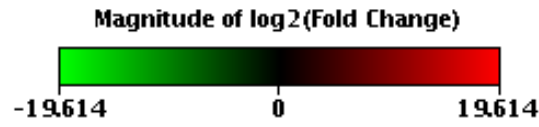
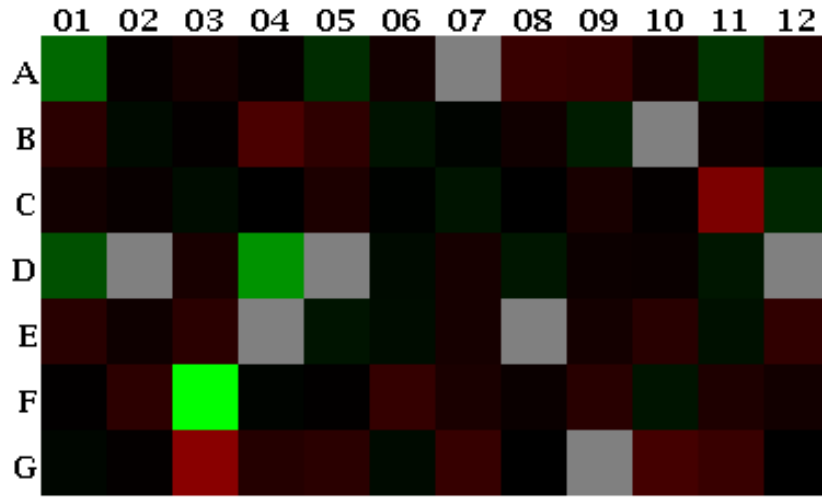
Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADIPOQ 30143.86 A	BMP2 1.29 OKAY	BMP4 3.00 OKAY	BMP6 -1.02 OKAY	BMP7 15.08 B	C5 3.00 OKAY	CCL1 14.93 C	CCL11 6.18 B	CCL13 21.67 OKAY	CCL17 4.83 A	CCL18 -5.13 B	CCL19 1.18 B
B	CCL2 -1.00 A	CCL20 1.84 OKAY	CCL21 7.90 OKAY	CCL22 66.52 OKAY	CCL24 -1.10 B	CCL3 -5.14 A	CCL5 -1.71 OKAY	CCL7 37.15 B	CCL8 10.08 B	CD40LG 2585.02 B	CNTF 6.92 A	CSF1 9.62 OKAY
C	CSF2 2.05 OKAY	CSF3 1.26 OKAY	CX3CL1 -2.59 OKAY	CXCL1 1.01 OKAY	CXCL10 106.40 A	CXCL11 1.68 B	CXCL12 -7.00 A	CXCL13 17.79 B	CXCL16 4.69 OKAY	CXCL2 1.24 OKAY	CXCL5 7913.33 B	CXCL9 -13.75 B
D	FASLG 1.34 OKAY	GPI 12.14 B	IFNA2 2.24 OKAY	IFNG 1033.97 B	IL10 -78.11 A	IL11 1.41 OKAY	IL12A 6.00 OKAY	IL12B -237.43 A	IL13 8.01 OKAY	IL15 3.86 OKAY	IL16 -150.75 A	IL17A -151.75 A
E	IL17F -2.56 B	IL18 1.62 OKAY	IL1A 3.08 OKAY	IL1B 14.93 C	IL1RN 4.15 OKAY	IL2 469.11 B	IL21 1.12 A	IL22 687.91 B	IL23A 5.49 OKAY	IL24 19.25 OKAY	IL27 -3.48 A	IL3 -6.50 A
F	IL4 -1.41 B	IL5 -1.58 B	IL6 3.19 OKAY	IL7 -1.24 OKAY	CXCL8 1.13 OKAY	IL9 9866.88 B	LIF 3.69 OKAY	LTA 149.87 A	LTB 39930.95 A	MIF -1.05 OKAY	MSTN -2.46 A	NODAL 15.29 OKAY
G	OSM 4.12 OKAY	PPBP 13.37 OKAY	SPP1 -7.57 A	TGFB2 3.58 OKAY	THPO -13.68 B	TNF 4.67 OKAY	TNFRSF11B -1.39 OKAY	TNFSF10 -1.46 OKAY	TNFSF11 1.91 B	TNFSF13B 9.69 B	VEGFA -89.80 A	XCL1 4.04 OKAY

Şekil 10. JMSU hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

4.2.2. 5637 Hücreleri:

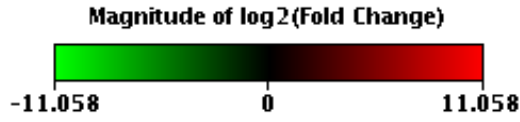
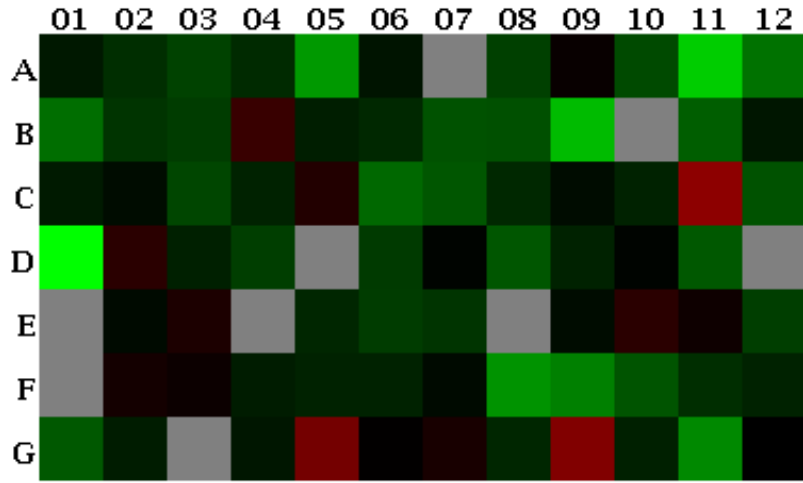
5637 hücrelerinin gen ekspresyonu BCG verilmiş olan 5637 hücreleri ile kıyaslandığında BCG sonrasında IL6, IFNG, FASLG, ADIPOQ ekspresyonlarının azalırken CCL22, CCL11, CXCL5, IL9, SPP1 ekspresyonlarının arttığı görülmüştür. Gen ekspresyonlarındaki artma ve azalmalara dair heatmap şekil 11. 'de gösterilmektedir. BCG+MNH+IL2 kombine uygulanması sonucunda ise Çoğu gen ekspresyonunda azalma dikkati çekerken, CXCL5, TNFSF11, THPO (trombopoetin) ekspresyonu artmıştır (Şekil 11).





Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADIPOQ -257.12 A	BMP2 1.44 OKAY	BMP4 2.88 OKAY	BMP6 1.32 OKAY	BMP7 -10.86 A	C5 2.62 OKAY	CCL1 -1.20 C	CCL11 19.90 B	CCL13 15.41 OKAY	CCL17 3.19 B	CCL18 -16.12 B	CCL19 5.72 A
B	CCL2 9.04 OKAY	CCL20 -1.67 OKAY	CCL21 1.19 OKAY	CCL22 51.87 A	CCL24 12.18 B	CCL3 -2.49 OKAY	CCL5 -1.21 OKAY	CCL7 2.33 B	CCL8 -4.40 B	CD40LG -1.20 C	CNTF 2.15 A	CSF1 -1.00 OKAY
C	CSF2 2.62 OKAY	CSF3 1.52 OKAY	CX3CL1 -1.82 OKAY	CXCL1 -1.04 OKAY	CXCL10 4.69 A	CXCL11 -1.13 OKAY	CXCL12 -2.94 OKAY	CXCL13 1.04 B	CXCL16 3.67 OKAY	CXCL2 1.28 OKAY	CXCL5 758.41 B	CXCL9 -7.59 B
D	FASLG -72.80 A	GPI -1.20 C	IFNA2 3.66 OKAY	IFNG -2646.38 A	IL10 -1.20 C	IL11 -1.70 OKAY	IL12A 3.26 OKAY	IL12B -3.38 OKAY	IL13 1.86 OKAY	IL15 1.67 OKAY	IL16 -3.14 OKAY	IL17A -1.20 C
E	IL17F 8.37 B	IL18 2.05 OKAY	IL1A 9.08 OKAY	IL1B -1.20 C	IL1RN -2.94 OKAY	IL2 -1.86 B	IL21 3.26 OKAY	IL22 -1.20 C	IL23A 2.90 OKAY	IL24 8.53 OKAY	IL27 -2.47 B	IL3 12.55 A
F	IL4 1.07 B	IL5 9.92 A	IL6 -802162.82 A	IL7 -1.19 OKAY	CXCL8 1.09 OKAY	IL9 15.72 A	LIF 3.85 OKAY	LTA 1.76 OKAY	LTB 8.20 A	MIF -3.01 OKAY	MSTN 4.89 OKAY	NODAL 2.67 OKAY
G	OSM -1.42 OKAY	PPBP 1.26 OKAY	SPP1 1577.23 A	TGFB2 6.62 OKAY	THPO 9.55 B	TNF -1.67 OKAY	TNFRSF11B 17.21 OKAY	TNFSF10 -1.03 OKAY	TNFSF11 -1.20 C	TNFSF13B 36.73 A	VEGFA 20.25 OKAY	XCL1 -1.00 OKAY

Şekil 11. 5637 hücrelerinin BCG uygulama sonrası kontrol ile karşılaştırmalı heatmap analiz sonucu.

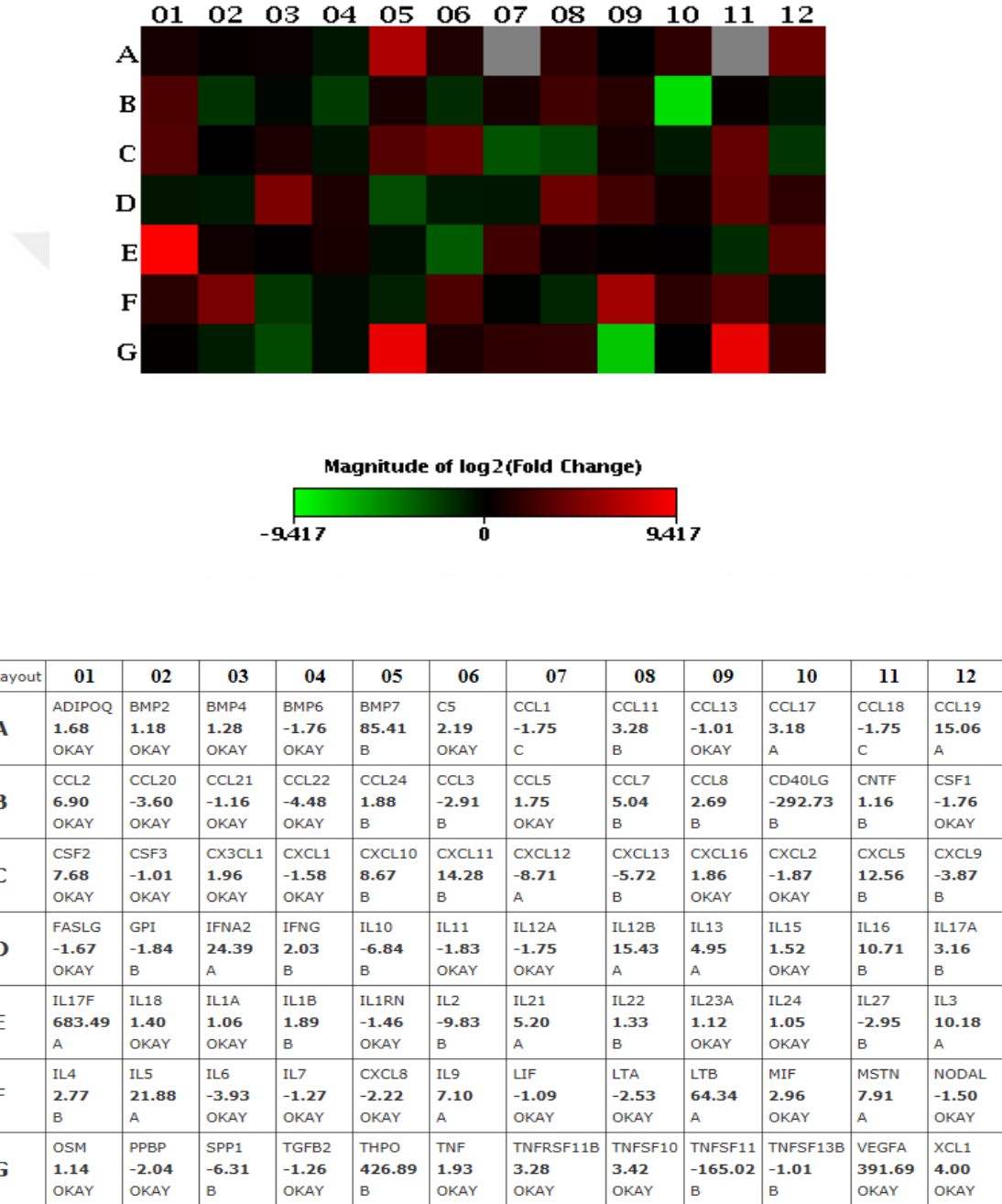


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADIPOQ -2.02 OKAY	BMP2 -3.97 OKAY	BMP4 -7.46 OKAY	BMP6 -3.47 OKAY	BMP7 -104.81 A	C5 -1.87 OKAY	CCL1 -3.97 C	CCL11 -7.01 B	CCL13 1.28 OKAY	CCL17 -9.51 B	CCL18 -493.17 B	CCL19 -30.68 B
B	CCL2 -26.49 A	CCL20 -4.66 OKAY	CCL21 -6.18 OKAY	CCL22 5.54 A	CCL24 -2.46 B	CCL3 -3.37 OKAY	CCL5 -11.99 OKAY	CCL7 -10.79 B	CCL8 -281.69 B	CD40LG -3.97 C	CNTF -16.81 B	CSF1 -1.89 OKAY
C	CSF2 -2.17 OKAY	CSF3 -1.41 OKAY	CX3CL1 -8.01 OKAY	CXCL1 -2.70 OKAY	CXCL10 2.79 A	CXCL11 -23.23 OKAY	CXCL12 -13.34 OKAY	CXCL13 -3.41 B	CXCL16 -1.46 OKAY	CXCL2 -2.76 OKAY	CXCL5 71.62 B	CXCL9 -11.87 B
D	FASLG -2132.14 A	GPI 3.46 B	IFNA2 -2.69 OKAY	IFNG -6.38 OKAY	IL10 -3.97 C	IL11 -5.55 OKAY	IL12A -1.12 OKAY	IL12B -13.17 OKAY	IL13 -2.80 OKAY	IL15 -1.14 OKAY	IL16 -13.80 OKAY	IL17A -3.97 C
E	IL17F -3.97 C	IL18 -1.34 OKAY	IL1A 2.26 OKAY	IL1B -3.97 C	IL1RN -3.18 OKAY	IL2 -6.13 B	IL21 -4.83 OKAY	IL22 -3.97 C	IL23A -1.44 OKAY	IL24 3.50 OKAY	IL27 1.48 B	IL3 -6.26 B
F	IL4 -3.97 C	IL5 1.82 A	IL6 1.46 OKAY	IL7 -2.30 OKAY	CXCL8 -2.74 OKAY	IL9 -2.85 B	LIF -1.34 OKAY	LTA -85.26 A	LTB -45.64 B	MIF -12.23 OKAY	MSTN -3.98 OKAY	NODAL -2.85 OKAY
G	OSM -14.48 OKAY	PPBP -2.27 OKAY	SPP1 -3.97 C	TGFB2 -1.92 OKAY	THPO 32.60 A	TNF 1.05 OKAY	TNFRSF11B 2.02 OKAY	TNFSF10 -3.21 OKAY	TNFSF11 49.31 B	TNFSF13B -2.55 B	VEGFA -63.72 OKAY	XCL1 -1.03 OKAY

Şekil 12. 5637 hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

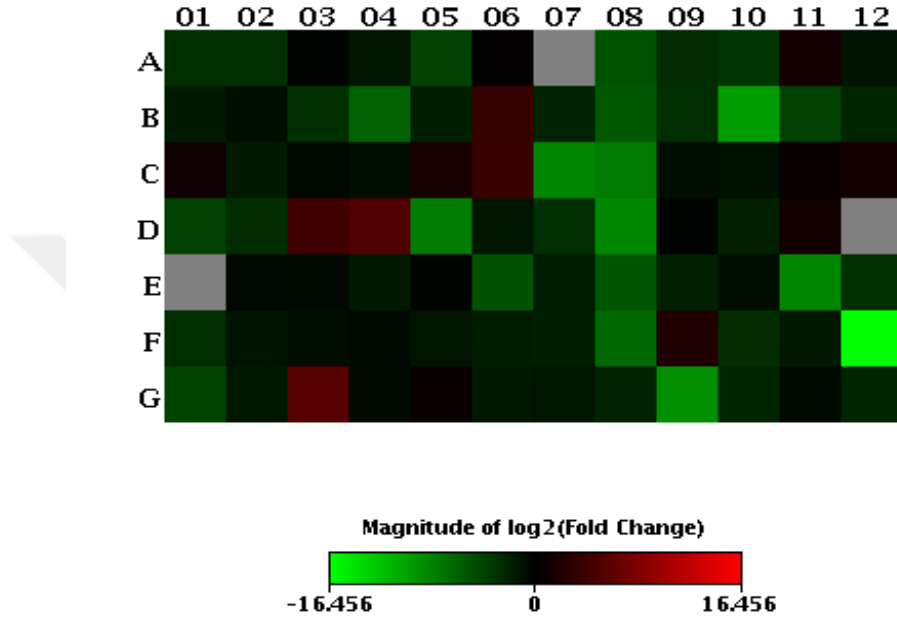
4.2.3. T24 Hücreleri:

T24 kontrol grubu hücrelerinin gen ekspresyonu BCG verilmiş olan T24 hücreleri ile kıyaslandığında BCG sonrasında, CCL17, CCL19, CSF2, CXCL10, CXCL5, IFN- α 2, IFN-G, IL13, LTB, THPO ve VEGFA ekspresyonları azalırken CD40LG, CXCL12, IL10 ve TNSF11 ekspresyonları artmıştır (Şeki 13).



Şekil 13. T24 hücrelerinde BCG uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

BCG+MNH+IL2 kombine uygulanması sonucunda ise CCL3, CXCL10, CXCL11, CXCL5, IFN α 2, LTB, SPP1 ekspresyonları artarken, CCL11, CCL22, CCL7, CD40LG, CXCL12, CXCL16, IL10, IL12B, IL16, IL27, LTA ve TNFSF11 ekspresyonları azalmıştır. (Şekil14).

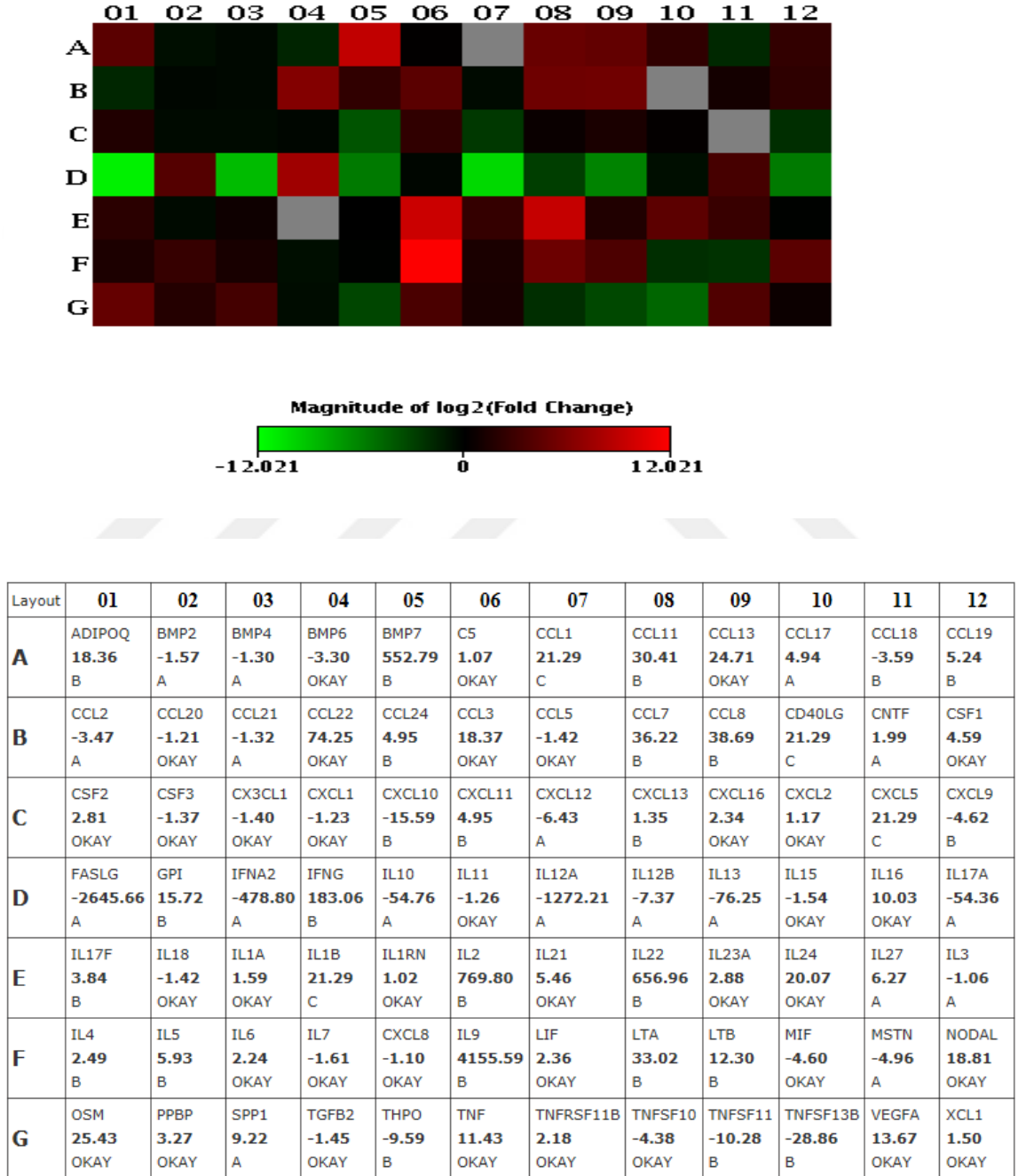


Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADIPOQ -7.62 OKAY	BMP2 -8.33 OKAY	BMP4 -1.16 OKAY	BMP6 -2.49 OKAY	BMP7 -17.48 B	C5 1.08 OKAY	CCL1 -6.75 C	CCL11 -41.35 B	CCL13 -6.73 OKAY	CCL17 -9.91 B	CCL18 2.40 B	CCL19 -2.17 B
B	CCL2 -3.16 OKAY	CCL20 -1.80 OKAY	CCL21 -8.56 OKAY	CCL22 -83.54 A	CCL24 -3.73 B	CCL3 11.34 A	CCL5 -4.42 OKAY	CCL7 -51.51 B	CCL8 -8.19 B	CD40LG -1126.98 B	CNTF -17.40 OKAY	CSF1 -4.79 OKAY
C	CSF2 1.85 OKAY	CSF3 -3.13 OKAY	CX3CL1 -1.47 OKAY	CXCL1 -1.87 OKAY	CXCL10 2.76 B	CXCL11 12.08 B	CXCL12 -384.00 A	CXCL13 -237.98 B	CXCL16 -1.86 OKAY	CXCL2 -2.06 OKAY	CXCL5 1.58 B	CXCL9 2.38 B
D	FASLG -17.87 OKAY	GPI -7.09 B	IFNA2 15.51 A	IFNG 36.36 A	IL10 -256.74 B	IL11 -2.75 OKAY	IL12A -7.74 OKAY	IL12B -470.69 B	IL13 -1.06 A	IL15 -4.18 OKAY	IL16 2.05 B	IL17A -6.75 C
E	IL17F -6.75 C	IL18 -1.35 OKAY	IL1A -1.39 OKAY	IL1B -3.16 B	IL1RN -1.11 OKAY	IL2 -37.85 B	IL21 -3.60 A	IL22 -45.83 B	IL23A -4.12 OKAY	IL24 -1.64 OKAY	IL27 -402.97 B	IL3 -8.28 B
F	IL4 -7.71 B	IL5 -2.14 B	IL6 -1.82 OKAY	IL7 -1.48 OKAY	CXCL8 -2.39 OKAY	IL9 -3.60 A	LIF -3.76 OKAY	LTA -101.37 A	LTB 4.11 A	MIF -7.00 OKAY	MSTN -3.00 A	NODAL -89927.24 A
G	OSM -20.46 OKAY	PPBP -2.87 OKAY	SPP1 42.10 B	TGFB2 -1.61 OKAY	THPO 1.60 B	TNF -3.06 OKAY	TNFRSF11B -2.39 OKAY	TNFSF10 -4.65 OKAY	TNFSF11 -635.29 B	TNFSF13B -4.84 B	VEGFA -1.38 OKAY	XCL1 -5.21 OKAY

Şekil 14. T24 hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

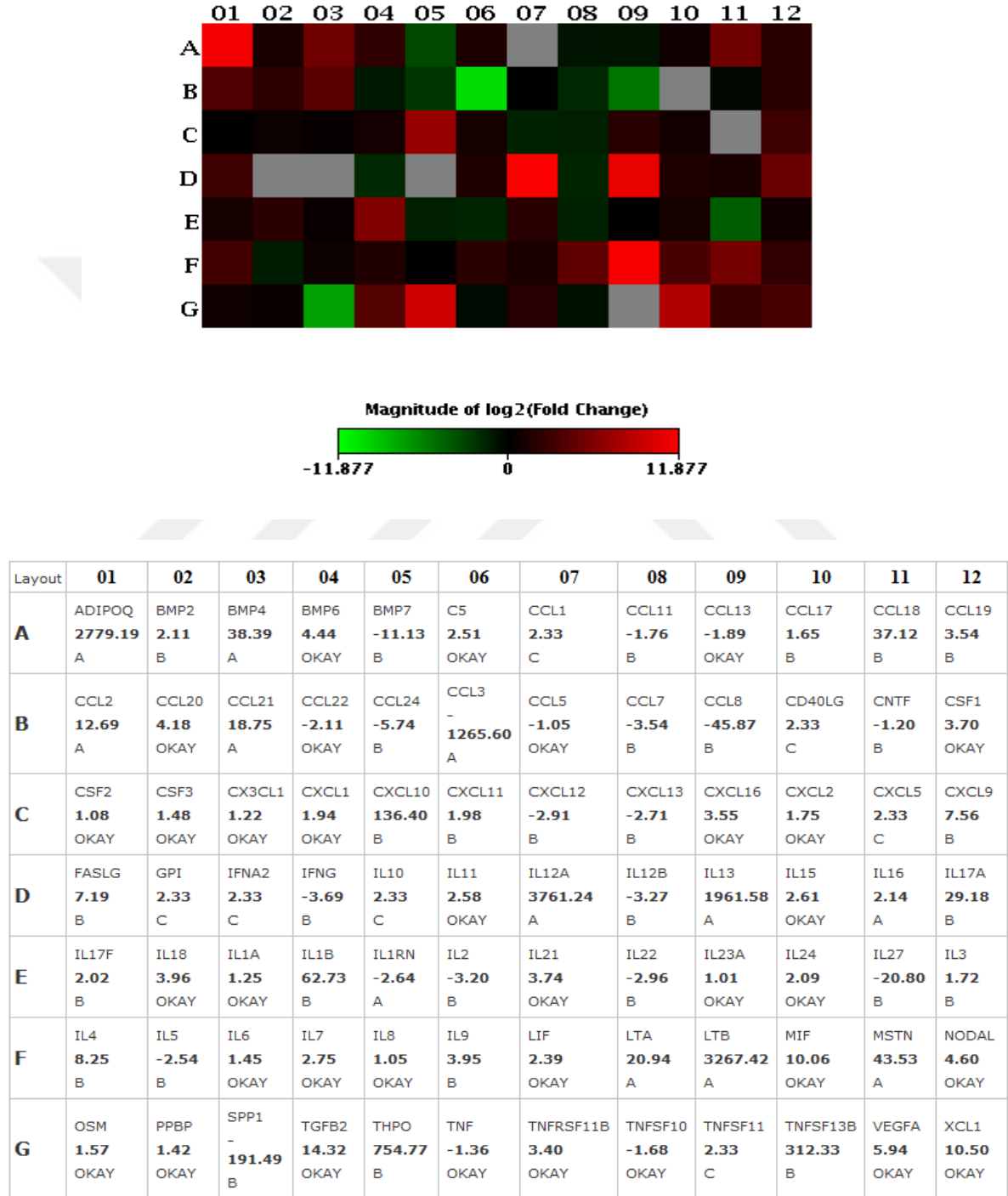
4.2.4. JMSU-1 kök hücreleri:

BMP7, CCL11, CCL22, CCL7, CCL8, IFNG, IL2, IL22, IL9 ve LTA gen ekspresyonları JMSU-1 kök hücrelerinde total JMSU-1 hücrelerine kıyasla daha fazla iken, CXCL10, FASLG, IFN α 2, IL12A, IL10 ve IL13 gen ekspresyonları ise daha azdır (Şekil 15).



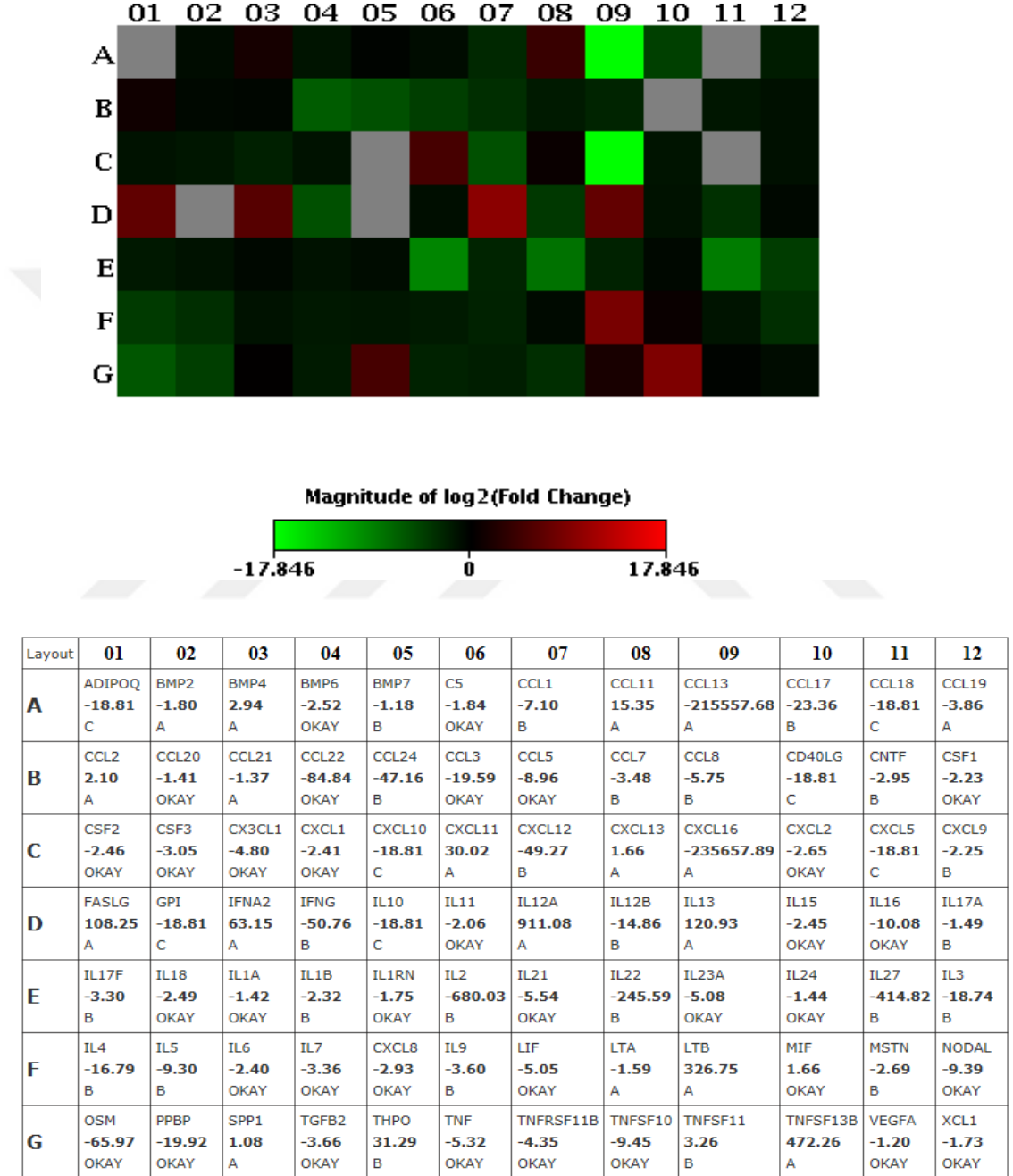
Şekil 15. JMSU hücre hattı kök hücrelerinin kontrol hücreler ile immun ilişkili gen ekspresyonlarının kat değişimlerini gösteren heatmap.

JMSU-1 kök hücrelerine BCG uygulanmasının ADIPOQ, BMP4, CCL18, CXCL10, IL12A, IL13, LTB, MSTN, THPO ve TNFSF13B gen ekspresyonlarını arttırdığı, CCL3, CCL8 ve SPP1 gen ekspresyonlarını azalttığı görülmüştür (Şekil 16).



Şekil 16. JMSU kök hücreleri ve JMSU kök hücre BCG alan hücrelerin karşılaştırmalı heatmapleri

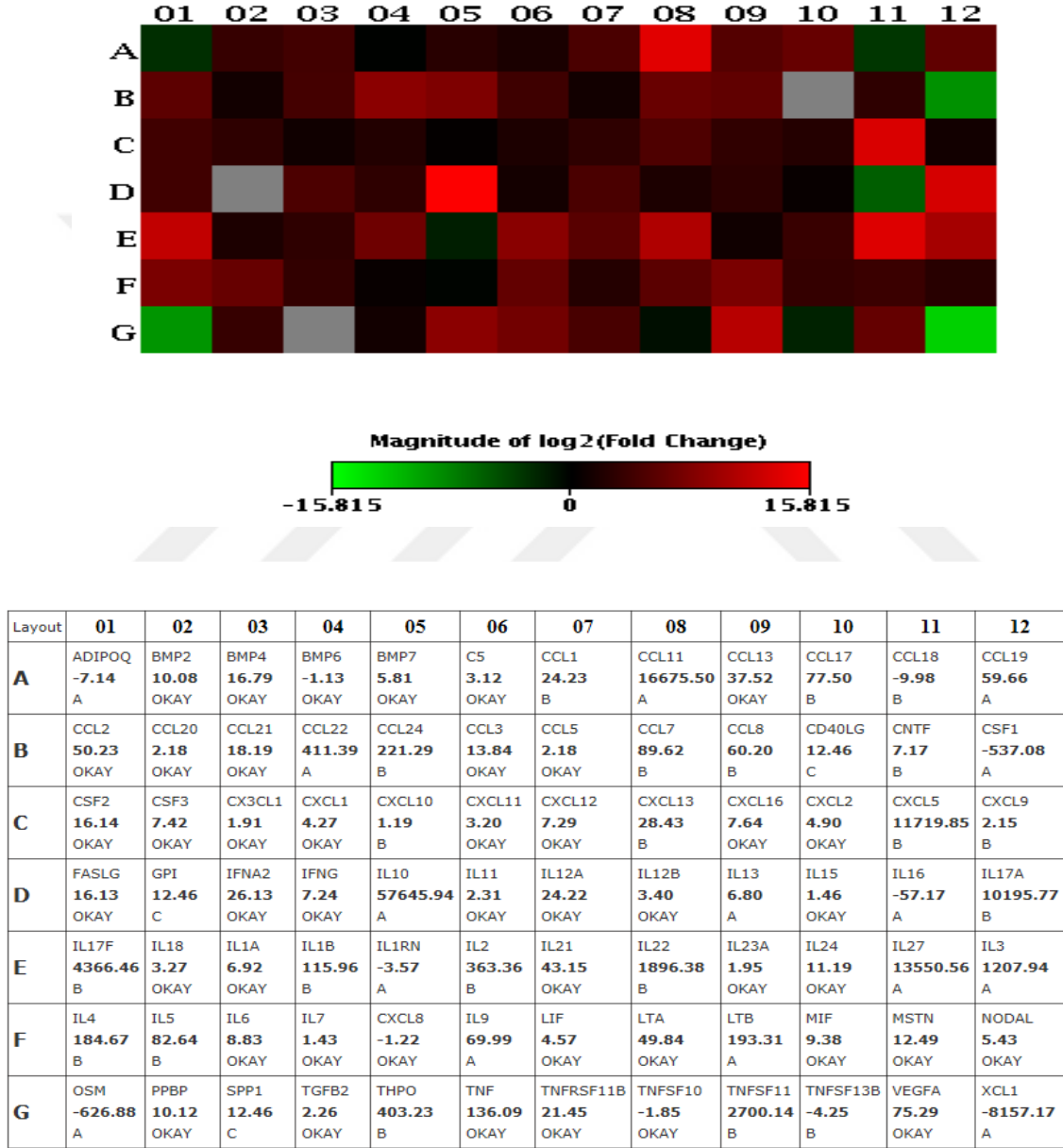
JMSU-1 kök hücrelerinin BCG+MNH+IL2 kombine uygulanmasının ardından ise ADIPOQ, CCL22, CD40LG, CXCL10, CXCL5, IFNG, IL2, IL22, IL9, LTA ve LTB gibi çoğu gen ekspresyonlarını azalttığı, IL13, IL12A, CCL11 ekspresyonlarını ise arttırdığı görülmüştür (Şekil 17).



Şekil 17. JMSU kanser kök hücrelerinde BCG, IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

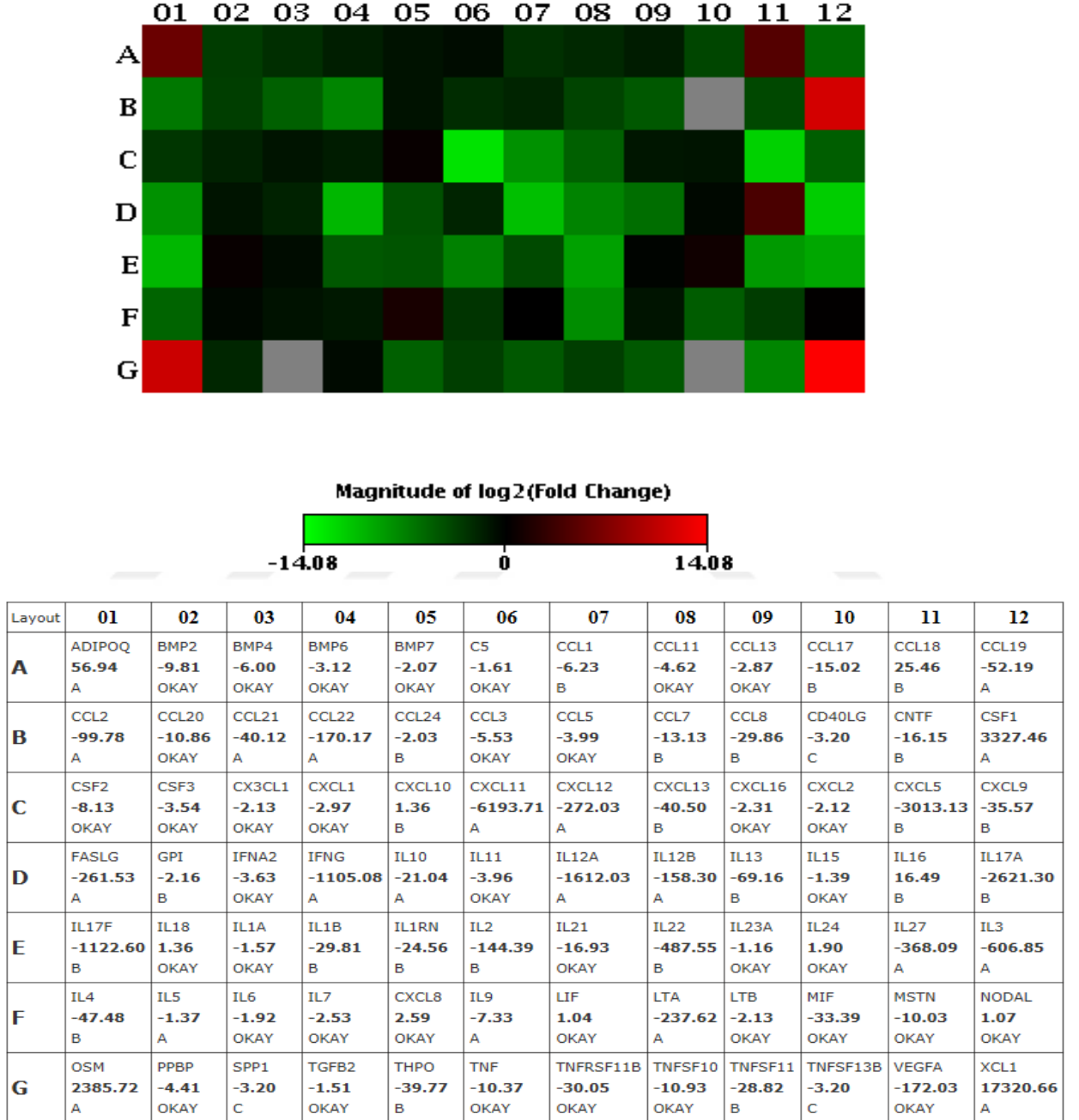
4.2.5. 5637 kök hücreleri

CCL11, CCL22, CCL24, CXCL5, IL10, IL17A, IL17F, IL22, IL27, IL3, TNFSF11 ve THPO 5637 kök hücrelerinde total 5637 hücrelerine kıyasla daha fazla eksprese edilirken CSF1, IL16, OSM ve XCL1 gen ekspresyonları ise daha az görülmüştür. Şekil18 'de heatmap sonuçları yer almaktadır. Ayrıca 5637 kök hücreleri CCL11 genini eksprese ederken 5637 total hücrelerinde bu ekspresyon yoktur.



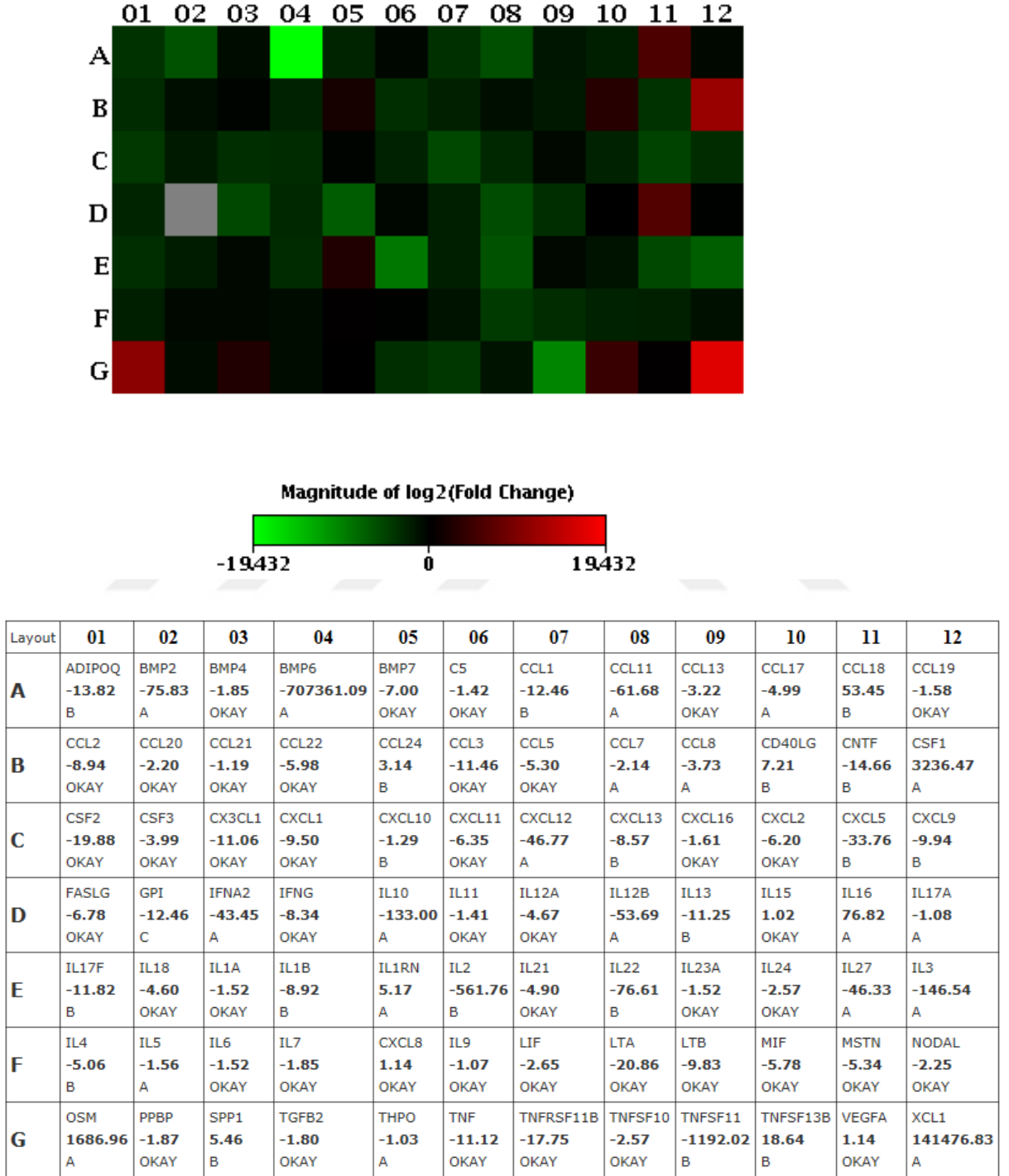
Şekil 18. 5637 hücre hattı kök hücrelerinin kontrol hücreler ile immun ilişkili gen ekspresyonlarının kat değişimlerini gösteren heatmap.

5637 kök hücrelerine BCG uygulanmasının bir çok gen ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Bu genler; ADIPOQ, CSF1, OSM, XCL1, TNFSF13B, VEGFA, IL22, IL27, IL3, IL4, LTA, MIF, IL13, IL12B, IL17A, IL17F, IL1B, IL1RN ve IL2' dir. Bunun aksine CCL19, CCL2, CCL21, CCL8, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL5, CXCL9, INFG, FASLG ve IL10 ekspresyonlarında ise artış görülmüştür (Şekil 19).



Şekil 19. 5637 kanser kök hücrelerine BCG uygulandığında immün ilişkili gen ekspresyonunun heatmap analiz sonuçları.

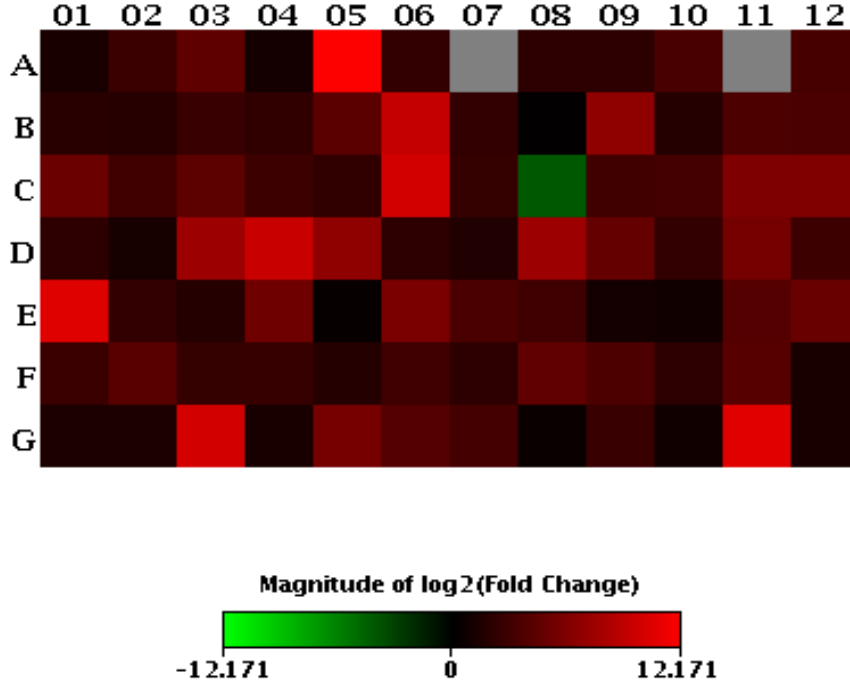
5637 kök hücrelerinin BCG+MNH+IL2 kombine uygulanmasının ardından ise çoğu gen ekspresyonunun değişmediği görülmüştür. BMP6, IL2, TNFSF11 gen ekspresyonlarında azalma dikkati çekerken, OSM, CSF1, XCL1 ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Şekil 20).



Şekil 20. 5637 kanser kök hücrelerinde BCG İL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

4.2.6. T24 kök hücreleri

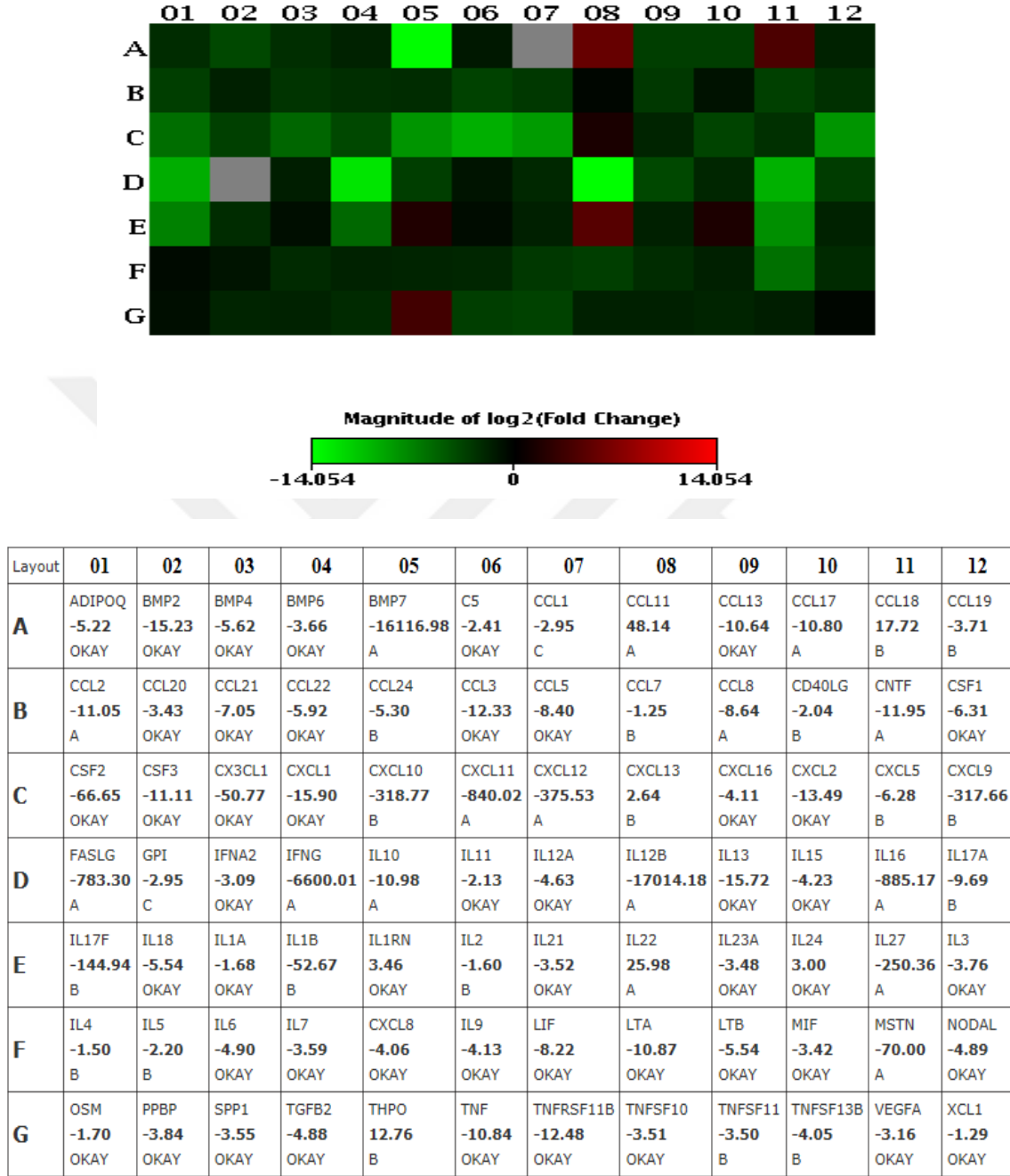
Çoğu sitokin ve kemokin ekspresyonları T24 kök hücrelerinde T24 total hücrelere kıyasla daha fazla saptanmıştır. Bu genler; BMP4, BMP7, CCL17, CCL24, CCL3, CCL8, CNTF, CSF2, CXCL10, CXCL11, CXCL5, IFN α 2, IFNG, IL17A, IL17B, IL12B, IL1B, IL2, IL21, IL3, LTB, PPBS, THPO, VEGFA ve SPB1 'dir. Sadece B2M gen ekspresyonu kök hücrelerinde daha azdır (Şekil 21).



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADIPOQ 2.17 OKAY	BMP2 6.86 OKAY	BMP4 22.17 OKAY	BMP6 1.92 OKAY	BMP7 4612.23 A	C5 5.16 OKAY	CCL1 2.18 C	CCL11 4.22 B	CCL13 4.17 OKAY	CCL17 10.57 A	CCL18 2.18 C	CCL19 9.92 B
B	CCL2 3.75 OKAY	CCL20 3.47 OKAY	CCL21 6.40 OKAY	CCL22 4.99 OKAY	CCL24 19.19 B	CCL3 703.34 A	CCL5 5.15 OKAY	CCL7 1.07 B	CCL8 115.99 A	CD40LG 3.22 B	CNTF 12.69 A	CSF1 11.23 OKAY
C	CSF2 33.65 OKAY	CSF3 8.29 OKAY	CX3CL1 20.84 OKAY	CXCL1 7.39 OKAY	CXCL10 4.86 B	CXCL11 1114.98 A	CXCL12 5.52 OKAY	CXCL13 -18.24 B	CXCL16 8.53 OKAY	CXCL2 9.33 OKAY	CXCL5 62.70 B	CXCL9 67.05 B
D	FASLG 4.27 OKAY	GPI 2.08 B	IFNA2 182.42 A	IFNG 773.22 A	IL10 120.14 A	IL11 4.29 OKAY	IL12A 2.82 OKAY	IL12B 180.84 A	IL13 27.22 A	IL15 5.39 OKAY	IL16 47.36 A	IL17A 7.18 B
E	IL17F 1683.11 B	IL18 5.06 OKAY	IL1A 3.36 OKAY	IL1B 39.03 B	IL1RN 1.26 OKAY	IL2 56.52 B	IL21 11.60 A	IL22 7.75 B	IL23A 2.00 OKAY	IL24 1.72 OKAY	IL27 15.79 A	IL3 31.04 A
F	IL4 6.78 B	IL5 17.85 B	IL6 5.71 OKAY	IL7 5.78 OKAY	CXCL8 3.18 OKAY	IL9 7.86 A	LIF 4.24 OKAY	LTA 23.88 OKAY	LTB 12.64 A	MIF 4.39 OKAY	MSTN 17.07 A	NODAL 2.17 OKAY
G	OSM 2.50 OKAY	PPBP 2.52 OKAY	SPP1 1092.09 A	TGFB2 2.16 OKAY	THPO 45.05 B	TNF 15.70 OKAY	TNFRSF11B 9.39 OKAY	TNFSF10 1.36 OKAY	TNFSF11 6.27 B	TNFSF13B 1.65 B	VEGFA 1779.32 OKAY	XCL1 2.17 OKAY

Şekil 21. T24 hücre hattı kök hücrelerinin kontrol hücreler ile immün ilişkili gen ekspresyonlarının kat değişimlerini gösteren heatmap.

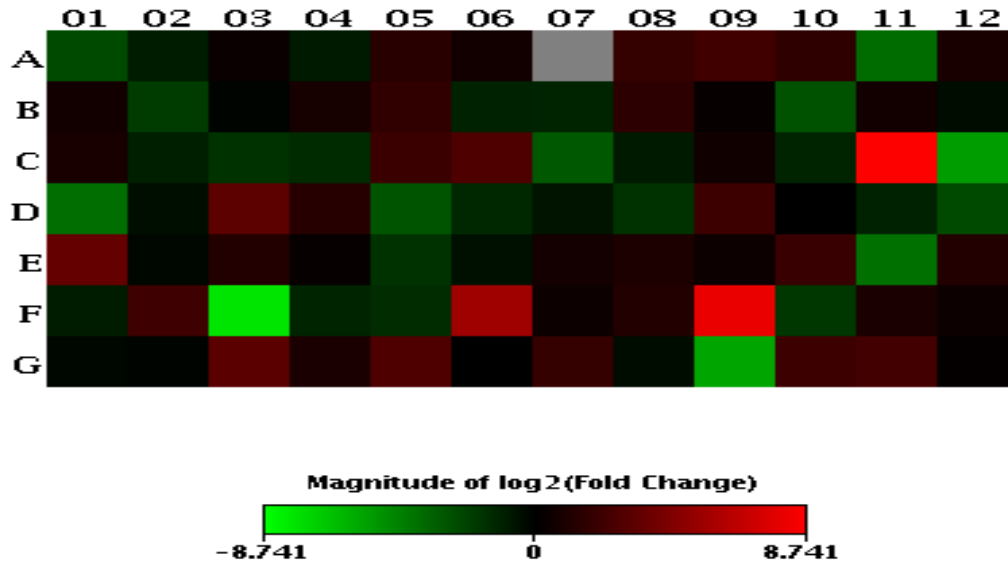
Kombine tedavi uygulanmasının ardından T24 kök hücrelerinde IL12B, IL16, IL13, IL15, IL23A, CXCL1, CSF2 başta olmak üzere bir çok gen ekspresyonları da azalmıştır (Şekil 22).



Şekil 22. T24 kanser kök hücrelerinde BCG IL-2 ve MNHlerle birlikte uygulandığında kontrol hücrelere göre gen ekspresyon değişimlerini gösteren heatmap.

4.2.7. Üç mesane kanseri hücre hattında ortak artan ve azalan gen ekspresyon sonuçları:

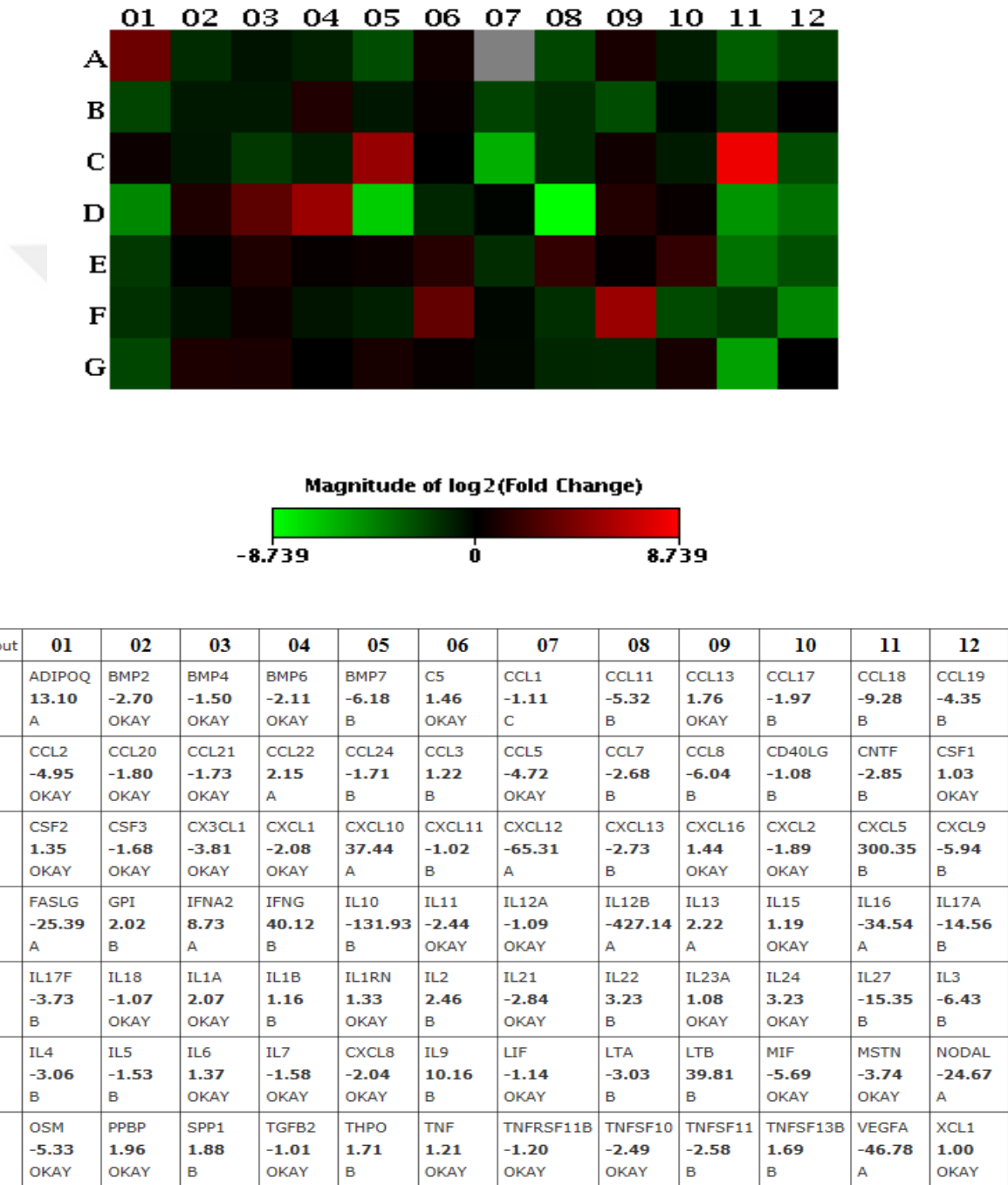
Her üç mesane kanseri hücre hattının kök hücreleri, total hücreleri ile kıyaslandığında CXCL5, CCL8, CNTF, CSF2 genleri aşırı eksprese etmektedir. Total kanser hücrelerinde ise IL6, TNFSF11, FASLG, CXCL9 aşırı ekspresyonları tespit edilmiştir. Her üç hücre hattında da BCG uygulaması CXCL5 ve LTB ekspresyonunu arttırdığı; CCL20 ve IL6 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (Şekil 23).



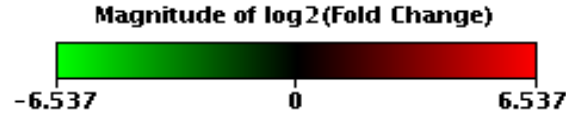
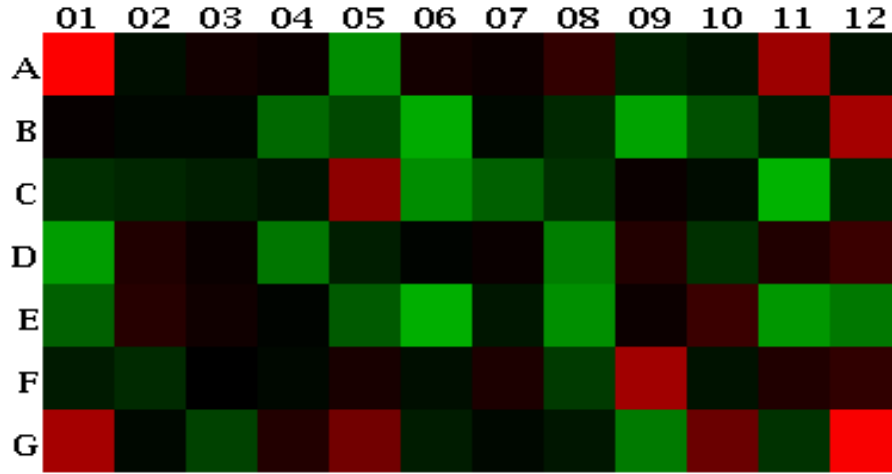
Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADIPOQ -5.80 B	BMP2 -1.92 OKAY	BMP4 1.28 OKAY	BMP6 -1.88 OKAY	BMP7 2.60 B	C5 1.51 OKAY	CCL1 -1.26 C	CCL11 3.42 B	CCL13 4.54 OKAY	CCL17 2.99 A	CCL18 -12.74 B	CCL19 1.75 A
B	CCL2 1.55 OKAY	CCL20 -4.25 OKAY	CCL21 -1.10 OKAY	CCL22 1.70 A	CCL24 3.12 B	CCL3 -2.28 B	CCL5 -2.31 OKAY	CCL7 2.91 B	CCL8 1.13 B	CD40LG -6.87 B	CNTF 1.53 A	CSF1 -1.33 OKAY
C	CSF2 1.78 OKAY	CSF3 -2.06 OKAY	CX3CL1 -3.24 OKAY	CXCL1 -2.77 OKAY	CXCL10 4.00 B	CXCL11 6.33 B	CXCL12 -8.28 OKAY	CXCL13 -1.85 B	CXCL16 1.48 OKAY	CXCL2 -2.40 OKAY	CXCL5 427.86 OKAY	CXCL9 -43.65 B
D	FASLG -13.69 A	GPI -1.40 B	IFNA2 8.99 A	IFNG 2.46 B	IL10 -7.29 B	IL11 -2.63 OKAY	IL12A -1.60 OKAY	IL12B -3.21 OKAY	IL13 4.08 A	IL15 -1.00 OKAY	IL16 -2.22 OKAY	IL17A -5.77 B
E	IL17F 10.87 B	IL18 -1.17 OKAY	IL1A 2.23 OKAY	IL1B 1.18 B	IL1RN -3.30 OKAY	IL2 -1.46 B	IL21 1.59 OKAY	IL22 1.99 B	IL23A 1.33 OKAY	IL24 3.69 OKAY	IL27 -14.42 B	IL3 2.19 A
F	IL4 -1.98 B	IL5 4.33 A	IL6 -239.03 OKAY	IL7 -2.35 OKAY	CXCL8 -2.88 OKAY	IL9 44.25 A	LIF 1.32 OKAY	LTA 2.27 A	LTB 266.59 A	MIF -3.68 OKAY	MSTN 1.87 OKAY	NODAL 1.36 OKAY
G	OSM -1.18 OKAY	PPBP -1.12 OKAY	SPP1 8.34 B	TGFB2 1.85 OKAY	THPO 6.35 B	TNF 1.02 OKAY	TNFRSF11B 3.37 OKAY	TNFSF10 -1.36 OKAY	TNFSF11 -51.85 B	TNFSF13B 4.12 B	VEGFA 4.73 OKAY	XCL1 1.11 OKAY

Şekil 23. Her üç hücre hattında ekspresyon ortalamalarının kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinde karşılaştırılması.

BCG+MNH+IL-2 kombinasyonunun ise CXCL10, CXCL5, IFNG gen ekspresyonlarını arttırdığı CXCL12, IL-6, TNSF11 azalttığı görülmüştür. BCG uygulaması mesane kanseri kök hücrelerinin üç tipinde de ADIPOQ, CXCL10, XCL1 genlerinde artışa CCL8 ekspresyonunda ise azalmaya neden olmuştur (Şekil 24, 25).



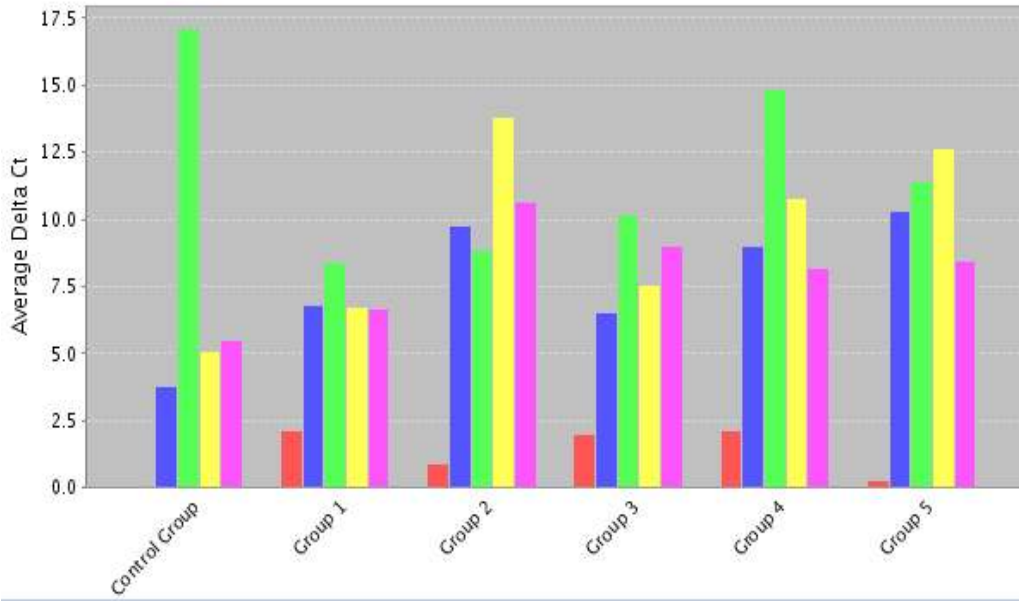
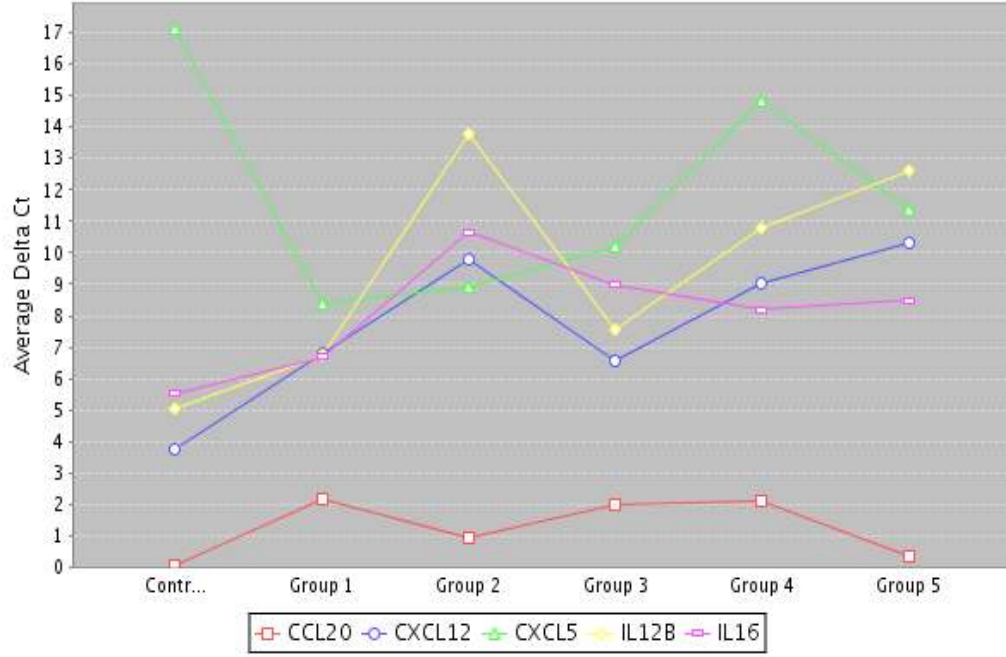
Şekil 24. BCG, IL-2, MNH uygulanan her üç hücre hattında ekspresyon ortalamalarının kontrol hücreler ile karşılaştırılması



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ADIPOQ 92.86 A	BMP2 -1.26 OKAY	BMP4 1.40 OKAY	BMP6 1.21 OKAY	BMP7 -12.60 B	C5 1.45 OKAY	CCL1 1.22 B	CCL11 2.46 B	CCL13 -1.75 OKAY	CCL17 -1.43 B	CCL18 16.60 B	CCL19 -1.38 B
B	CCL2 1.12 OKAY	CCL20 -1.10 OKAY	CCL21 -1.13 OKAY	CCL22 -6.41 A	CCL24 -3.63 B	CCL3 -20.90 A	CCL5 -1.14 OKAY	CCL7 -2.00 B	CCL8 -18.24 B	CD40LG -4.12 B	CNTF -1.55 B	CSF1 18.85 A
C	CSF2 -2.23 OKAY	CSF3 -1.97 OKAY	CX3CL1 -1.73 OKAY	CXCL1 -1.40 OKAY	CXCL10 12.53 B	CXCL11 -12.63 B	CXCL12 -5.44 A	CXCL13 -2.31 B	CXCL16 1.21 OKAY	CXCL2 -1.24 OKAY	CXCL5 -24.39 B	CXCL9 -1.75 B
D	FASLG -16.75 B	GPI 1.74 B	IFNA2 1.20 B	IFNG -8.17 B	IL10 -1.71 B	IL11 -1.08 OKAY	IL12A 1.21 B	IL12B -9.48 B	IL13 1.83 B	IL15 -2.36 OKAY	IL16 1.76 B	IL17A 2.80 B
E	IL17F -5.46 B	IL18 2.00 OKAY	IL1A 1.32 OKAY	IL1B -1.07 B	IL1RN -4.97 A	IL2 -22.47 B	IL21 -1.48 OKAY	IL22 -13.02 B	IL23A 1.23 OKAY	IL24 2.79 OKAY	IL27 -14.71 A	IL3 -8.44 A
F	IL4 -1.62 B	IL5 -2.14 B	IL6 1.01 OKAY	IL7 -1.15 OKAY	CXCL8 1.54 OKAY	IL9 -1.29 B	LIF 1.65 OKAY	LTA -2.84 OKAY	LTB 18.03 A	MIF -1.40 OKAY	MSTN 1.75 OKAY	NODAL 2.37 OKAY
G	OSM 19.44 A	PPBP -1.14 OKAY	SPP1 -3.24 B	TGFB2 1.84 OKAY	THPO 7.68 B	TNF -1.63 OKAY	TNFRSF11B -1.16 OKAY	TNFSF10 -1.47 OKAY	TNFSF11 -8.83 B	TNFSF13B 6.50 B	VEGFA -2.42 OKAY	XCL1 83.93 A

Şekil 25. BCG uygulanan her üç hücre hattı kanser kök hücrelerinde ekspresyon ortalamalarının kontrol hücreler ile karşılaştırılması

Gruplar arasında her üç hücre hattı avaraj kat değişimi gösteren kemokinlerin grafik gösterimi, şekil 26 'da gösterilmektedir.



Şekil 26. Gruplar arasında her üç hücre hattı avaraj kat değişimi gösteren kemokinlerin grafik gösterimi. Kontrol Grup: Kontrol hücreler, Grup 1.: BCG uygulanan hücreler, Grup 2: BCG+ IL2+ mononükleer hücre uygulanan hücreler, Grup 3: Kanser kök hücreler, Grup 4: BCG uygulanan kanser kök hücreler, Grup 5: BCG+ IL2+ mononükleer hücre uygulanan kanser kök hücreler

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada mesane kanseri kök hücrelerini CD44+ fenotipi ile tanımlayarak değerlendirdik. Farklı karakteristikteki üç mesane kanseri hücre hattında CD44+ mesane kanseri kök hücre popülasyonunun çok küçük bir kısmı oluşturduğunu gözlemledik. Araştırmayı oluşturan asıl soru mesane kanserinde uygulanan BCG immünterapisinin mesane kanseri kök hücrelerine etkili olup olmadığını araştırmaktır. Benzer bir şekilde literatürde de sıklıkla ortaya çıkan rekürrenslerin altında yatan immünolojik mekanizmaları değerlendirmek üzere spesifik hedef molekülleri içeren araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla mesane kanseri kök hücrelerini CD44 pozitifliğini hedefleyerek manyetik boncuk ile izolasyon yaparak elde ettik. Hücre izolasyonunda sıklıkla tercih edilen yöntemler manyetik, manyetik olmayan boncukların hedef hücre antikoru ile kaplanması ve akım sitometri temelli ayırmama olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada manyetik izolasyon tercih edilmiştir çünkü ticari olarak hazır olan manyetik işaretli CD44 antikoru kullanılarak ucuz, hızlı, kolay uygulanır şekilde yüksek spesifiklikte izolasyon imkanı bulunmaktadır. Elde edilen hücreler steril koşullarda kültüre devam edileceği için akım sitometri temellerle izolasyon mümkün olmamaktadır.

Literatürde yer alan diğer çalışmalar değerlendirildiğinde bu çalışmaya benzer mesane kanserinde immünolojik mekanizmaları inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Lee ve arkadaşlarının çalışmasında 103 NMIBC, 62 MIBC, 58 normal morfolojili çevre doku ve 10 sağlıklı normal donör dokularda cDNA mikroarray ile inflamatuvar sitokin profilini değerlendirmiştir. Bu çalışmaya göre IL-5, IL-20 ve IL-28A mesane kanseri gelişiminde spesifik olduğunu ortaya koymuşlardır (19). Jinesh GG. ve arkadaşlarının çalışmasında ise FasL ve TRAIL ölüm ligandlarını antikorları ile farede nötralize ettikten sonra nötrofilleri BCG ile indüklemiş ve anti kanser mekanizma olarak TNF- α salınımını sağlamışlardır (20). Andrew SA ve ekibinin yapmış olduğu çok merkezli çalışmada meme kanserinin erkeklerde kadınlara göre 3-4 kat daha fazla görüldüğü saptanmış, bu durumda hormon düzeyleri ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu farklılıklar göz önüne alındığında T hücre aktivasyonu ilişkili GATA3, CD81 gen ekspresyonlarının da farklı olduğu saptanmıştır (21). Chen M ve arkadaşları 803 kontrol ve 803 NIMBC olguyu kapsayan çalışmalarında SNP değerlendirmelerine göre Sonic Hedgehog yolağında kliniğe yansıyan genetik varyasyonlar olduğunu saptamıştır. SNP lerin *wild-type* genotipe sahip olan olgulara göre daha uzun

rekürensiz sağkalıma sahip olduğu görülmüştür (22). Literatürde birçok mesane kanseri kök hücre belirteci tanımlanmış olmasına karşın Chan KS ve arkadaşları CD44+, CK5+ CK20- gibi mesane kanseri kök hücre fenotiplerinin 2009 yılından beri primer olgularda veya hasta türevli ksenograftlarda mesane kanseri kök hücresi olarak birçok çalışmada tanımlandığını ifade etmişlerdir (23). Çalışmamızın temelini oluşturan mesane kanseri kök hücresini değerlendirirken seçmiş olduğumuz CD44 pozitifliği fenotipi Chen ve ekibinin yapmış olduğu bu değerlendirme ile uyum göstermekte dolayısıyla doğru hücre popülasyonunu hedeflediğimizi ortaya koymaktadır. BCG ve immün faktörleri içeren bir başka çalışmada Simons ve arkadaşları BCG tedavisine yanıt olarak mesaneye doğru göç eden polimorfik nükleer nötrofiller (PMN) tarafından TRAIL salındığını tespit etmişlerdir. Buna ek olarak IFN ‘un PMN tarafından salınan TRAIL miktarını ve etkinliğini arttırdığını dolayısıyla terapötik verimi de arttırdığını ortaya koymuşlardır (24).

Çalışmamızdaki mesane kanseri ve kök hücreleri arasındaki immün ilişkili genlerin farklarını ve BCG ve kombine tedavilerle oluşan gen değişimlerini daha iyi anlamak için kemokin interlökin ve sitokinlerin yapı ve işlevlerini kısaca tekrarlamak gerekmektedir. Kemokinler, 8-14 kD boyutta küçük yapısal birbirine benzeyen moleküllerdir. Birçok farklı lökositin etkileşimlerini düzenlerler. Bu işlevi Gprotein eşleşmiş reseptörlerle yaparlar. Kemokinlerin ayrıca, gelişimde, homeostazda, immün sistemin işlevinde önemli rolleri vardır. Anjiogenezde entotel hücreleri üzerine etkileri vardır. Santral sinir sistemini de etkilerler. Dört adet korunmuş sistein rezüdüvlerinin ilk ikisinin aranjmanına göre CXC ve CC olarak iki ana ailesi vardır. CXC kemokinleri ELR ve non ELR olarak alt sınıflanırlar. Bu sınıflama CXC motifinin N terminalinde glu-leu-arg sekansının varlığı ya da yokluğuna göre oluşur (25).

Mesane kanserinde kanser kök hücrelerinin kanser hücrelerine göre kemokinler olan CXCL5 (ENA-78/LIX), CCL8 (MCP-2), CNTF, CSF2 (GM-CSF) genleri mRNA düzeyinde aşırı eksprese etmekte olarak saptanmıştır. Kanser hücrelerinde ise IL6, TNSFF11, FASLG, CXCL9 daha yüksektir. CXCL5 nötrofil aktive edici peptiddir. 4q13.3 de lokalize gen ürünüdür. Epitelial hücre köken almış bir inflamatuvar sitokin olarak tanımlanır. İnterlökin-8, TNFalfa tarafından salınımı uyarılır (25). Yine kanser kök hücrede artmış olan CCL8 mononükleer hücreleri etkileyen CC tipi kemokinlerdendir. Monosit kemotaktik proteindir. İlk olarak osteosarkomdan izole edilmiştir. 75 aminoasitli bir protein kodlayan gen 17q12 de lokalizedir (26).CNTF,

11q12.1 de lokalize silier nörotrofik faktördür. Sitokin reseptör benzeri faktör-1 CNTF ye bağlanarak sinyal yollarını uyarır (27). CSF2, 5q31.1'de lokalize gen tarafından kodlanan granülosit makrofaj koloni stimülan faktördür. Hemapoetik progenitör hücreler için proliferasyon için gerekli stimülan olarak tanımlanmıştır. Nötrofil fonksiyonu için asıl regülatuar proteindir (28). Kanseri kök hücrelerinde koloni stimülan faktör, nötrofil aktive edici peptid ve monosit kemotaktik protein fazlalığı kök hücre sağkalımı ve kanser kök hücrelerinin immün hücreleri düzenleyici özelliklerinin bulgusu olarak yorumlanabilir. Kök hücrelerde göre fazla ekspresyon gösteren IL6 7q15.3 de lokalize bir gen tarafından kodlanan interferon beta2 olup B hücre diferansiyasyon ve stimülan faktördür. Akut faz reaktanı ve inflamasyon uyarımında önemlidir. IL1 tarafından stimüle edilir. Proliferasyona katkı sağlar. Tümör gelişiminde rolü vardır (29). Kök hücreden daha fazla olması B hücre yanıtını uyarımın kök hücreden daha fazla olduğu yönünde yorumlanabilir. Kanseri hücrelerinde kök hücreye göre FASLG ve TNSFF11 fazla olması kanser kök hücrelerinin kanser hücrelerine göre ekstrensek apoptozdan daha az etkileneceğinin göstergesi olabilir. CXCL9 (MIG), gama interferon tarafından uyarılan monokin'dir. 4q21.2'de lokalize gen tarafından kodlanır. T hücre kemoatraktandır. Kanseri hücreleri kök hücrelere göre immunitiyi daha fazla uyarıyor olabilir.

BCG uygulaması mesane kanseri kök hücrelerinin üç tipinde de ADIPOQ, CXCL10, XCL1 genlerinde artışa CCL8 ekspresyonunda ise azalmaya neden olmuştur. BCG+MNH+IL-2 kombinasyonunun ise CXCL10, CXCL5, IFNG gen ekspresyonlarını arttırdığı CXCL12, IL-6, TNSF11 azalttığı görülmüştür. CXCL10 alfa kemokin ailesinin üyesi olup, 4q21.1 de lokalize gen tarafından kodlanır ve antitümör aktivitesi olan T hücrelerinin endotele tutunması için kemoatraktan olup anti anjiogenik bir sitokindir. Reseptörü CXCR3' dür (30). RAS'ın hedef genidir. Birçok kolorektal kanserde artmış saptanmıştır. BCG ve kombine uygulamada artışının izlenmesi BCG immunoterapisinde temel bir kemokin olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir. Kombinasyonda ilave olarak CXCL5 nötrofil kemoatraktanın artması, interferon gamanın artması T hücre yanıtına ek olarak additif B hücre kökenli immün etkinin göstergesi sayılabilir. BCG uygulaması ile artmış saptanan XCL1 tek C motifli bir kemokin olup lenfotaktin olarak ta adlandırılır. CCL8 ve CCL3 e homoloji gösterir. Hücre migrasyonu ve büyüme uyarıcısıdır (31). Tek BCG de artması kombinasyonda

artmaması, tedaviye sekonder bir yanıtın IL-2 ile baskılanabileceğinin göstergesi kabul edilebilir.

Literatür değerdendirilmelerinde de ifade edildiği üzere mesane kanserinde değışken bir inflamatuvar yanıt ilişki sitokin ve kemokin ekspresyon paterni bulunmaktadır. Bu açıdan bu çalışma değerdendirildiğinde literatürle uyumlu olarak her üç mesane kanseri hücre hattında herhangi bir işlem yapılmadan dahi kontrol gruplarında da farklı ekspresyon profilleri görölmüştür. Ayrıca her üç mesane kanseri hücre hattından kendi kanser kök hücreleri CD44 pozitifliğine göre izole edildiğinde de bir çok gen ekspresyonunda artış ve azalmalar halinde değışiklikler saptanmıştır. Bu durum çok küçük bir popölasyonu oluşturan kanser kök hücrelerinin immün yanıtta diğer kök hücre karakteristiğinde olmayan hücrelere kıyasla farklı bir davranış gösterdiğini ortaya koymaktadır. O halde immünterapi yaklaşımlarına da klinik açıdan kanser kök hücrelerinin farklı yanıt gösterebileceğini düşünmek yanlış olmamaktadır. Bu doğrultuda BCG nin tek ve kombine uygulamaları açısından her hücre hattının toplam ve izole edilmiş kanser kök hücre yanıtları açısından değerdendirildiğinde hipotezi destekler şekilde immün yanıt ilişkili gen ekspresyonlarının farklılık gösterdiğini görmekteyiz. Ancak bu verilerin protein ekspresyonu açısından da desteklenmesi gerektiğinden ilerleyen çalışmalarda değerdendirilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

BCG tedavisi mesane kanserinde birçok sitokin ve kemokin ekspresyonunu değiştirerek etkilemektedir. Bu ekspresyon farklanması her üç mesane kanseri hücre hattında ve kanser kök hücrelerinde de ortaya çıkmaktadır. Her olgudaki immün modülasyon birinden bir diğerine farklılık göstermektedir. Mesane kanserinde BCG bazlı immünterapinin mesane kanseri kök hücreleri üzerine etkinliği MNH ve IL-2 kombinasyonu ile birlikte uygulanarak artırılabilir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre mesane kanserinde BCG tedavisi sonrasında ortaya çıkan rekürensler esas olarak kanser kök hücre hipotezine bakılacak olursa bu hücre popülasyonu temelli olmayabilir. Bunun nedeni epitel yüzeyi üzerinde farklı lokuslarda ortaya çıkan mesane kanserinin sistemik bir hastalık olmamasıdır. BCG tedavisine başlandığı andan itibaren her olgu immün yanıtın takibi ve değerlendirilmesi tedavi etkinliğini kontrol altında tutmak için verimli olunacağı çalışmanın sonuçlarına göre düşünülmektedir.

Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda bir sonraki adımda BCG etkisinin hastalardan alınan mesane kanseri tümör dokusu ve elde edilen hücrelerin ex vivo değerlendirilmesi planlanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Zhaowei Zhu, Zhoujun Shen, Chen Xu. Inflammatory Pathways as Promising Targets to Increase Chemotherapy Response in Bladder Cancer. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 528690.
2. Luís Lima, Mário Dinis-Ribeiro, Adhemar Longatto-Filho, Lúcio Santos. Predictive Biomarkers of Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy Response in Bladder Cancer: Where Are We Now? *Adv Urol.* 2012; 2012: 232609.
3. George J. Netto, Liang Cheng. Emerging Critical Role of Molecular Testing in Diagnostic Genitourinary Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136: 372–390.
4. Takuji Tanaka, Katsuhito Miyazawa, Tetsuya Tsukamoto, et al. Pathobiology and Chemoprevention of Bladder Cancer. *J Oncol.* 2011; 2011: 528353.
5. Anastasios Anastasiadis, Theo M. de Reijke. Best practice in the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *Ther Adv Urol.* 2012; 4: 13–32.
6. Jian Gu, Xifeng Wu. Genetic susceptibility to bladder cancer risk and outcome. *Per Med.* 2011; 8: 365–374.
7. Zancong Shen, Tong Shen, M. Guillaume Wientjes, et al. Intravesical Treatments of Bladder Cancer: Review. *Pharm Res.* 2008; 25: 1500–1510.
8. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006; 66 (4):1883-90.
9. Molyneux G, Regan J, Smalley MJ. Mammary stem cells and breast cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (24):3248-60.
10. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009; 324 (5935):1670-3.
11. Y Luo, R Han, D P Evanoff, X Chen. Interleukin-10 inhibits Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Exp Immunol.* 2010; 160: 359–368.
12. Yi Luo, Jonathan Henning, Michael A. O'Donnell. Th1 Cytokine-Secreting Recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin and Prospective Use in Immunotherapy of Bladder Cancer. *Clin Dev Immunol.* 2011; 2011: 728930.

13. David A. Zaharoff, Benjamin S. Hoffman, H. Brooks Hooper, et al. Intravesical Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer with Chitosan/Interleukin-12. *Cancer Res.* 2009; 69: 6192–6199.
14. Maximilian Burger, Nicolas Thiounn, Stefan Denzinger, et al. The application of adjuvant autologous intravesical macrophage cell therapy vs. BCG in non-muscle invasive bladder cancer: a multicenter, randomized trial. *J Transl Med.* 2010; 8: 54.
15. Timothy P Kresowik, Thomas S Griffith. Bacillus Calmette–Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Immunotherapy.* 2009 March 1; 1: 281–288.
16. Guo-qing Ding, Yan-lan Yu, Zhou-jun Shen, et al. Antitumor effects of human interferon-alpha 2b secreted by recombinant bacillus Calmette-Guérin vaccine on bladder cancer cells. *Univ Sci B.* 2012; 13: 335–341.
17. Eric J. Askeland, Mark R. Newton, Michael A. O'Donnell, Yi Luo. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol.* 2012; 2012: 181987
18. Catalina Lodillinsky, Yanina Langle, Ariel Guionet, et al. Bacillus Calmette Guerin Induces Fibroblast Activation Both Directly and through Macrophages in a Mouse Bladder Cancer Model. *PLoS One.* 2010; 5: e13571.
19. Se-Jung Lee, Eo-Jin Lee, Seon-Kyu Kim, et al. Identification of Pro-Inflammatory Cytokines Associated with Muscle Invasive Bladder Cancer; The Roles of IL-5, IL-20, and IL-28A *PLoS One.* 2012; 9: e40267.
20. Goodwin Jinesh G., Srinivas Chunduru, Ashish M. Kamat. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF- α but not through TRAIL and FasL. *J Leukoc Biol.* 2012; 92: 233–244.
21. Angeline S. Andrew, Ting Hu, Jian Gu, et al. HSD3B and Gene-Gene Interactions in a Pathway-Based Analysis of Genetic Susceptibility to Bladder Cancer. *PLoS One.* 2012; 7: e51301.
22. Meng Chen, Michelle A.T. Hildebrandt, et al. Genetic Variations in the Sonic Hedgehog Pathway Affect Clinical Outcomes in Non-muscle–invasive Bladder Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 1235–1245

23. Chan KS, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis and therapeutic targeting of human bladder tumor initiating cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:14016-14021.
24. Mark P. Simons, Michael A. O'Donnell, Thomas S Griffith. Role of Neutrophils in BCG Immunotherapy for Bladder Cancer. *Urol Oncol.* 2008; 26: 341–345.
25. Chang M, McNinch J, Basu R, Simonet S. Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78). *J Biol Chem.* 1994; 269: 25277-25282.
26. Van Coillie E, Fiten P, Nomiyama H, Sakaki Y, Miura R, Yoshie O, Van Damme J, Opdenakker G. The human MCP-2 gene (SCYA8): cloning, sequence analysis, tissue expression, and assignment to the CC chemokine gene contig on chromosome 17q11.2. *Genomics* 1997; 40: 323-331.
27. Elson GCA, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau, H, Froger J, Suard I, de Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Gascan H. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nature Neurosci.* 2000; 3: 867-872.
28. Cantrell MA, Anderson D, Cerretti DP, Price V, McKereghan K, Tushinski RJ, Mochizuki DY, Larsen A, Grabstein K, Gillis S, Cosman D. Cloning, sequence, and expression of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc Nat Acad Sci* 1985; 82: 6250-6254.
29. Ancrile B, Lim KH, Counter CM. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev.* 2007; 21: 1714-1719.
30. Booth V, Keizer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry.* 2002; 41: 10418-10425.
31. Wang T, Han S, Wu Z, Han Z, Yan W, Liu T, Wei H, Song D, Zhou W, Yang X, Xiao J. XCR1 promotes cell growth and migration and is correlated with bone metastasis in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 464(2):635-41.

8. EKLER

8.1 Kurum İzin Belgesi



TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanlığı



Sayı : 51202101 / 2015-02 nolu Kurul
Konu :

02.02.2015

İLGİLİ MAKAMA;

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'ın Danışman olduğu Yegâne Kovuela ÖZCAN isimli Doktora Öğrencisi 'Mcsanc Kanseriinde İmmünterapiye Yanıtta Kansere Hücresinin Rolü' isimli araştırmanın Temel Onkoloji Anabilim Dalı Labarotuarlarında uygulanması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Temel Onkoloji AD. Bşk.

Mithatpaşa Caddesi No:1606 İnciraltı 35340 İzmir
Tel: 0(232) 412 8201 Fax: 0(232) 278 9495
e-posta: temelonkoloji@deu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için
Gülperi ÇANKAYA
Tel.: 412 8201



8.2. Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/44-03	Tarih: 05.12.2013
	Prof.Dr.Safiye AKTAŞ'ın sorumlusu olduğu "Mesane Kanseriinde İmmünterapiye Yanıtta Kanser Kök Hücrelerinin Rolü" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Diyetimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Diyetimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Banu
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Reyhan
Prof.Dr.Nejat SARIOĞMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	N.Ş.
Prof.Dr.Ece BOBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ece
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katillerad
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Vesile
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Bilgin
Prof.Dr.Mukaddes GÜNEŞ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	M. Güneş
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katillerad
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Nihal
Doç.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	İşıl
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Müge
Doç.Dr.Şeyda Seren INTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	Şeyda
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	Ahmet
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	İhsan

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

8.3. Özgeçmiş

1. Adı Soyadı : Yegane Koulieva Özcan

2. Doğum Tarihi : 1969

3. Unvanı : Aile Hekimliği Uzmanı / Uzman Homeopat

4. İletişim : Tel: 0532 4414901
E-mail: ykoulieva@yahoo.com

5. Öğrenim Durumu : Tıp Üniversitesi

Derece	Üniversite/Hastane	Alanı	Yılı
Doktora	Dokuz Eylül Üniversitesi	Temel Onkoloji	---
Yüksek Lisans	Medipol Üniversitesi	Sağlık Hukuku	08.05.2015
Klasik Homeopati uzmanlık	The London School of Classical Homeopathy (Moskova Şubesi)	Klasik Homeopati	19.04.2015
Klasik Homeopati Temel Eğitimi	Klasik Homeopati Derneği ve Medipol Üniversitesi işbirliği	Klasik Homeopati	21.12.2014
Fitoterapi Eğitimi	Bezmialem Üniversitesi	Fitoterapi	18.05.2013
İhtisas	Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Aile Hekimliği Uzmanlık	22.10.2001
Tıp Eğitimi	Azerbaycan Devlet Üniversitesi	Tıp	15.07.1993

6. Bitirilen ve Devam Eden Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

6.1. Bitirilen Yüksek Lisans Tezi

1. KOULİEVA, Yegâne. (2015). *Hastane Yöneticisinin Hukuki Sorumluluğu*. Medipol Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü.

Proje Danışmanı: Yrd. Doç. Dr Mahmut Tokaç

6.2. Devam Eden Doktora Tezi

1. KOULİEVA, Yegâne. *Mesane Kanserinde İmmünterapiye Yanıtta Kanser Kök Hücrelerinin rolü*. Dokuz Eylül Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü.

Proje Danışmanı: Prof. Dr. Safiye Aktaş

7. Diğer Bilimsel Etkinlikler ve Deneyim

- 7.1. KOULİEVA, Yegâne. Klasik Homeopati Oturum Moderatorü. *I. Uluslararası İVEK Kongresi*. İstanbul: Haliç Kongre Merkezi, 28-30 Kasım 2014.

- 7.2. İlaçta Ar-Ge; Kamu Üniversite – Sanayi İşbirliğinin Önemi (İEİS) Bezmialem Üniversitesi, 23-24 Ekim 2014

- 7.3. 06.01.2015 Bezmialem Üniversitesi Fitoterapi Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi Kurulması Projesi Çalıştayı

- 7.4. 29 Ocak-1 Şubat 2015 6. Üroonkoloji Kış Kongresi, Bakü Azerbaycan

- 7.5. 12-13 Mart 2015, 2. Kanıta Dayalı Tıp Sempozyumu, 4. Ulusal Sağlık Teknolojileri Değerlendirme Forumu

- 7.6. 2014 yılında Milli Meclis Sağlık Komisyonuna İVEK derneği adına katıldım ve görüş bildirdim.

- 7.7. Uluslararası ve Ulusal Homeopati Kurultaylarına dinleyici olarak düzenli katılım.

8. Yürütülen Projeler

8.1 *Domates ve Enginar Atıklarından, Katma Değeri Yüksek Likopen ve Kafeik Asit Türevi Olan Sinarinin Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyon (Sc-CO2) Yöntemi Kullanılarak Üretimi ve Kalite Kontrolü* – ARGEFAR Ege Üniversitesi ile Üniversite & Sanayi işbirliği 1505 projesinde MAY Sağlık Grubu adına Proje sorumlusu, 2009-2015

8.2 *Grataegus Üretimi* – FABAL, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Üniversite & Sanayi işbirliği 1505 projesinde MAY Sağlık Grubu adına Proje Sorumlusu, 2013-devam ediyor

9. İdari Görevler

9.1 *Yurtdışı* – BIO International Convention 23-26 Haziran, 2014, San Diego Convention Center, San Diego, ABD

10. İş Deneyimi

10.1 Özel “Biotebabet” polikliniği Bakü/Azerbaycan 2015- devam ediyor

10.2 MAY Sağlık Grubu, 2006- 2015

10.3 Johns Hopkins Medicine & Anadolu Sağlık Merkezi Hastanesi, 2004-2006

10.4 Zeynep Kamil Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2001-2004

11. Dil Becerisi

Rusça

8.4. İngilizce Yayın

IN VITRO STUDY OF ROLE OF CANCER STEM CELLS IN IMMUNOTHERAPY IN BLADDER CANCER

Yegane Özcan, MD, sPhD, ykoulieva@yahoo.com

Fulya Çağlar, sMoSc, fulya_caglare@hotmail.com

Ayşe Banu Demir, PhD, banudemir84@gmail.com

Ayşe Pınar Erçetin, PhD, pinarercetin@gmail.com

Zekiye Altun, MD, PhD, zekiyesaltun@gmail.com

and Safiye Aktas, MD, PhD, safiyeaktas@gmail.com

Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, İzmir, Turkey

Corresponding Author: Safiye Aktas

safiyeaktas@gmail.com

TEL: +902324128202

Adress:

Dokuz Eylül Üniversitesi

Onkoloji Enstitüsü

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Mithatpaşa caddesi

35340 Balçova İzmir Turkey

Running Title: CANCER STEM CELLS IN IMMUNOTHERAPY IN BLADDER CANCER

Conflict of Interest: The authors decelerate no conflict of interest.

Synopsis: In this study, we rearch the effect of BGC with mononuclear cells and IL-2 on bladder cancer cell lines comparing with their cancer stem cells using cell viability, apoptosis and cytokine, chemokine expressions to explore whether cancer stem cell are responsible for recurrences after BCG treatment.

IN VITRO STUDY OF ROLE OF CANCER STEM CELLS IN IMMUNOTHERAPY IN BLADDER CANCER

ABSTRACT

Bacillus Calmette Guerin (BCG) has become a gold standard immunotherapy, after treatment the recurrences are frequently occurring in bladder cancer. CD44+ cancer stem cells (CSCs) might be one of the main reasons cytokine and chemokine expressions in bladder cancer and CSC cultures in vitro on which BCG treatment in combination with other immunotherapeutic agents applied were evaluated. Three human bladder cancer cell lines with different characteristics (T24, 5637 and JMSU-1) and CD44+ bladder CSCs isolated by magnetic bead isolation were cultured. BCG,

interleukin 2, mononuclear cells(MNC) and their combination were applied on cells and CSCs for 24, 48 and 72 hours. WST-1, Trypan blue and Annexin V-PI were used to detect the viability and cell death. After treatments, total RNAs were isolated and converted to cDNA for each group and controls. 84 genes in standard array of chemokines and cytokines were analyzed by RT-PCR. BCG (7.32 microgram/ml) with IL-2 (1000IU/ml) and MNC (1000 cells/ml) was found to be most effective in bladder cancer cells. When BCG and its combinations were applied to CSCs, BCG treatment showed cytotoxic effect on CSCs as well as cancer cells. CSCs over expressed CXCL5, CCL8, CNTF, CSF2, cancer cells over expressed IL6, TNSFF11, FASLG, CXCL9. In all three cell lines; BCG application increased expression of CXCL5 and LTB; besides decreased CCL20 and IL6. When The expression differs among three cell lines and their CSCs. Our results indicate that recurrences after BCG treatment in bladder cancer does not mainly based on CSC hypothesis.

Key Words: Bladder cancer, Bacillus Calmette Guerin, Cancer Stem Cells

1. INTRODUCTION

Bladder cancer is a type of cancer, which originates from the innermost layer of the bladder, is also known as uroepithelial carcinoma. Bladder cancer shows one of the highest prevalence among all cancers in economically developed countries. It is the most common type of urologic cancer in China and the second in the United States (1-5). The vast majority of malignant bladder cancer is transitional cell carcinoma (TCC) developing from transitional epithelium. TCC histopathologically consists of two types; invasive bladder cancer (NMIBC) and intramuscular invasive bladder cancer (MIBC). 70-80% of the patients are diagnosed with NMIBC limited to mucosa. The majority of bladder cancers are diagnosed at an early stage in which the cancer develops in the innermost layer and can be treated at high rates. The progression of the disease is invasive to the bladder tissue and the fatty tissue around the bladder (5, 6). The most common metastatic tissues are the lung, brain, liver and bone. Although the disease can be treated at early-stage, recurrences of the disease are quite common. For this reason, patients with bladder cancer who are recovering after treatment need to be checked periods of time against the risk of recurrence (7).

Bacillus calmette guerine (BCG) is an immunotherapy that has become the gold standard in the treatment of bladder cancer (2, 11, 12). It drives the mechanism of action by directing neutrophils to the tumor microenvironment. Many chemokines are induced in urothelial cells exposed to BCG such as IL-1, IL-6, IL-8, IL-17 interleukins, GM-CSF, tumor necrosis factor (TNF). BCG intravesical immunotherapy in bladder cancer is the most effective adjuvant therapy to reduce NIMBC recurrence and progression. BCG therapy has an overall response rate of 50-60% for small residual tumors and 70-75% for carcinoma in situ. However, a large proportion of patients do not respond to initial BCG therapy, and 40-50% of responders have recurrence within 5 years. In MIBC, cisplatin-based MVAC (methotrexate, doxorubicin, cisplatin) is the standard treatment (13 -18).

Stem cells have been described in bladder cancer. However, there are no other studies in the literature that question the effects and immunological mechanisms of BCG therapy on bladder stem cells. Upon this knowledge, the aim of this study was to evaluate the changes of cytokine and chemokine expressions in bladder cancer and cancer stem cell cultures in vitro on which BCG treatment in combination with other immunotherapeutic agents applied.

2. MATERIALS AND METHODS

This study was approved by local ethics committee of our University. Cell lines were bought from DSMZ (T24: ACC 376; 5637:ACC 35; JMSI-1: ACC 505). Mycoplasma detection with ELISA kit was negative.

2.1. Cell Culture

Three bladder cancer cell lines were cultured in DMEM and RPMI 1640 medium supplemented with 1% L-Glutamine, 1% penicillin/ streptomycin and 5% fetal bovine serum (FBS). T24 cell line was grade 3, transitional cell carcinoma which was originated from primary bladder carcinoma of 81 years old woman. 5637 cell line was originated from primary bladder carcinoma of 68 years old male patient. The other cell line was JMSU-1 which had epithelial morphology and originated from primary bladder carcinoma of 61 years old male patient. The cultivation was continued under 37°C and 5% CO₂ conditions until number of the cells were enough for cancer stem cell isolation.

2.2. CD44+ Bladder Cancer Stem Cell Isolation

Cell culture mediums were removed from passage 3 and cell were washed with PBS. Adherent cells were detached with trypsin EDTA solution and collected after centrifugation. After resuspension in PBS at pH 7.2, supplemented with 0.5% fetal bovine serum, and 2 mM EDTA, 100 µl ferritin coated CD44 monoclonal antibody were added and incubated at +4 °C for 30 minutes. Tubes were placed in a magnet and CD44- cells were removed. CD44+ labeled magnetic cells were moved towards the magnet and attached. CD44+ cells were collected and resuspended in 1 ml PBS. For flow cytometric confirmation, 100 µl of cells were transferred into another tube. The rest of the cells were used for test groups.

2.3. Test Groups

1. group: Cell suspension including CD44+ and CD44- bladder cancer cells (Medium)
2. group: Cell suspension including CD44+ and CD44- bladder cancer cells (BCG)
3. group: Cell suspension including CD44+ and CD44- bladder cancer cells (BCG +IL + lymphocytes)
4. group: CD44+ bladder cancer stem cells (Medium)
5. group: CD44+ bladder cancer stem cells (BCG)
6. group: CD44+ bladder cancer stem cells (BCG +IL + lymphocytes)

Test groups were formed for three bladder cancer cell lines.

2.4. Flow Cytometric Confirmation of Isolated CD44+ Cells

The purity of isolated cells were evaluated by flow cytometry. 10 µl of CD44 monoclonal antibody was added and incubated at room temperature for 20 minutes in the dark. Unstained cells were also used for gating strategies. After incubation, cells were washed, resuspended in 500 µl PBS and then analyzed. CD44+ CSC 1000 cells for each cell line were subcutaneously injected to nude mice to check cancer stem cell property and tumor formation was observed at day 8-10.

2.5. Determination of BCG Concentration:

The effect of BCG on proliferation of each cell line and their stem cells were evaluated by WST-1 assay; apoptotic cell death ratios were analyzed by annexin V staining. Cancer stem cell population is less number of cells among all so LD50 dose of BCG was first determined in all CD44+ and CD44- cell population. After exposure of cells with BCG for 24 hours, nucleic acids were isolated and RT-PCR analysis was performed.

WST-1 Assay for Cell Proliferation Analysis:

10 µl WST-1 solution was added per 100 µl cells (1×10^4) in each well and incubated for 2 hours at 37°C and 5% CO₂. After incubation the absorbance values were analyzed by ELISA reader at 450 nm wavelength and at 630 nm reference wavelength. Mean values of control absorbances were considered as 100% cell proliferation and percentages for each condition were calculated relatively.

2.6. Flow Cytometric Analysis of Apoptosis with Annexin V Staining

The cells were incubated overnight in 6 well plates according to the test groups. 10 µl propidium iodide and 5 µl annexin V-FITC solution were added in each test and incubated for 15 minutes in + 4°C. After incubation, 400 µl 1x annexin V binding solution was added to each tube. According to the appropriate gating strategies cell percentages in early stage apoptosis and late stage apoptosis were detected (fig 1).

2.7. RNA Isolation

Isolated CD44+ stem cells, total bladder cancer cells and their subgroups with BCG were collected and counted. The procedure according to the manufacturer's instructions was performed for isolation of approximately 15 µg RNA from 1×10^6 cells. Cells were resuspended in PBS and 400 µl lysis and binding buffer were added. Samples were transferred to the filtered tubes which were connected to collection tubes. After centrifugation, filtered tubes were transferred to new collection tubes. Samples were incubated for 15 minutes at room temperature in mixture of 90 µl DNase incubation buffer and 10 µl DNase I endonuclease. Eluted RNA samples were collected in 50 µl elution buffer after washing and centrifugation steps. RNA samples were quantified by Qubit NanoDrop for cDNA synthesis (Table 1).

2.8. cDNA Synthesis

The amount of RNA obtained from some samples was very low due to cell depletion. For this reason, the maximum amount of RNA that can be taken from the RNA samples for cDNA synthesis was taken and cDNA synthesis was performed using the iScript™ cDNA Synthesis kit (BioRad) as described by the manufacturer company. RNA sample quantities and amounts included in cDNA synthesis are given in the table below.

The quality of the cDNAs was tested by RT-PCR prior to the array. 0.1 μ M of 1X primer-enzyme mixture stock was prepared and maintained at -20 °C until use. The cDNA-SYBR Green Master mix (Bio Rad) mixture was prepared according to the 100 gene example as follows.

100 X cDNA Master-mix mixture: 480 μ l dH₂O (Nuclease-free) + 20 μ l of cDNA + 500 μ l SYBR Green Master Mix (BioRad)

This prepared cDNA-SYBR Green Master mix mixture was prepared in 1.5 ml microcentrifuge tubes, vortexed and distributed 9 μ l to each well of 96 well plates. 1 μ l aliquot of the prepared primer-enzyme mid-stock was added to the mixture. In total, 10 μ l of the final volume of the PCR-array plate was sealed, spined down at 2000rpm for 1 min and PCR was performed. The PCR conditions were as follows: 95°C – 10 seconds, 58°C 45 seconds (45 cycles). The obtained Cq values were analyzed in the 'Qiagen Bioscience' program.

2.9. Real Time- PCR Array Analysis

The Human Inflammatory Cytokines & Receptors RT² Profiler PCR Array was used to profile the expression of 84 key genes involved in mediating immune cascade reactions during inflammation. The chemokines, cytokines, interleukins and their receptors involved in the inflammatory response were listed as:

Chemokines: C5, CCL1 (I-309), CCL11 (Eotaxin), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1D), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL2 (MCP-1), CCL20 (MIP-3A), CCL22, CCL23 (MPIF-1), CCL24 (Eotaxin-2), CCL26, CCL3 (MIP-1A), CCL4 (MIP-1B), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (MCP-2), CX3CL1, CXCL1 (IL8RA), CXCL10 (INP10), CXCL11 (I-TAC/IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL2 (IL8RB), CXCL3, CXCL5 (ENA-78/LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9.

Chemokine Receptors: CCL13 (MCP-4), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CX3CR1, CXCR1, CXCR2.

Interleukins: IL13, IL15, IL16, IL17A, IL17C, IL17F, IL1A, IL1B, IL1RN, IL21, IL27, IL3, IL33, IL5, IL7, IL8, IL9.

Interleukin Receptors: IL10RA, IL10RB, IL1R1, IL5RA (CD125), IL9R.

Other Cytokines: AIMP1 (SCYE1), BMP2, CD40LG (TNFSF5), CSF1 (MCSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), FASLG (TNFSF6), IFNA2, IFNG, LTA (TNFB), LTB, MIF, NAMPT, OSM, SPP1 (Osteopontin), TNF, TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11, TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF4 (OX40L), VEGFA.

Other Cytokine Receptor: TNFRSF11B.

2.10. Statistical Analysis

The gene expression fold changes were compared with the control group and the groups were compared with each other. 3 folds and over expression differences were evaluated as significant. Gene expression analysis was supported by heat map and cluster gram analysis. These analyzes were done on the SA Bioscience data analysis website. The use of this site is free of charge. A statistical analysis of the results was conducted using SPSS version 15.0 of the Windows statistical program at a significance level of $p < 0.05$. The findings were analyzed by Chi square and Mann Whitney U non-parametric test.

3. RESULTS

3.1. Analysis of Apoptosis with Annexin V- PI Staining by Flow Cytometry

According to Annexin V and PI staining, BCG increased early (63%) and late (24.4%) stage apoptosis in 5637 (total) cells but there was no significant difference in test BCG+ lymphocytes and IL2 combination group. BCG also increased early (52.2%) and late (17.8%) stage apoptosis in CD44+ 5637 cells, however BCG increased early (61%) and late (23%) apoptosis more when applied in combination with lymphocytes and IL-2. Likewise, BCG and BCG+lymphocytes+IL2 combination increased early (64.5% and 60.3%) and late (9.4% and 19.4%) stage apoptosis on total JMSU-1 cells. This apoptosis inducing effect of both BCG and its combination, also emerged in CD44+ JMSU-1 cells. BCG and its combination group did not cause any significant difference on T24 cells. On the contrary, BCG increased early (45%) and late (29.2%) in CD44+ T24 cells while BCG, lymphocytes and IL2 combination caused 53.1% early apoptosis and 17.4% late apoptosis. All apoptosis data were given in Table 2.

3.2. Real Time- PCR Array Results

- 3.2.1. JMSU-1 total cells;

When gene expressions of JMSU-1 cells were compared with BCG treated JMSU-1 cells. CCL11. CCL13. CCL7. CCL8. CXCL5. CXCL11. IFN γ . IL24. IL9. LTA and LTB expressions were decreased while CXCL9. CCL18. IL17. IL27. TNFSF11 expressions were increased after BCG treatment. ADIPOQ. CCL22. CD40L. CXCL10. CXCL5. IL22 expressions were decreased when BCG was given in combination with IL2 and lymphocytes. When IL-2 and MNCs were combined with BCG; expression of many of the cytokines and chemokines were decreased. In contrast. this combination increased expressions of IL10. IL12. IL16. IL17 in JMSU-1 cells.

- 3.2.2. 5637 total cells;

According to gene expression comparison of 5637 cells with BCG treated 5637 cells. CCL22. CXCL5.SPP1. TNFSF13B expressions were decreased while ADIPOQ. CCL18. FASLG. IFNG expressions were increased after BCG treatment. When IL-2 and MNCs were combined with BCG; expression of CXCL5. THPO. TNFSF11 were decreased. In contrast. this combination increased expressions of BMP7. CCL18. CCL19. CCL2. CXCL11. FASLG in 5637 cells. LTA. LTB and VEGFA expressions were decreased when IL-2 and MNCs were combined with BCG in 5637 cells.

- 3.2.3. T24 total cells;

When gene expressions of T24 cells were compared with BCG treated T24 cells. CCL17. CCL19. CSF2. CXCL10. CXCL5. IFN- α 2. IFN-G. IL13. LTB. THPO and VEGFA expressions were decreased while CD40LG. CXCL12. IL10 and TNFSF11 expressions were increased after BCG treatment. CCL3. CXCL10. CXCL11. CXCL5. IFN α 2. LTB. SPP1 expressions were decreased when BCG was given in combination with IL2 and lymphocytes. In contrast. this combination increased expressions of CCL11. CCL22. CCL7. CD40LG. CXCL12. CXCL16. IL10. IL12B. IL16. IL27. LTA and TNFSF11 in T24 cells.

- 3.2.4. JMSU-1 stem cells;

BMP7. CCL11. CCL22. CCL7. CCL8. IFNG. IL2. IL22. IL9 and LTA gene expressions were less in JMSU-1 stem cells in comparison with total JMSU-1 cells

while CXCL10, FASLG, IFN α 2, IL12A, IL10 and IL13 were more expressed in JMSU-1 stem cells.

When JMSU-1 stem cells were treated with BCG, expressions of ADIPOQ, BMP4, CCL18, CXCL10, IL12A, IL13, LTB, MSTN, THPO and TNFSF13B were decreased. On the contrary, CCL3, CCL8 and SPP1 expressions were increased. The combined treatment of JMSU-1 stem cells with IL2, MNCs and BCG caused decrease of ADIPOQ, CCL22, CD40LG, CXCL10, CXCL5, IFNG, IL2, IL22, IL9, LTA and LTB gene expressions while IL10, IL12, IL16 and IL17A expressions were increased.

- 3.2.5. 5637 stem cells;

CCL11, CCL22, CCL24, CXCL5, IL10, IL17A, IL17F, IL22, IL27, IL3, TNFSF11 and THPO gene expressions were decreased in 5637 stem cells in comparison with total 5637 cells. In addition CSF1, IL16, OSM and XCL1 were more expressed in 5637 stem cells than total 5637 cells. 5637 stem cells also expressed CCL11 gene while 5637 cells did not.

When 5637 stem cells were treated with BCG most of the gene expressions were decreased such as; ADIPOQ, CSF1, OSM, XCL1, TNFSF13B, VEGFA, IL22, IL27, IL3, IL4, LTA, MIF, IL13, IL12B, IL17A, IL17F, IL1B, IL1RN and IL2. Counter to this, CCL19, CCL2, CCL21, CCL8, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL5, CXCL9, IFNG, FASLG and IL10 expressions were increased. The combined treatment of 5637 stem cells with IL2, MNCs and BCG led to significant decrease of CCL18, CSF1, IL16, OSM and XCL1 gene expression while BMP2, BMP6, CCL11, CXCL12, CXCL5, IL10, IL12B, IL2, IL22, IL3 and TNFSF11 expressions were increased.

-3.2.6. T24 stem cells;

Most of the cytokine and chemokine related gene expressions were less in T24 stem cells than total T24 cells such as; BMP4, BMP7, CCL17, CCL24, CCL3, CCL8, CNTF, CSF2, CXCL10, CXCL11, CXCL5, IFN α 2, IFNG, IL17A, IL17B, IL12B, IL1B, IL2, IL21, IL3, LTB, PPBS, THPO, VEGFA and SPB1. Only B2M gene expression was more in T24 stem cells. When JMSU-1 stem cells were treated with BCG, expressions of IL16, CD40LG, FASLG, TNFSF11 were decreased. The combined treatment of T24stem cells with IL2, MNCs and BCG led to decrease of IL16 and IL27 gene expressions.

CSCs of three cell lines over expressed CXCL5, CCL8, CNTF, CSF2 compared with cancer cells. Cancer cells over expressed IL6, TNFSF11, FASLG, CXCL9 compared with CSCs. In all three cell lines BCG application increased expression of CXCL5 and LTB; besides decreased CCL20 and IL6. When BCG was combined with IL-2 and lymphocytes CXCL10, CXCL5, IFNG were increased and CXCL12, IL-6, TNFSF11 were decreased. BCG treatment on CSCs caused increase in ADIPOQ, CXCL10, XCL1 and decrease in CCL8.

4. DISCUSSION

In this study, we evaluated bladder cancer stem cells identified as CD44+ phenotype, which constitute a small fraction of the total cell population in three bladder cancer cell lines with different characteristics. The main question was whether BCG immunotherapy applied in bladder cancer was effective on bladder cancer stem cells. Correspondingly, specific targets for future studies were evaluated based on

immunological mechanisms underlying frequent recurrences. We obtained bladder cancer stem cells by magnetically isolation of CD44+ cells from total cell populations.

Lee et al. had performed cDNA microarray to profile inflammatory cytokines in 103 NMIBC, 62 MIBC, 58 surrounding tissue with normal morphology and 10 healthy normal donor tissues and showed that IL-5, IL-20 and IL-28A were specific for bladder cancer development (19). After neutralizing FasL and TRAIL death ligands by their antibodies in mice, Jinesh GG et al. showed that neutrophils induced by BCG, released TNF- α as an anti-cancer mechanism (20). In a multicenter study conducted by Andrew SA et al., it was found that bladder cancer had 3-4 times greater incidence in men than in women, which might be related to hormone levels. They determined that these differences had led to gene expression differences associated with T cell activation such as GATA3, CD81 (21). Chen M et al. showed that genetic variation in the pathway of Sonic Hedgehog affects the clinical course of the disease according to SNP evaluations of 803 control and 803 NMIBC cases and that SNPs have longer recurrence-free survival in wild-type genotypes (22). Although many bladder cancer stem cell markers have been described in the literature, Chan KS et al. reported bladder cancer stem cells phenotypes such as CD44+; CK5 + or CK20- in primary patients or patient-derived xenografts and these phenotypes have been considered as bladder cancer stem cells in many studies since 2009 (23). Simons et al. demonstrated that TRAIL is released by polymorph nuclear neutrophils (PMN) migrating into the bladder in response to BCG therapy, and additionally IFN increases the amount and effectiveness of TRAIL released by PMN, thereby enhancing therapeutic efficacy (24).

5. CONCLUSION

BCG treatment differs many of the cytokines and chemokines expression in bladder cancer. The expression differs on three different cell lines and their CSCs. Immune modulation of each case differs among each other. The effectivity of BCG based immunotherapy in bladder cancer on CSCs might decrease with combination of MNCs and IL-2. Our results indicate that recurrences after BCG treatment in bladder cancer may not be mainly based on CSC hypothesis considering bladder cancer as a systemic disease occurring at different locuses of surface epithelium. Our results indicate that immune response of each case might better be evaluated after beginning of BCG treatment. Our next step will be evaluating BCG effect ex vivo on cancer cells obtained from patients with bladder cancer.

ACKNOWLEDGEMENT: This study was supported by Dokuz Eylul University Scientific Research Project fund (Project No: 2014.KB.SAG.052).

6. REFERENCES

1. Zhaowei Zhu, Zhoujun Shen, Chen Xu. Inflammatory Pathways as Promising Targets to Increase Chemotherapy Response in Bladder Cancer. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 528690.
2. Luís Lima, Mário Dinis-Ribeiro, Adhemar Longatto-Filho, Lúcio Santos. Predictive Biomarkers of Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy Response in Bladder Cancer: Where Are We Now? *Adv Urol.* 2012; 2012: 232609.
3. George J. Netto, Liang Cheng. Emerging Critical Role of Molecular Testing in Diagnostic Genitourinary Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136: 372–390.

4. Takuji Tanaka. Katsuhito Miyazawa. Tetsuya Tsukamoto. et al. Pathobiology and Chemoprevention of Bladder Cancer. *J Oncol.* 2011; 2011: 528353.
5. Anastasios Anastasiadis. Theo M. de Reijke. Best practice in the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer. *Ther Adv Urol.* 2012; 4: 13–32.
6. Jian Gu. Xifeng Wu. Genetic susceptibility to bladder cancer risk and outcome. *Per Med.* 2011; 8: 365–374.
7. Zancong Shen. Tong Shen. M. Guillaume Wientjes. et al. Intravesical Treatments of Bladder Cancer: Review. *Pharm Res.* 2008; 25: 1500–1510.
8. Wicha MS. Liu S. Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006; 66 (4):1883-90.
9. Molyneux G. Regan J. Smalley MJ. Mammary stem cells and breast cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (24):3248-60.
10. Rosen JM. Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 2009; 324 (5935):1670-3.
11. Y Luo. R Han. D P Evanoff. X Chen. Interleukin-10 inhibits *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Exp Immunol.* 2010; 160: 359–368.
12. Yi Luo. Jonathan Henning. Michael A. O'Donnell. Th1 Cytokine-Secreting Recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin and Prospective Use in Immunotherapy of Bladder Cancer. *Clin Dev Immunol.* 2011; 2011: 728930.
13. David A. Zaharoff. Benjamin S. Hoffman. H. Brooks Hooper. et al. Intravesical Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer with Chitosan/Interleukin-12 *Cancer Res.* 2009; 69: 6192–6199.
14. Maximilian Burger. Nicolas Thiounn. Stefan Denzinger. et al. The application of adjuvant autologous intravesical macrophage cell therapy vs. BCG in non-muscle invasive bladder cancer: a multicenter. randomized trial. *J Transl Med.* 2010; 8: 54.
15. Timothy P Kresowik. Thomas S Griffith. Bacillus Calmette–Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Immunotherapy.* 2009 March 1; 1: 281–288.
16. Guo-qing Ding. Yan-lan Yu. Zhou-jun Shen. et al. Antitumor effects of human interferon- α 2b secreted by recombinant bacillus Calmette-Guérin vaccine on bladder cancer cells. *Univ Sci B.* 2012; 13: 335–341.
17. Eric J. Askeland. Mark R. Newton. Michael A. O'Donnell. Yi Luo. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol.* 2012; 2012: 181987
18. Catalina Lodillinsky. Yanina Langle. Ariel Guionet. et al. Bacillus Calmette Guerin Induces Fibroblast Activation Both Directly and through Macrophages in a Mouse Bladder Cancer Model. *PLoS One.* 2010; 5: e13571.
19. Se-Jung Lee. Eo-Jin Lee. Seon-Kyu Kim. et al. Identification of Pro-Inflammatory Cytokines Associated with Muscle Invasive Bladder Cancer; The Roles of IL-5. IL-20. and IL-28A *PLoS One.* 2012; 9: e40267.

20. Goodwin Jinesh G., Srinivas Chunduru. Ashish M. Kamat. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF- α but not through TRAIL and FasL. *J Leukoc Biol.* 2012; 92: 233–244.
21. Angeline S. Andrew. Ting Hu. Jian Gu. et al. HSD3B and Gene-Gene Interactions in a Pathway-Based Analysis of Genetic Susceptibility to Bladder Cancer. *PLoS One.* 2012; 7: e51301.
22. Meng Chen. Michelle A.T. Hildebrandt. et al. Genetic Variations in the Sonic Hedgehog Pathway Affect Clinical Outcomes in Non-muscle–invasive Bladder Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3: 1235–1245
23. Chan KS. et al. Identification. molecular characterization. clinical prognosis and therapeutic targeting of human bladder tumor initiating cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:14016-14021.
24. Mark P. Simons. Michael A. O'Donnell. Thomas S Griffith. Role of Neutrophils in BCG Immunotherapy for Bladder Cancer. *Urol Oncol.* 2008; 26: 341–345.

