



**Mekanik Titreşimlerin Meme Kanseri Hücrelerinin
Davranışlarına Etkisi**

Program Kodu: 3501

Proje No: 111M604

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Engin Özçivici

Bursiyer:
Melis Ölçüm Uzan

HAZİRAN 2015
İZMİR



ÖNSÖZ

Bu proje TÜBİTAK Mühendislik Araştırma Destek Grubu (MAG) tarafından desteklenmiş ve Yrd. Doç. Dr. Engin Özçivici yürütücülüğünde tamamlanmıştır. Projenin yürütülmesi sırasında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Özden Yalçın Özuysal danışmanlık görevi üstlenmişlerdir. Proje desteği ve bulguları, projede bursiyer olarak çalışan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik programına kayıtlı Melis Olçum'un doktora tezi muhteviyatının bir kısmını oluşturarak bu öğrencinin doktora derecesine katkıda bulunmuştur.

Bu projede, yüksek frekans ve düşük yoğunluklu mekanik titreşimlerin farklı tipteki meme kanseri hücrelerinde yol açtığı morfolojik ve moleküler değişimlere olan etkileri incelenmiştir. Sonuçlara göre mekanik titreşimlerin agresif tip meme kanseri hücrelerinin üremelerini baskıladığı ortaya konulmuştur. Proje sonuç raporunun yazım aşamasında (Haziran 2015) proje sonuçlarından yayınlanmış olan 1 uluslararası makale, 2 uluslararası bildiri ve 2 ulusal bildiri ile proje bulguları ve çıkarımları paylaşılmıştır.

Proje süresince kullanılan teknikler, analizler ve karşılaşılan problemler konusunda bizlere yardımcı olan sayın Yrd. Doç. Dr. Hadi M. Zareie, Yrd. Doç. Dr. Gülistan Meşe ve Prof. Dr. Safiye Neşe Atabey'e, ek olarak İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Malzeme Araştırma Merkezi personeline verdikleri akademik ve teknik desteklerden dolayı teşekkür ederiz.

ÖNSÖZ	1
İÇİNDEKİLER	2
ŞEKİL LİSTESİ	4
ÖZET	7
ABSTRACT	9
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Mekanik sinyallerin yaşamsal önemi	3
2.2 Kanser hastalıkları ve mekanik sinyaller	3
2.3 Kanser hücrelerinin biyomekanik özellikleri	4
2.4 Kanser hücrelerinin hücre dışı ortamla ilişkisi	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	9
3.1 Hücre kültürü	9
3.2 Mekanik sinyallerin uygulanması	9
3.3 Hücre analizi yöntemleri	11
3.3.1 Hücre sayısı ve canlılığının belirlenmesi	11
3.3.2 Hücre döngüsünün analizi	11
3.3.3 Hücre apoptoz analizi	12
3.3.4 Hücre altyapısının görüntülenmesi	13
3.3.5 Hücre yara kapanması analizi	13
3.4 Veri analizi ve istatistikler	14
4. BULGULAR	14
4.1 Mekanik titreşim oluşturabilen bir platformun faaliyete alınması	14



4.2 Mekanik titreşimlerin kontrol meme epitel (MCF10a) hücrelerine etkisi	16
4.3 Mekanik titreşimlerin agresif tip meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerine etkisi	17
4.3.1 Hücre büyüme ve canlılıkları	18
4.3.2 Hücrelerin kültür plastiğinden ayrılmaları	18
4.3.3 Mekanik sinyallerin hücre döngüsüne etkisi.....	19
4.3.4 Mekanik sinyallerin apoptoza etkisi	20
4.3.5 Mekanik sinyallerin kısa dönemde hücre morfolojisi üzerine etkisi	21
4.3.6 Mekanik sinyallerin hücre hareketliliği üzerine etkisi.....	22
4.4 Mekanik titreşimlerin atıl tip meme kanseri (MCF7) hücrelerine etkisi.....	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR	30



ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Kanser hücreleri normal hücrelere göre daha yumuşaklardır. Şekilde meme hücrelerinde normal (MCF10), kanserli (fakat metastazik olmayan (MCF7) ve metastazik (Mod MCF7) olma durumunda yumuşaklığın nasıl arttığı gösterilmiştir (Suresh, 2007). 6
- Şekil 2. Meme kanseri modelinde sırasıyla kontrol hücreleri (a), kanser hücreleri (b) ve metastaz potansiyeli çok yüksek modifiye kanser hücreleri (c). Kanserleşme ve artan metastaz potansiyeli hücrelerin çevreleriyle ve birbirleriyle olan mekanik kuvvet etkileşimlerini azaltmaktadır (g-i) (Tambe vd., 2011). 8
- Şekil 3. Proje kapsamında üretilen mekanik titreşim cihazının çalışan komponentlerini gösteren akış şeması. 10
- Şekil 4. Mekanik titreşim cihazının bileşenleri. 10
- Şekil 5. Örnek bir PI akış sitometrisi deneyi. Çalışılacak uygun hücre popülasyonu belirlendikten sonra hücrelerin PI siyaline göre 2n, 4n ve sentez evrelerinde olduklarının belirlenmesi. 12
- Şekil 6. Yara kapanma deneyi için örnek fotoğraflar. İki gruplar halinde kullanılan deneylerde çizik anında ve 24 saat sonraki çizik durumu gösterilmektedir. Aşağıya doğru indikçe artan hücre yoğunluğu deneysel gün sayısının artmasından kaynaklanmaktadır. 14
- Şekil 7. Mekanik titreşim sinyalleri. Tasarımı tamamlanan mekanik titreşim cihazının ivmemetre ile ölçülen sinyal çıktıları. Testler sinyal jeneratöründen 90 Hz çıkışta yapılmıştır. Üst panel Zaman-ivmemetre voltajı grafiği, voltajın tepe tepe mesafesi 0.15g ye karşılık gelmektedir. Alt panel Ölçülen sinyalin frekans çıktısı, beklendiği gibi 90 Hz seviyesinde bir tepe oluşturmuştur. 50Hz civarında görülen sinyal şehir elektrik şebekesinin yarattığı elektromanyetik alandan kaynaklı olup mekanik bir anlam taşımamaktadır. 15
- Şekil 8. Mekanik titreşimlerin tekrarlanabilirliği. Üç farklı zamanda kaydedilen 1 saniyelik süreçler, mekanik titreşimde deney süresince herhangi bir frekans ya da genlik değişimi olmadığını göstermektedir. 16
- Şekil 9. Mekanik titreşimlerin MCF10a meme epitel hücre canlılıkları üzerine etkisinin MTT yöntemiyle araştırılması. *: $p < 0.05$ 17
- Şekil 10. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin a) Trypan blue ile sayılması, b) MTT ile canlılık testlerinin farklı günler için yapılması *: $p < 0.05$ 18



Şekil 11. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin plastikten ayrılma sayılarının Trypan blue yöntemi ile belirlenmesi. *: $p<0.05$	19
Şekil 12. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin hücre döngüsündeki oranlarının PI yöntemi ile belirlenmesi. a) G1, b) G2, c) S fazındaki hücreler. *: $p<0.05$	20
Şekil 13. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin sağlıklı apoptotik ve nekrotik/ölü hücre oranlarının Annexin V - PI yöntemi ile belirlenmesi. a) Örnek bir deney için hücre dağılımı ve hücre statüsünün kategorizasyonu, b) Ölü (nekrotik) hücre oranları, c) Sağlıklı hücre oranları, d) Apoptotik hücre oranları. *: $p<0.05$	21
Şekil 14. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin morfolojisinin phalloidin boyaması ile incelenmesi a ve b) kontrol ve titreşim hücrelerine ait örnek mikroskop görüntüsü, c) aktin sinyal şiddeti, d) hücre alanı, e) hücre yuvarlaklığı. *: $p<0.05$	22
Şekil 15. Mekanik titreşimlerin büyüme besiyerindeki hücrelerin yara kapanmasına etkisi.	23
Şekil 16. MCF7 atıl tip meme kanseri ve MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücreleri arasındaki morfolojik ve üreme hızı farkları C: MCF7, D: MDA-MB-231. Kültür başlangıç sayısı 5000 hücre. İç panelde yansıtılan resimlerde kırmızı: phalloidin, mavi: DAPI çekirdek boyasına karşılık gelmektedir.	24
Şekil 17. Mekanik titreşim uygulanan MCF7 atıl tip meme kanseri hücrelerinin farklı günler için kültürde bulunma sayılarının Trypan Blue yöntemi ile sayılması. Kültür başlangıç sayısı 5000 hücre. *: $p<0.05$	25
Şekil 18. Mekanik titreşim uygulanan MCF7 atıl tip meme kanseri hücrelerinin farklı günler için a) MTT ile canlılıklarının, ve Annexin-V deneyi ile popülasyondaki b)ölü hücre, c) sağlıklı hücre ve d) apoptotik hücre oranlarının belirlenmesi *: $p<0.05$	25
Şekil 19. Mekanik titreşimlere maruz kalan MCF7 meme kanseri hücrelerinin hücre döngüsündeki oranlarının PI yöntemi ile belirlenmesi. a) G1, b) G2, c) S fazındaki hücreler. *: $p<0.05$	26
Şekil 20. Mekanik titreşimlere maruz kalan MCF7 meme kanseri hücrelerinin morfolojisinin phalloidin boyaması ile birinci ve beşinci günün sonunda incelenmesi, a) aktin sinyal şiddeti, b) hücre yuvarlaklığı. *: $p<0.05$	27



Her geçen gün artan epidemiyolojik bulgular fiziksel egzersizin kanser üzerinde, özellikle meme, prostat ve kolon kanserlerinde önleyici bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Varolan bulgulara rağmen kanser ve fiziksel egzersiz arasındaki etkileşimin biyolojik mekanizması hücre kültürü ve hayvan deneyleriyle ortaya çıkarılamamıştır. Tıbbi literatür egzersizin kanser üzerindeki önleyici etkisini sistemler bazında oluşan bağışıklık, metabolik aktivite, dolaşımdaki hormonlar ve vücuttaki yağ oranları ile açıklamaya çalışmaktadır. Buna rağmen, mekanik kuvvetlerin sağlıklı hücreler üzerindeki düzenleyici etkisi düşünüldüğünde bu etkilerin kanserli hücreler üzerinde de etkin olabileceğinden şüphelenilmektedir. Mekanik kuvvetleri kanser hücrelerinin üreme ve organizasyon özelliklerini kontrol etmek için kullanma düşüncesi alternatifleri göz önüne alındığında (örneğin kemoterapi, ışın tedavisi) yan etkilerinin yokluğu ve sinyallerin doğallığı sebebiyle oldukça avantajlıdır. Bu konuda yeterli bilimsel çalışma olmamakla beraber aynı zamanda kanser dokusu (tümör) mikroçevresi düşünüldüğünde bazı engeller ortaya çıkmaktadır. Tümörde hücre dışı matrisi sağlıklı dokulara göre daha sertken, kanser hücreleri bozulan altyapısal özellikleri sebebiyle sağlıklı hücrelere göre çok daha yumuşaktır. Bu yüzden tümör dokularında oluşan kuvvetler “stress shielding” adı verilen prensip sebebiyle hücreleri değil daha sert olan hücre dışı matrisin yüklenmesini sağlarlar. Önerilen projede bu durumun önüne geçilmek için kanser hücreleri matriste oluşan kuvvetlerden bağımsız ve Newton prensipleriyle, yani ivmelenen kütlede oluşan kuvvetler sayesinde yüklenmeye maruz bırakılacaktır. Mekanik titreşimler aracılığı ile iletilecek bu kuvvetler daha önceki çalışmalarda gösterildiği üzere sağlıklı kemik, kas ve tendon gelişimini etkilediği bilinmektedir. Ayrıca titreşime dayalı bu tarz mekanik kuvvetler kemik iliğindeki kök hücre karar mekanizmalarını etkileyerek onları yağdan ziyade kemik oluşumuna yönlendirmektedirler. Bu projede genel olarak kanser hücrelerinin, özelde ise meme kanseri hücrelerinin dışarıdan girilen mekanik titreşimlere duyarlı olacağı ve onlara tepki göstereceği hipotez edilmiştir. Bu hipotez hücrelerin üremesine, döngüsüne, ölümlerine, istilasına, altyapısına olan etkileri kontrollü deneyler sayesinde test edilmiştir. Sonuçlara göre mekanik titreşimler agresif tip meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 hücrelerini titreşim (0.1g, 90Hz, 15dk/gün, 5gün/hafta) uygulamasının ilk haftasından itibaren sayı ve canlılık olarak baskılamış, fakat bu baskılama kontrol olarak kullanılan MCF10A meme epitel hücrelerinde gözlemlenmemiştir. Mekanik titreşimler akış sitometrisi deneylerinden anlaşıldığı kadarıyla meme kanseri hücrelerinde kontrollü hücre ölümünden ziyade hücre döngüsüne etki etmiştir. Ayrıca titreşimler hücrelerdeki aktin miktarını arttırarak hücre yuvarlaklığını azaltmıştır. Mekanik titreşimler benzer bir etkiyi sakin tip MCF7 meme kanseri hücresinde de göstermiş, fakat bu etki hücre sayısı ve canlılığını bu hücre grubu için



azaltmamıştır. Projede gösterilen konseptin optimize edilerek farklı kanser tiplerinde de gösterilmesi halinde kanser hastalığının tedavisine yönelik destekleyici nitelikte bir biyomedikal teknolojinin geliştirilmesi olasıdır.

Anahtar Kelimeler: Mekanik sinyal, Meme Kanseri, Hücre iskeleti, Fiziksel Egzersiz.



ABSTRACT

There is an accumulating body of epidemiological evidence that physical exercise may be preventive for different types of cancer, especially mammary, colon and prostate cancers. This body of evidence however is poorly supported by cell culture or animal experiments, and there is no known biological mechanism for the interaction between cancer cells and physical loads. Medical literature mostly concentrates on the systemic effects of exercise, such as the ones on metabolism, adipocyte content, circulating hormones and increased immune defense. However it is known that mechanical loads can regulate the form and the function of healthy cells and it is expected that they should wield an important effect on cancerous cells as well. The possibility that direct mechanical loads would regulate cancer cell phenotype to an extent and suppress disorganized and proliferative behavior seems plausible since alternative regulation methods, chemotherapy and radiotherapy, is both costly and has serious side effects. However, the mechanical environment of tumor tissue is altered in a way that extracellular matrix is stiffer and the cells are softer compared to healthy tissues. In such an environment, for matrix loads (either induced by tension or shear) extracellular matrix would carry a higher share of loads while the cancer cells carry lower, an effect called “stress shielding”. However, mechanical loads can also be delivered to cancer cells through repetitive signaling cycles based on Newton’s principle that accelerating bodies experience force related to their mass and the magnitude of acceleration. Based on this principle mechanical vibrations were shown to be effective and anabolic in healthy tissue, inducing bone, muscle and tendon growth. Furthermore mechanical vibrations affect mesenchymal stem cells in the bone marrow and alter their decision making to commit to either bone or fat lineage. Here in this project, we are hypothesizing that cancer cells in general, breast cancer cells in specific will respond to external mechanical vibrations. We tested this hypothesis through a set of controlled experiments by characterizing cell proliferation, cell cycle, apoptosis, cell ultrastructure and cell migration. Compared to sham controls, daily application (0.1g, 90Hz, 15m/day, 5days/week) of Low Magnitude Mechanical Stimulation (LMMS) reduced the number and viability of aggressive MDA-MB-231 cancer cells significantly after first week in the culture, while non-cancerous MCF10A cells were found to be unaffected. Flow cytometry analyses suggested that the observed decrease for the number of cancer cells in the LMMS group was due to a cell cycle arrest rather than apoptosis. LMMS further reduced cancer cell circularity and increased cytoskeletal actin in MDA-MB-231 cells. Similar effects of LMMS in cell morphology and cycle were also observed in non-aggressive breast cancer type MCF7, except the reduction in cell number and viability after the first week. Once optimized for breast cancer cells and other cell types, daily application of low magnitude mechanical signals can be



translated into a biomedical device that can be used as a complementary tool for cancer treatment.

Key words: Mechanical Signals, Breast Cancer, Cytoskeleton, Physical Exercise

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization – WHO), 2008 yılında dünya çapında gerçekleşen ölümlerin %13'ünün (7.6 milyon insan) kanser (malignant neoplasm) sebebiyle olduğunu belirtmiştir. Bu sayının 2030 yılına kadar senede 11 milyon insanın üzerine çıkacağını öngören WHO, kanserin oluşma sebepleri arasında önemli faktörler olarak yaşlanma ve fiziksel hareketsizliği de kabul etmiştir. Kanser tiplerinin yayılma şekli herhangi bir dokudaki bir (veya bir grup) hücrenin çevresel ve/veya genetik etkilerle kontrolsüz olarak üremesi ve böylece hem buldukları organın fonksiyonlarını etkilemeleri hem de vücudun diğer bölgelerinde metastaz oluşturmaları prensibine dayanır. Topluma ve bireye ağır yaptırımları olan bu hastalığın önlenmesi ve tedavisi konusu önemli bir biyomedikal problem olmakla beraber, bu konudaki bilimsel ilerlemenin çoğunluğu günümüzde disiplinlerarası çalışmalarla mümkün olmaktadır.

Tipinden bağımsız olarak kanser doğası itibariyle her çeşit organ ve dokuyu hedef alabilir ve bahsi geçen organın fonksiyonlarına zarar verebilir. Daha da önemlisi kanser hücreleri buldukları dokudan kan veya lenf dolaşımını kullanarak uzaktaki diğer organlara yayılabilir. Yüksek verimlilikle çoğalabilen kanser hücrelerinin aynı zamanda büyümeyi engelleyen parakrin ve endokrin salgılara tepkisiz kalışları, bağışıklık sistemine yakalanmamaları ve ölümsüz olmaları, kanserli hücrelerin tedavi araştırmalarını genel bir çözümden uzaklaştırarak onları organa, dokuya ve hatta kanser tipine yönelik olabilecek derecede özelleşmeye zorlamıştır. Bu tip araştırmalar önce kanserli hücreyi tanımlama, daha sonra da hedefleme prensibine dayanır ve tabiatları gereği yüksek maliyete sahiplerdir. Buna rağmen, tedavi sırasında tek bir kanser hücrenin hayatta kalması bile hastalığın tekrarına (recurrence) sebep olabilir ve hastaya özel oluşabilecek genetik ve epigenetik faktörlerle birleştiğinde bu durum tedavi yöntemlerini kesin başarıdan uzaklaştırır.

Günümüzde, kanserle mücadele için hücresel hedeflemeden ziyade geniş alandaki tüm hücreleri etkileyen ve hızlı hücre bölünmesini engelleyebilecek dış faktörler, örneğin kimyasal tedavisi (chemotherapy) ya da ışın tedavisi (radiotherapy) uygulamaları kullanılmaktadır. Bu uygulamalar her ne kadar kanser hücrelerinin üremesini engelliyorsa da, sahip oldukları yan etkiler sebebiyle hastalarda önemli komplikasyonlara yol açmaktadırlar. Bu komplikasyonların en önemlileri bağışıklık sistemi baskılanması ve sindirim ile ilgili olanlardır ve bu rahatsızlıklar kemik iliğindeki kan hücrelerinin ve bağırsaklardaki endotel hücrelerinin de hızlı üredikleri için tedaviden zarar görmeleri sebebiyle oluşur. Yan etkilerine rağmen bu tedavi türleri dünyada ve Türkiye'de alternatif yöntemlerin eksikliğinden dolayı yaygın olarak uygulanmaktadır.



Bir çok bilinen çevresel sebebi olan kanser ile savaşta önerilen yaşam tarzı alternatiflerinden biri de insanın rutin fiziksel egzersiz yapmasıdır. Fiziksel, biyomekanik kuvvetler insan organ-doku ve hücrelerini etkileyerek onları, özellikle kas-iskelet sistemindeki hücreleri, adapte olmaya zorlar. Dışarıdan ekstra fiziksel kuvvet girdisinin kansere ne tarz bir etki ettiği sorusunu sormadan önce normalde hücrelerin maruz kaldıkları fiziksel kuvvetleri anlamak gerekir. Temelde insan vücudunu oluşturan bütün hücreler, vücudun en atıl halinden en aktif haline kadar düzenli olarak mekanik kuvvetlerin etkisi altında kalırlar. Bunun en büyük sebeplerinden birisi bulunduğumuz gezegenin üzerimize uyguladığı kütle çekimidir. Ayrıca hücreler buldukları organın fonksiyonlarına göre tekrarlı ya da ani kuvvetlere maruz kalabilirler. Örneğin nefes alıp verme akciğer ve diyafram hücrelerinde direk kuvvetlere sebep olurken bu kuvvetler dolaylı olarak karaciğer, pankreas ve dalak gibi organları da etkiler. Yürüme veya koşma fonksiyonları sırasında kemik, kas, tendon, ligamen ve kıkırdak hücrelerinin yanı sıra sinir hücreleri ve kemik iliğindeki bağışıklık hücreleri de mekanik kuvvetlerin etkisi altında kalır. Bu yüzden sahip olduğumuz her hücre bulunduğu doku itibarıyla oluşan kuvvet profillerine yaşam süresince adapte olurlar (Ozcivici vd., 2010a; Ozcivici, 2013; Edwards ve Reilly, 2015).

Hücreler dışarıdan gelen kuvvetleri hücre dışı matrise olan bağlantıları sayesinde algırlar. Integrinler tarafından kurulan bu bağlantılar sayesinde mekanik kuvvetler vinculin ve aktin molekülleriyle hücre içerisinde yayılır ve çeşitli düzenleyici sinyal mekanizmalarını aktive eder. Ayrıca hücreler çevrelerindeki akışkanların oluşturduğu kesme gerilmesi (shear stress) ve genel anlamda ivmelenmeye (acceleration-deceleration) de tepki gösterirler. Sağlıklı hücreler genelde anlatılan biyomekanik kuvvetlerin kombinasyonlarına adapte olurlarken, kanser hücrelerinin ise hangi mekanik kuvvetlere adapte olduğu çok net değildir. Kanser hücreleri altyapıları (cellular ultrastructure) itibarıyla sağlıklı hücrelere oranla düzenlilikten daha uzak ve bu nedenle mekanik olarak daha yumuşaklardır. Ayrıca tümör dokusunun hücre dışı matrisi sağlıklı dokulara göre daha serttir. Bu yüzden hücre dışı matris tarafından oluşturulan biyomekanik kuvvet profillerinin kanser hücrelerinde sağlıklı hücreler gibi algılanmaları mümkün gözükmemektedir. Hücrelere dışarıdan etkiyen kuvvetlerin fizyolojik seviyenin altında kaldığı bu gibi durumlarda eksikliği gözlenen kuvvetlerin dışarıdan girilen tekrarlı kuvvetlerle kompanse edilebilmesinin mümkünlüğü şu ana kadar literatürde cevaplanmamıştır.

Bu projede kapsam olarak kanser hücrelerinin doku tipine bağlı özelliklerinden ziyade, bu tip hücrelerin fizyolojik kuvvetlerin üzerine çıkan tekrarlı biyomekanik kuvvetlere nasıl adapte oldukları üzerine olmuştur. Dayanak noktası olarak kanser hücrelerinin dokudaki sağlıklı kontollere göre mekanik olarak daha yumuşak olduğu prensibini kabul eden bu projede, kanser hücrelerinin normalleştirilmiş mekanik kuvvetlere maruz bırakıldıklarında verecekleri



tepkilerin in vitro kontrollü deneylerle hücrenel, altyapısal ve moleküler bazda karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu hedefe ulaşılmasında seçilen kanser tipi meme kanseri olup, bunun meme dokusunun bulunduğu bölge ve yağ kompozisyonu itibariyle dışarıdan gelen mekanik kuvvetlere daha kapalı oluşudur. Örneğin osteosarkoma hücreleri hareket sırasında oluşan tekrarlı yüklere, küçük hücreli akciğer kanseri nefes alıp verme mekaniğine adapte olmuş olabileceklerinden bu tarz bir önçalışmanın kabullerini karmaşıklaştıracaktır. Projenin uzun vadeli hedefi fiziksel egzersizin ilaç ya da radyasyon uygulamalarına alternatif ya da tamamlayıcı şekilde, kanser tedavisi için bir faktör olarak geliştirilebilme potansiyeli olarak düşünülmüştür. Proje sonuçları bu hedefin meme kanseri hücreleri için algılanabilir ve optimize edilebilir olduğunu göstermektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mekanik sinyallerin yaşamsal önemi

Dışarıdan alınan mekanik sinyalleri algılama ve onlara tepki verme eylemleri, bakteri (Kruse ve Julicher, 2005), maya (Zhou vd., 2003) ve bitki (Neel ve Harris, 1971; Johnson vd., 1998) hücreleri dahil olmak üzere, yeryüzündeki bütün hücrelerin ortak noktalarından biridir. Bu genel özellik memeli hücrelerinde de iyi korunmuş olup bir organizmanın gelişiminden itibaren mekanik kuvvetler organ sistemlerinin bakımı (maintenance) ve tamiri (repair) sırasında önemli roller oynarlar (Ingber, 2005; Orr vd., 2006). Örneğin, biyomekanik kuvvetler sayesinde damar, kalp ve akciğer gibi dokuların şekilleri ve fizyolojik fonksiyonlarını önemli ölçüde belirler (Orr vd., 2006; Yashiro vd., 2007; Hahn ve Schwartz, 2009). Hücre iskeletinin (cytoskeleton) şeklini ve bileşenlerinin kalınlığını etkileyen bu kuvvetler aynı zamanda hücrelere yön de verir (Yoshigi vd., 2005). Biyomekanik kuvvetlerin azaldığı ya da ortadan kalktığı yatalıklık, felç, yerçekimsiz ortam ve yaşlılık gibi durumlarda ise hücrenel bazda azalan kuvvet yüklerinin, bütün memeli hücrelerini metabolizmadan organizasyona, hareketlilikten başkalaşmaya kadar bütün form ve fonksiyon özelliklerini negatif yönde etkilediği bilinmektedir (Meloni vd., 2004; Meloni vd., 2006; Meloni vd., 2011; Pietsch vd., 2011; Wu vd., 2011; Ozcivici, 2013).

2.2 Kanser hastalıkları ve mekanik sinyaller

Kanserle savaşta otorite sahibi kurumlar toplum sağlığı açısından riskli faktörlerden kaçınılması gerektiğini düzenli olarak bireylere duyururlar (Örneğin World Health



Organization, T.C. Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Daire Başkanlığı, vb.). Tütün kullanımı, şişmanlık, beslenme bozuklukları ve iş güvenliği yetersizliği kadar fiziksel hareket eksikliği de kansere sebep olan faktörlerden birisi olarak görülmektedir (Anand vd., 2008). Fiziksel aktivite ve kanser arasındaki ilişki ilk olarak 1945 yılında düşünülmüş olmakla beraber (Morris, 1945), bugün gelinen noktada günlük egzersizin kolon ve meme kanserini ikna edici bir şekilde; prostat, endometriyum ve akciğer kanserlerini ise büyük olasılıkla engellediği bilinmektedir (Friedenreich ve Orenstein, 2002; Inoue ve Grp, 2010; Lee vd., 2011; Moorman vd., 2011). Egzersizle azalan kanser riski arasında her geçen gün artan epidemiyolojik bağlantıya rağmen kesinleşmiş bir biyolojik mekanizma henüz bulunmamaktadır. Çok limitli olarak gerçekleştirilen hayvan deneyleri doku ve kanser tiplerinin yoğunluğu sebebiyle genel bir resim çizmekten hali hazırda çok uzaktır (Gillette vd., 1997; Colbert vd., 2009; Murphy vd., 2011). Tıbbi literatürün üzerinde durulan mekanizmalar sistemler bazında olup, egzersizin dolaşımdaki hormon miktarlarını değiştirmesi, vücut yağlılığını azaltması ve bağışıklık sistemini güçlendirmesi olarak özetlenebilir (Friedenreich ve Orenstein, 2002; Winzer vd., 2011). Bu projede, sistemler bazında önerilen mekanizmalar kabul edilmekle beraber, buna ek olarak egzersiz sırasında oluşan mekanik kuvvetlerin dokusal ve hücrel etkiler de yarattığı ve bu etkilerin kanser hücrelerinin üremelerini kontrol etmede anlamlı sonuçları olabileceği üzerinde durulmuştur.

2.3 Kanser hücrelerinin biyomekanik özellikleri

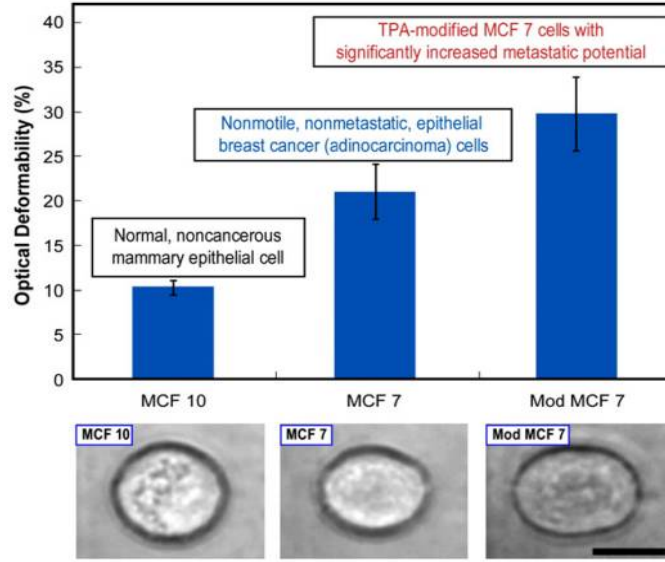
Kanser hücreleri, tüm hücrelerde bulunan biyomekanik kuvvetlerin algılanması (mechanosensitivity) ve bu kuvvetlere tepki gösterilmesi (mechanoresponse) özelliklerinden bağımsız değişimlerdir. Örneğin sıvı akışıyla oluşturulan kesme gerilmelerinin kolon kanseri hücrelerinin üremelerini döngünün G1 fazında durdurarak engellediği gösterilmiştir (Avvisato vd., 2007). Ek olarak melanoma hücreleri mekanik kuvvetler sayesinde hücre iskeletlerini değiştirerek, hücre şeklini ve yönünü ve aynı zamanda endotel hücrelere olan tutunma (dolaşıma katılmama) özelliklerini anlamlı bir şekilde değiştirerek statik kontrollere göre farklılıklar gösterir (Chotard-Ghodsniya vd., 2007). Düşük şiddette ultrason ile mekanik tahrikleme insan lösemi hücrelerinde programlanmış hücre ölümüne neden olmakta ve hücre gen ifade profillerini de değiştirmektedir (Tabuchi vd., 2007). Biyomekanik kuvvetlerin varlıkları kadar yoklukları da kanser hücrelerini etkiler. Örneğin, yerçekimsiz ortamın kanser hücrelerinde önemli metabolik değişimlere yol açtığı (Coinu vd., 2006), hücre altyapısını ve üreme döngüsünü etkilediği (Vassy vd., 2001) ve kanser hücrelerinde programlı hücre ölümüne direnç geliştirme ve metastaz yatkınlığına yol açtığı (Infanger vd., 2006) gösterilmiştir. Bunlara ek olarak yerçekimsiz ortamda bırakılan melanoma hücreleri fare deri

altlarına aktarıldıklarında, normal kütle çekiminde bırakılan kontrollere göre çok daha büyük tümörler oluşturup daha fazla yayılma potansiyeli göstermişlerdir (Taga vd., 2006). Kanser hücrelerinin biyomekanik kuvvetlere (veya onların yokluğuna) gösterdikleri tepki literatürde sağlıklı hücrelerin tepkileri oranında araştırılmamıştır. Bu eksikliğe rağmen, varolan veriler biyomekanik kuvvetlerin kanser hücreleri üzerinde de belirli regülasyonlara sahip olabileceğini göstermektedir. Raporlanan bu projede, kanser hücrelerinin normal fizyolojik biyomekanik kuvvetlerden ziyade, egzersiz simülasyonu sırasında oluşabilecek kuvvetlere olan tepkileri test edilmiştir.

Memeli dokularına ait olan hücreler verili herhangi bir zaman için üç farklı biyomekanik kuvvet oluşumunun kombinasyonuna maruz kalırlar: **1)** Kütle çekimi ve kasılmalar yüzünden oluşan tepki kuvvetleri; **2)** Sıvı akışının yarattığı (örneğin kan dolaşımı) kesme (shear) kuvvetleri; **3)** Hareket (ivmelenme) sayesinde Newton prensiplerine göre oluşan kuvvetler. Bu kuvvetlerden sadece sonuncusu tüm hücreleri direkt olarak etkilerken (hücreye ait tüm organellerin hareketi sayesinde), ilk ikisinin doğurduğu kuvvetler hücre dışı matris (extracellular matrix – ECM) ya da diğer hücrelerle olan bağlantılar aracılığı ile dokudaki bulunan hücrelere iletilir. Normal şartlarda ECM hücre aktin altyapısına aracı proteinler (integrin) sayesinde bağlanarak hem hücreye kuvvet iletimini düzenler ve hücrede gerekli sinyal yollarının çalışmasını sağlar, hem de hücrenin stabil bir şekilde tutunabileceği bir ortam yaratır (Brabek vd., 2010). ECM yapısının mekanik sertliği içinde bulunan hücrelerin fonksiyonlarını etkilediği gibi, aynı zamanda hücrelerin, ECM'e daha çok bağlanmaları için teşvik eder (Discher vd., 2005; Peyton vd., 2008; Ulrich vd., 2009).

Kanser hücrelerinin biyomekaniği söz konusu olduğunda hücre-ECM mikroçevresi sağlıklı dokulara göre önemli farklılıklar gösterir. Kanser hücreleri sağlıklı hücrelere göre net bir şekilde daha yumuşak (compliant), tümör dokusundaki ECM ise daha serttir (stiff) (Paszek vd., 2005; Suresh, 2007; Brabek vd., 2010). Tümördeki ECM sertliği onkologların kanser teşhisi için önemli belirtilerden biri olarak kullanılmakla beraber, bu sertliğin oluşma mekanizması dokuda artan kolojen bağları ile açıklanmaktadır (Huang ve Ingber, 2005; Brabek vd., 2010). Bunun yanında çoğu kanser tipinde hücreler (örneğin: meme (Guck vd., 2005), mesane (Lekka vd., 1999), pankreas ve akciğer (Cross vd., 2011), lösemi ve lenfoma (Chen vd., 2004; Lam vd., 2007) ve kanserleşmiş fibroblastlar (Park vd., 2005), sağlıklı hücrelere göre mekanik olarak daha yumuşaklardır. Meme kanseri hücrelerinde artan yumuşaklık metastaz potansiyeli ile pozitif korelasyon gösterir, yani bir kanser hücresi ne kadar yumuşaksa aynı zamanda yayılma için o denli tehlikelidir (Suresh, 2007; Swaminathan vd., 2011) (**Şekil 1**). Genel anlamda kanser hücrelerinin yumuşama sebebi olarak kanser sırasında değişen aktin altyapısı ve modellenmesi kabul edilmektedir (Guck vd., 2005; Suresh, 2007). Hücrede yük taşıma vazifesi de gören aktin iplikçiklerinin yapılarındaki

bozulma hücrelerin üreme, hareket ve yeni damar oluşturabilme özelliklerini etkiledikleri görülmüştür (Rao ve Li, 2004; Lu vd., 2005). Buna rağmen çeşitli mekanik testler aracılığı ile normal hücrelere göre mekanik yumuşaklıkları (compliance) gösterilen kanser hücrelerinin neden kendilerine daha sert bir ECM dokuları oluşturduklarının cevabı henüz bilimsel literatürde netleşmemiştir.



Şekil 1. Kanser hücreleri normal hücrelere göre daha yumuşaklardır. Şekilde meme hücrelerinde normal (MCF10), kanserli (fakat metastazik olmayan (MCF7) ve metastazik (Mod MCF7) olma durumunda yumuşaklığın nasıl arttığı gösterilmiştir (Suresh, 2007).

2.4 Kanser hücrelerinin hücre dışı ortamla ilişkisi

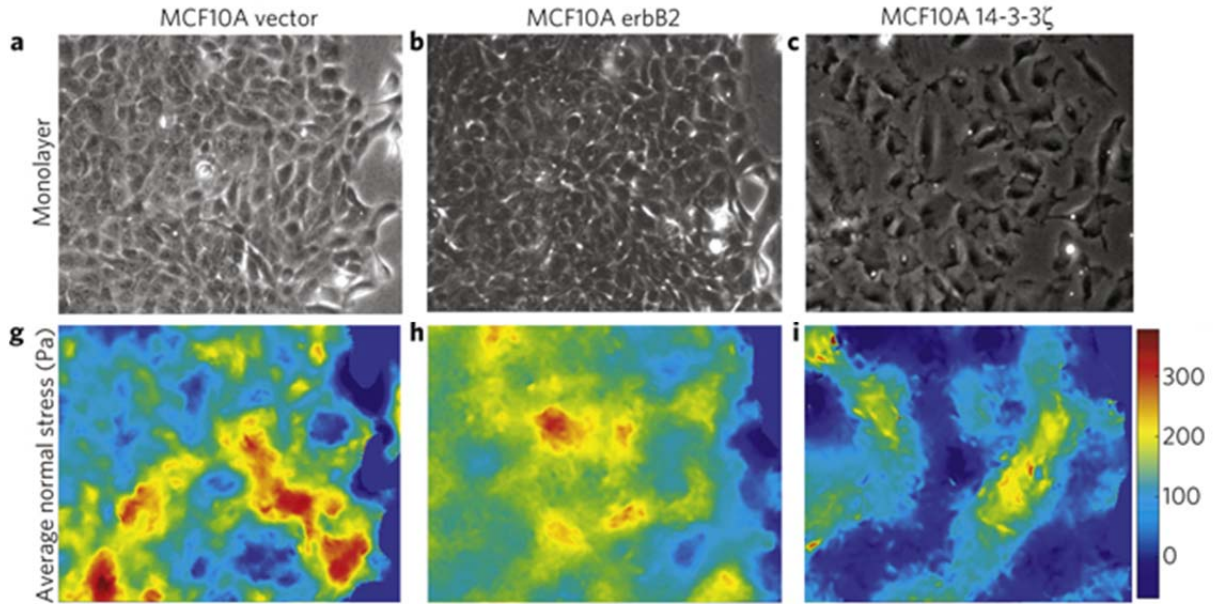
Her ne kadar kanserde ECM özellikleri değişiyorsa da, kanser hücrelerinin yeni çevrelerine daha sıkı tutunduklarını söylemek güçtür. Aktin altyapısı zaten zarara uğramış olan kanser hücrelerinde (örneğin meme kanseri sırasında) hücre-ECM bağlantılarının gerçekleştirildiği integrin moleküllerinin ifadesinde ve miktarında anlamlı değişimler ve integrin organizasyonlarının bozulması gözlemlenmiştir (Mizejewski, 1999; Hood ve Cheresch, 2002; Guo ve Giancotti, 2004; Rathinam ve Alahari, 2010). Özellikle $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha V\beta 3$ integrinlerinin miktarca azaldığı (Zutter vd., 1990) ve buna karşılık $\alpha 6\beta 4$ miktarının arttığı (Zutter vd., 1995) literatürde kaydedilmiştir. Mikroçevresinin sertleşmesine rağmen o mikroçevreye olan bağlantısı büyük ihtimalle değişmeyen (fakat potansiyel olarak integrin miktarındaki azalma dolayısıyla azalan) meme kanseri hücrelerinde bunun yanında normalin çok üzerinde focal adhesion kinase (FAK) ifadesi ve aktivasyonu gözlemlenir ki, bu tümör hücrelerinin her an hareket etmeye hazır olduklarının bir göstergesidir (Levental vd., 2009). Sadece hücre ECM arasında değil, tümör hücrelerinde hücre-hücre arasındaki bağlar da

olması gerekenden zayıftır, ve bu sayede kanser hücreleri birbirlerinden bağımsız olarak hareket edebilirler (Tambe vd., 2011). Kanser hücrelerinin çevrelerinin oluşturduğu mekanik kuvvetlere, yani kendilerini çevreleyen fiziksel yapılara duyarsızlaşmaları kontrolsüz büyümelerinde (çevrelerinde hücre yokmuşçasına) önemli etkenlerden biridir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bahsedilen bulgular, kanser hücrelerinin çevresel mekanik kuvvetleri (ECM ve diğer hücreler) algılamada ve mikroçevrelerinin farkında olma konusunda sağlıklı hücrelere göre daha az hassas olabileceklerini ortaya koymaktadır.

Kanser hücrelerinin direkt olarak uygulanan fizyolojik kuvvetlere in vitro tepki gösterdikleri düşünüldüğünde (yukarıdaki örnekler), bu kuvvetlerin dokuda da benzer etkilere yol açmaları (hücre üremesini, programlanmış ölüm, doku mimarisi, vs.) beklenmektedir. Fakat dokusal tepki kuvvetleri ve sıvıdan oluşan kesme kuvvetleri zaten patolojik dokularda bulunmalarına rağmen tümör oluşumunu engelleme gibi bir fonksiyonları yoktur. Bu yüzden tümör mikroçevresi bir biyomühendislik yapısı olarak düşünülürse, sistemde oluşan kuvvetler, sistemin sert elemanlarınca taşınırken yumuşak elemanları üzerine daha az yük binebileceği prensibi değer kazanmaktadır. Buna örnek oluşturabilecek bir sistem literatürde “stress shielding” olarak tanımlanan kemik-implant ilişkisidir (Cristofolini, 1997; Bush vd., 2006; Ryan vd., 2006). Bu sistemde kalça implantında kullanılan metal biyomalzeme, kemik dokusuna göre çok daha fazla katı olduğu için fizyolojik kuvvetleri üzerinden geçirir ve bu yüzden implantı çevreleyen kemik dokusu normalden az yüklendiği için erime (disuse osteoporosis) gösterir. Verili “stress shielding” modeli, ulaşılabildiği kadarıyla hiç bir bilimsel literatürde kanser hücresi – hücre dışı matris ilişkisinde bir model olarak kullanılmamıştır ve bu modele bağlı olarak hiç bir hipotez test edilmemiştir.

Kanser hücrelerinin fiziksel kuvvetlerle olan ilişkileri genel anlamda özetlenirse, kanser hücreleri bütün yapısal bozukluklarına ve fonksiyonel karakteristiklerine rağmen fiziksel kuvvetleri algılar bir portre çizmektedirler. In vitro çalışmalarda elde edilen bu bulgular patolojik dokudaki hücre dışı matrisin sertliği ve kanser hücrelerinin yumuşaklığı sebebiyle, belki de bu kuvvetlerin daha ilk etapta hücrelere iletilemediği şüphesini ortaya çıkmaktadır. Bu prensibe uygun olarak kanser hücreleri üzerine düşen net kuvvet (gerilme) miktarının sağlıklı hücrelere göre daha düşük olduğu 2011 yılında yayımlanan bir makalede (Tambe vd., 2011) gösterilmiştir (**Şekil 2**). Bu verilerle tamamlayıcı olarak fiziksel egzersiz modellerinde dokulardaki kuvvet dağılımlarının yanı sıra aynı zamanda ivmelenme sayesinde Newton prensipleri sebebiyle hücreler üzerinde (ve onlarına altyapılarında) oluşan direkt kuvvetlerin (Garman vd., 2007a; Garman vd., 2007b; Ozcivici vd., 2007) kanser konusunda engelleyici olduğu düşünülmektedir.

Raporlanan bu projede, kanser hücrelerinin dokudaki tepki ve/veya kesme kuvvetleri ile alması mümkün gözükmeyen biyomekanik kuvvetler hücrelere ivmelenme/hareket yoluyla iletilmiştir. Düşük genlikli fakat yüksek frekanslı mekanik titreşimlerin dışarıdan girdi olarak kullanıldığı projede, bu titreşimlerin meme kanseri hücrelerine olan etkileri araştırılmıştır. Dışarıdan girilen mekanik titreşimlerin beklenen düzenleyici etkilerinin proje kapsamında gerçekleşmesi durumunda, kanser araştırmalarında alternatif yöntemleri teşvik edecek ve geniş uygulama esneklikleri bulunan ve mekanik kuvvet iletimine dayanan bir biyomedikal cihaz geliştirilmesine katkıda bulunulacaktır.



Şekil 2. Meme kanseri modelinde sırasıyla kontrol hücreleri (a), kanser hücreleri (b) ve metastaz potansiyeli çok yüksek modifiye kanser hücreleri (c). Kanserleşme ve artan metastaz potansiyeli hücrelerin çevreleriyle ve birbirleriyle olan mekanik kuvvet etkileşimlerini azaltmaktadır (g-i) (Tambe vd., 2011).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

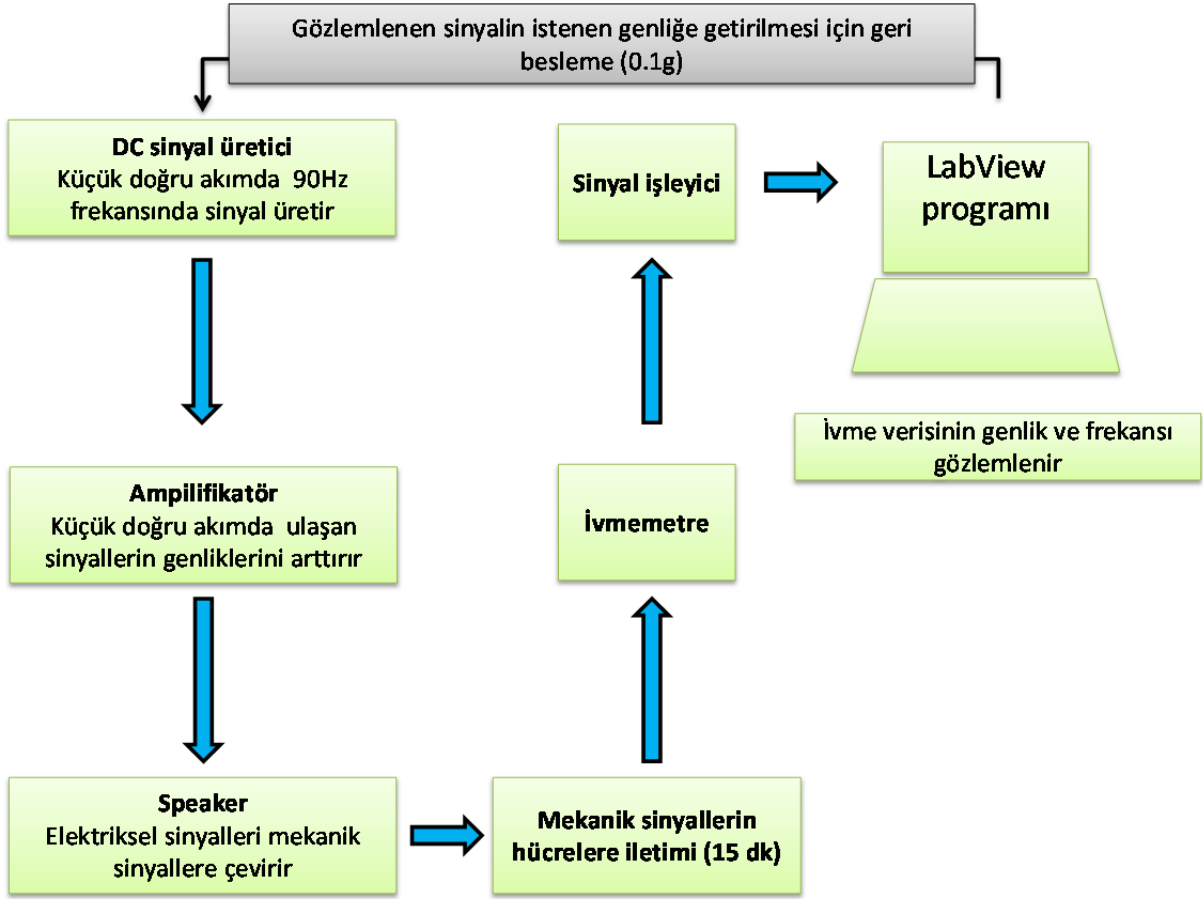
3.1 Hücre kültürü

Proje süresince kullanılan kontrol (MCF10a) ve meme kanseri hücre hatları (MCF7, MDA-MB-231) ATCC firmasından temin edilmiştir. MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerine uygulanan temel besiyeri (DMEM, 10%FBS, 1%PenStrep) şeklinde olup, MCF10a meme epitel doku hücreleri için hücre kültüründe DMEM:F12, 20ng/ml EGF, 0.5µg/ml hydrocortisone, 100ng/ml cholera toxin, 10µg/ml insulin, %1 Pen/Strep, %5 donor equine serum ve 2 mM L-glutamine kullanılmıştır.

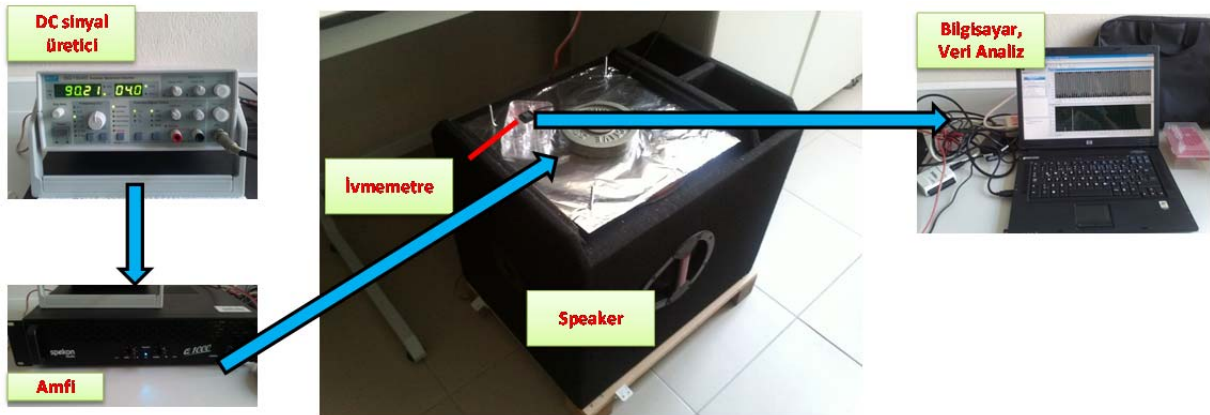
Hücreler mekanik titreşim uygulaması hariçinde sürekli olarak nemlendirilmiş standart hücre kültürü inkübatöründe saklanmıştır (37°C, %5 CO₂). Mekanik titreşim uygulaması oda şartlarında gerçekleşmiştir. Tüm deneyler için 24 kuyulu hücre kültürü plakaları kullanılmış ve başlangıçta her bir kuyuya 640 hücre/mm² yoğunluk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Tüm deneyler için hücre ekimi -2.inci gün olarak kabul edilmiş, hücreler 1.inci günden itibaren günlük mekanik titreşimlere maruz bırakılmışlardır.

3.2 Mekanik sinyallerin uygulanması

Hücrelere mekanik sinyaller sinüsoidal titreşimler üretebilen bir platform tarafından uygulanmıştır. Bu cihaz laboratuvarımızda üretilmiş olup, çalışma şartları ile ilgili veriler bulgular kısmında paylaşılmıştır. Cihaz birer adet sinyal jeneratörü (MULTIMETRIX), güç ampilifikatörü (SPEKON), ivmemetre (KISTLER), veri toplama kartı (NATIONAL INSTRUMENTS) ve de subwoofer hoparlör (WHARFEDALE) kompozisyonundan oluşmaktadır (**Şekil 3 ve 4**). Mekanik sinyal içeren tüm deneylerde hücrelere 15 dakika boyunca 90 Hz (1/s) ve 0.15g (1g=9.81m/s²) karakterinde fiziksel titreşim dalgaları uygulanmıştır.



Şekil 3. Proje kapsamında üretilen mekanik titreşim cihazının çalışan komponentlerini gösteren akış şeması.



Şekil 4. Mekanik titreşim cihazının bileşenleri.

3.3 Hücre analizi yöntemleri

3.3.1 Hücre sayısı ve canlılığının belirlenmesi

Hücre sayıları ve canlılıklarının belirlenmesi için deney protokolü sırasında seçilen günlerde deney sonlandırılmış, akabinde hücreler trypan blue boyaması ve MTT boyamasına maruz bırakılarak analiz edilmişlerdir.

Trypan blue boyası (%0.4) ile 1:1 oranında karıştırılan hücreler daha sonra Neubauer hemocytometer kullanılarak manuel olarak sayılmıştır. Trypan Blue ile boyanan hücrelerde canlı hücreler renksiz, ölü hücreler is mavi renkli bir görüntü kazanmaktadır.

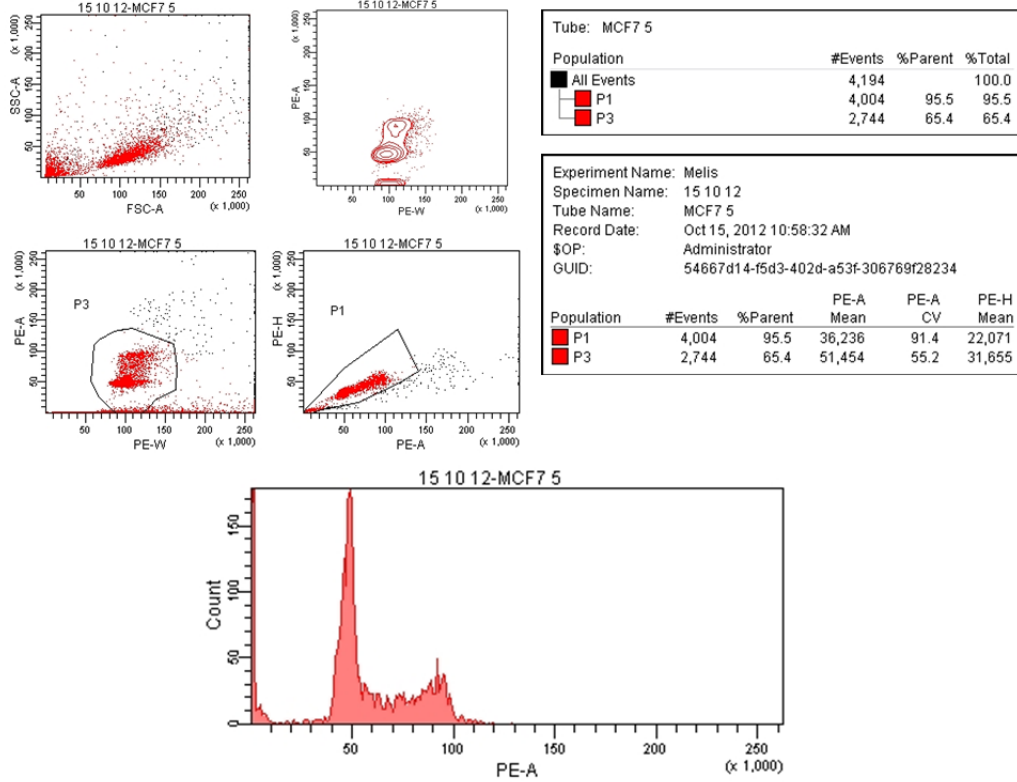
MTT deneyleri için hücreler 0.5mg/ml MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) ile 4 saat inkübe edilmiştir. Metabolik aktivite sonrası oluşan ve çöken tetrazolium tuzları DMSO ile çözüldükten sonra absorbans değerleri 570nm'de okunup, 650nm ortam ışması çıkarılarak değerlendirilmiştir.

Canlılık testi için ayrıca Calcein-AM boyası kullanılmış, boyayı alan canlı hücreler FACS Canto akış sitometrisi kullanılarak ölçülmüş ve bu ölçümler FACS Diva programı ile analiz edilmiştir.

3.3.2 Hücre döngüsünün analizi

Hücre döngüsünün ölçülebilmesi için hücre kültürü deneylerinin sonunda hücreler sabitlenerek hücre döngüsündeki yerleri akış sitometrisi (flow cytometry) yöntemiyle ölçülmüştür. Kısaca tarif etmek gerekirse, hücreler deney sonunda trypsin yardımıyla 15 ml santrifüj tüpüne toplanıp ve 1200 rpm de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Çöken hücreler, çevrelerindeki supernatant alındıktan sonra buz üzerine alınarak 1ml soğuk PBS ile çözülmüştür. Ardından 4ml soğuk etanol (EtOH) yavaşça hücrelere ilave edilmiş ve hücreler -20°C da bir geceden az, 30 günden çok olmayacak şekilde saklanmıştır. Ölçüm zamanı geldiğinde -20°C'de saklanan hücreler 1200 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra çöken hücreler 5ml PBS'de çözülmüş, ardından tekrar santrifüjlenip bu sefer 1 ml %0.1 triton-x100 içeren fosfat tamponunda çözülmüş ve hücrelerin geçirgenlikleri artırılmıştır. Ardından hücreler 100µl RNase A ile 30 dk 37°C'de bekletilmiştir. Son olarak ölçüm öncesi hücreler 100µl propidium iodide (PI) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra flow cytometry cihazı ile ölçümlere başlanmıştır. Boyut ve kompleksitesine göre FACS Diva programı ile analiz için seçilen hücre grubunun (**Şekil 5**) PI sinyal yoğunluğuna göre G1, S ve G2 fazındaki hücreler Modfit programı ile belirlenmiştir. Hücre döngüsü testlerinin

güvenilirliği açısından gerekli hücre sayısında 1,3 ve 5.inci günlerde ulaşılamadığı için bu testler ikinci haftadan itibaren uygulanmıştır.



Şekil 5. Örnek bir PI akış sitometrisi deneyi. Çalışılacak uygun hücre popülasyonu belirlendikten sonra hücrelerin PI sinyaline göre 2n, 4n ve sentez evrelerinde olduklarının belirlenmesi.

3.3.3 Hücre apoptoz analizi

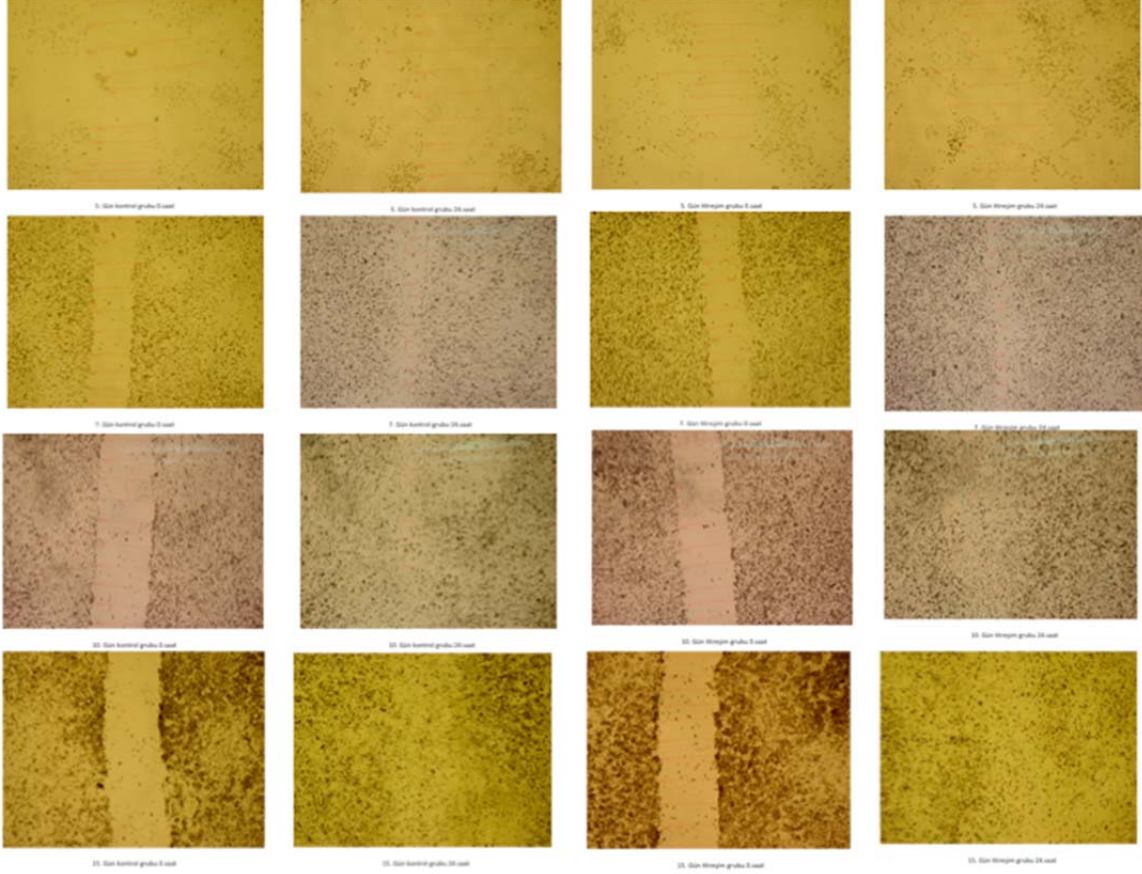
Günlük uygulanan mekanik titreşimlerin hücre ölümü üzerine potansiyel etkisi MDA-MB-231 hücreleri üzerinde test edilmiştir. Annexin V-PI yöntemi ile yapılan boyama sonrası hücreler belirli günlerde akış sitometrisi yöntemiyle sağlıklı, apoptotik ve nekrotik popülasyonlara ayrılmıştır. Kültür plastiklerinden toplanan hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra Annexin V (FITC) ve PI boya ile boyandıktan sonra FACS Canto akış sitometrisi kullanılarak sinyal şiddetleri ölçülmüş, bu ölçümler FACS Diva programı ile analiz edilmiştir. Apoptoz analizi testlerinin güvenilirliği açısından gerekli hücre sayısında 1,3 ve 5.inci günlerde ulaşılamadığı için bu testler ikinci haftadan itibaren uygulanmıştır.

3.3.4 Hücre altyapısının görüntülenmesi

Plastik yüzeyde büyütülen hücreler iki defa 1X PBS'le yıkandıktan sonra 1X PBS'te hazırlanmış ve akabinde %4 paraformaldehyde ile 20 dakika boyunca sabitlenmiştir. %0.1 TritonX-100'lü 1X PBS'le hücre zarının geçirgenliği 15 dakika boyunca artırılmış ve hücreler %3 BSA bulunan %0.1 TritonX-100'lü 1X PBS'le 30 dakika boyunca bloklanmıştır. Daha sonra hücrelere, Alexa488-Phalloidin ya da Alexa647-Phalloidin bütün gece 4°C'de uygulanmıştır. Üç kere 1X PBS'le yıkanan yüzeylere hücre çekirdeğini boyamak için DAPI yükleme solüsyonuyla (mounting medium) yüklenmiştir. Hazırlanan örnekler floresan mikroskopta 40X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da (NIH) birleştirilmiştir.

3.3.5 Hücre yara kapanması analizi

Günlük uygulanan mekanik titreşimlerin(0,15g, 90Hz) hücre istilası üzerine etkisi MDA-MB-231 hücreleri üzerinde test edilmiştir. Yara kapanması deneyi (scratch-wound assay) yöntemi ile bu çalışma, üç hafta boyunca süren kültürde seçili günler için yapılmış ve diğer deneylerden farklı olarak bu deneyler 6 kuyulu kaplarda yapılmıştır. Başlangıç hücre oranı diğer deneylerle benzer olarak 640 hücre/mm² olarak kullanılmıştır. 200ul pipet ucu ile her kuyuda aynı şekilde boydan boya oluşturulan yaranın 24 saat içerisinde ne kadar kapandığı yara açılır açılmaz ve 24 saat sonunda alınan fotoğraflar ile belirlenmiştir. Olympus CKX41 mikroskobu ve DP2-BSW fotoğraf işleme programları kullanılmıştır (**Şekil 6**)



Şekil 6. Yara kapanma deneyi için örnek fotoğraflar. İki gruplar halinde kullanılan deneylerde çizik anında ve 24 saat sonraki çizigin durumu gösterilmektedir. Aşağıya doğru indikçe artan hücre yoğunluğu deneysel gün sayısının artmasından kaynaklanmaktadır.

3.4 Veri analizi ve istatistikler

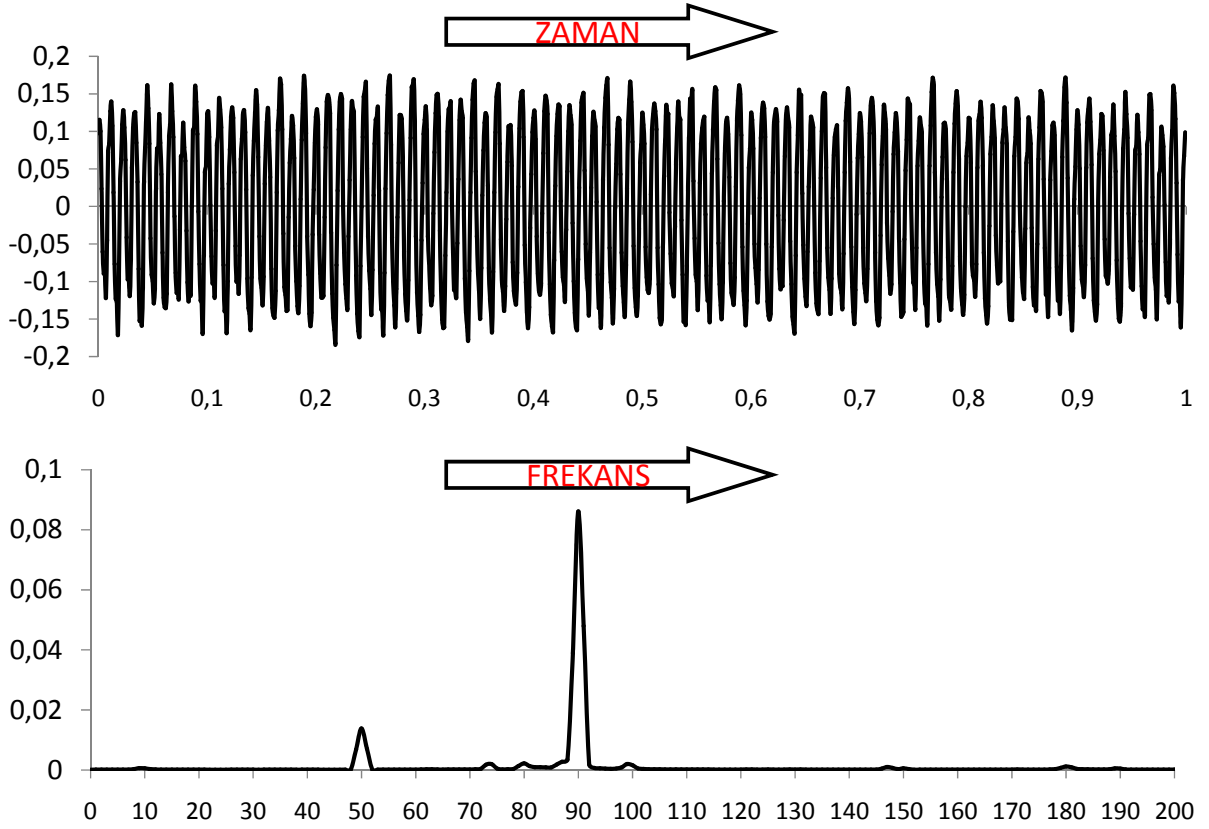
Tüm veriler aksi belirtilmedikçe ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. İstatistikî karşılaştırmalar Student's t-test yardımıyla yapılmış ve %5'in altında bulunan olasılık (probability, p) değerlerinin istatistikî anlam ifade ettiği kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Mekanik titreşim oluşturabilen bir platformun faaliyete alınması

Mekanik titreşim üretebilen bir sarsıcı cihaz tasarlanmış ve kullanıma sokulmuştur. Entegrasyonu laboratuarda tamamlanan cihaz, hücrelere uygulanması planlanan mekanik sinyalin kalitesi açısından test edilmiştir. Jeneratörden çıkan zayıf elektriksel sinyallerin amfi ile güçlendirilmesinden sonra ticari bir hoparlör diyaframında mekanik sinyallere

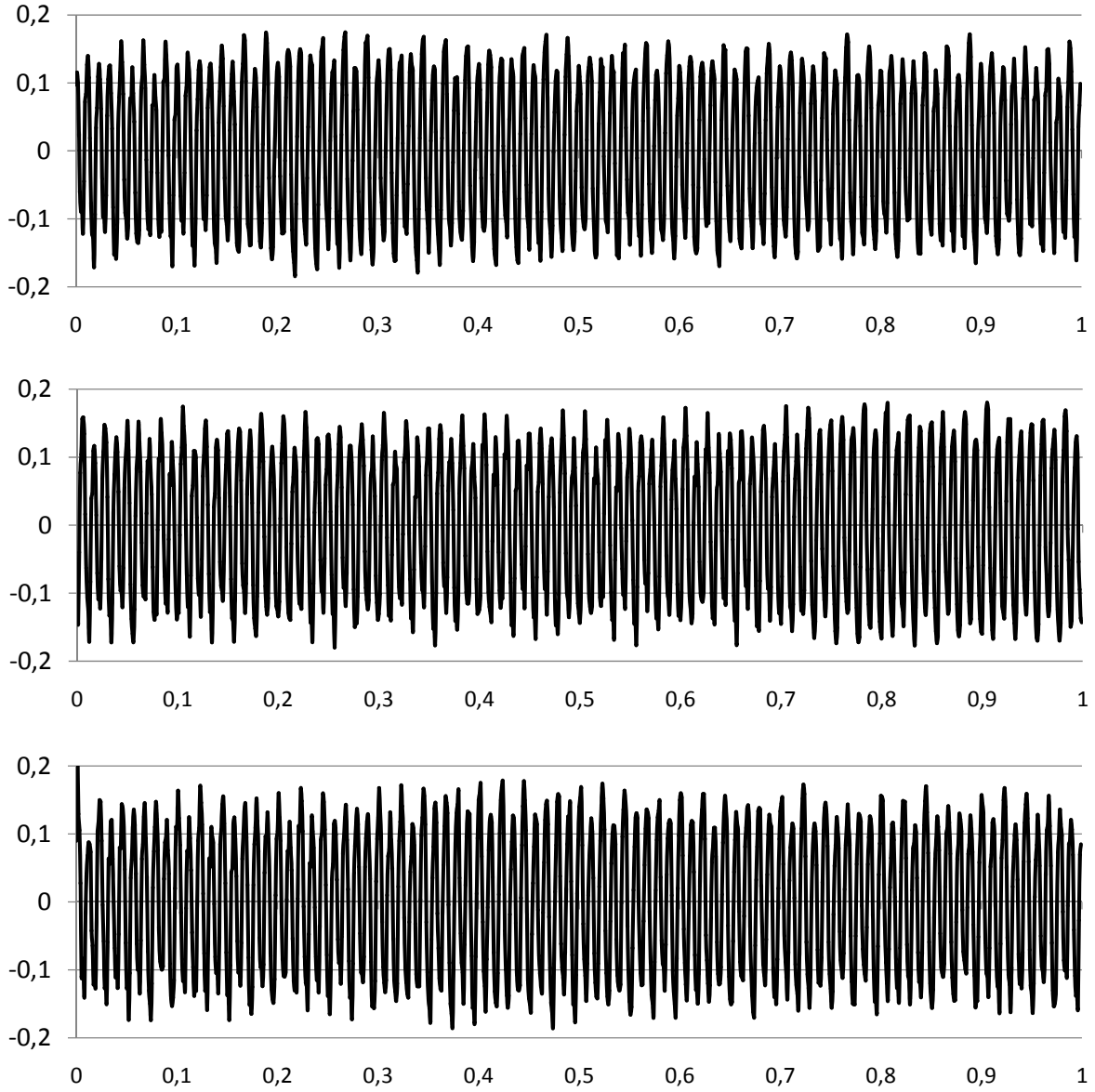
dönüştürülmüştür. Diyafram üzerinde oluşan bu mekanik sinyallerde mekanik ivmelenmenin genliği (amplitude), frekansı (frequency) ve tekrarlanabilirliği (repeatability) açısından ivmemetre aracılığı ile test edilmiş ve sonuçlar olumlu bulunmuştur. Genlik, ivmemetre ile ölçülen sinyalin tepe-çukur mesafesi olarak 90 Hz de, yani saniyede 90 tekrar olmak üzere 0.15g (1g = yerçekimi ivmelenmesi, 9.81 m/s²) genliğin cihaz tarafından kolaylıkla üretilebildiği saptanmıştır (**Şekil 7**). Mekanik sinyal karakterizasyonunda en az genlik kadar öneme sahip frekans elde edilen sinyallerin Fourier Transferi kullanılarak spektral alana aktarımlarıyla test edilebilmiştir. Sarsıcı cihazda elektriksel ve mekanik aksamların beraber çalışmaları sırasında sinyalde herhangi bir frekans farkı oluşup oluşmadığı araştırılmış ve jeneratör sinyaliyle mekanik titreşim sinyali arasında frekans açısından herhangi bir fark gözlemlenmemiştir (**Şekil 7**).



Şekil 7. Mekanik titreşim sinyalleri. Tasarımı tamamlanan mekanik titreşim cihazının ivmemetre ile ölçülen sinyal çıktıları. Testler sinyal jeneratöründen 90 Hz çıkışta yapılmıştır. Üst panel Zaman-ivmemetre voltajı grafiği, voltajın tepe tepe mesafesi 0.15g ye karşılık gelmektedir. Alt panel Ölçülen sinyalin frekans çıktısı, beklendiği gibi 90 Hz seviyesinde bir tepe oluşturmuştur. 50Hz civarında görülen sinyal şehir elektrik şebekesinin yarattığı elektromanyetik alandan kaynaklı olup mekanik bir anlam taşımamaktadır.

Bunlara ek olarak sarsıcı cihazın ürettiği sinyallerdeki tekrarlanabilirlik ayrı zaman gruplarında test edilmiş ve sonuçta sinyal genliğinde herhangi bir değişme olmadığı

saptanmıştır (**Şekil 8**). Bu veriler ışığında hücrelerin günlük 15dk titreşim uygulamaları sırasında sabit bir mekanik sinyale maruz kaldıkları gösterilmiştir.

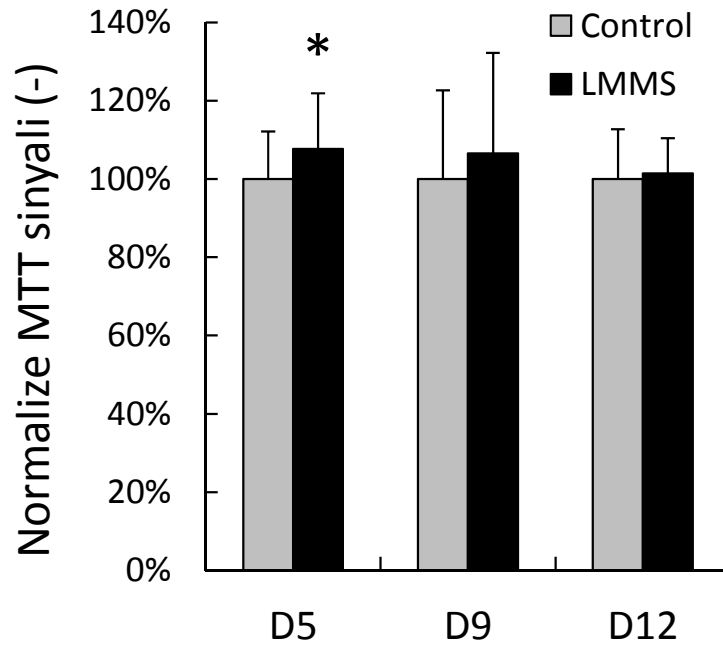


Şekil 8. Mekanik titreşimlerin tekrarlanabilirliği. Üç farklı zamanda kaydedilen 1 saniyelik süreçler, mekanik titreşimde deney süresince herhangi bir frekans ya da genlik değişimi olmadığını göstermektedir.

4.2 Mekanik titreşimlerin kontrol meme epitel (MCF10a) hücrelerine etkisi

MCF10a insan meme epitel hücreleri çalışmada kullanılan kanser hücreleri için kontrol hücre hattı olarak kullanılmışlardır. MCF10a hücreleri kültüre yerleştirildikten sonra günlük yüksek frekanslı (90Hz) ve düşük yoğunluklu (0.15Hz) titreşimlere maruz bırakılmış ve bu girdinin hücrelerde yarattığı değişiklikler gözlenmiştir. Tüm deney sonuçları için hücreler kontrol

(**Control**), titreşim (low magnitude mechanical signal - **LMMS**) olarak kodlanmıştır. Mekanik titreşimlerin başladığı gün 0.ıncı gün olarak kabul edilmiş (D0), deneyler seçili günler için tamamlanmıştır (D5, D9, D12). Sonuçlara göre: 5.ıncı gün sonunda titreşim uygulanan MCF10a hücreleri kontrollere göre %8 ($p<0.01$) daha fazla MTT aktivitesi göstermişler fakat bu fark 12.ıncı ve 19.ıncu günlerin sonunda ortadan kalkmıştır (**Şekil 9**). Bu sonuç, mekanik titreşimlerin sağlıklı meme epitel hücrelerini kısa vadede anabolik olarak etkileyebileceğini, fakat uzun vadede kültür ortamındaki etkili kimyasal faktörler ve büyüme hormonları sebebiyle bu farkın ortadan kalkmış olabileceğini göstermektedir.



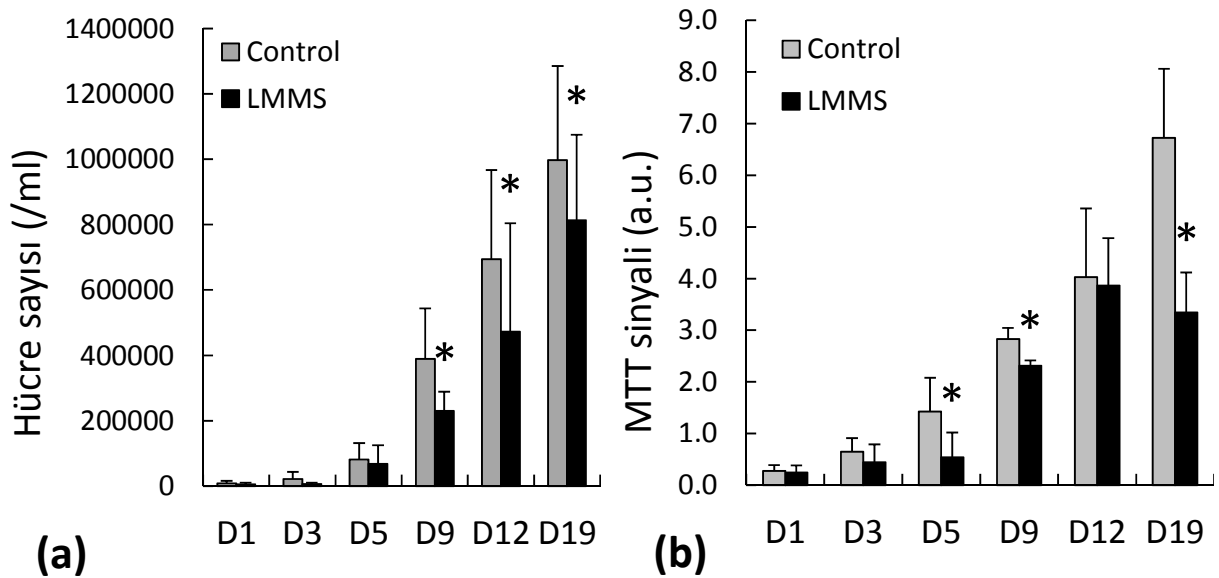
Şekil 9. Mekanik titreşimlerin MCF10a meme epitel hücre canlılıkları üzerine etkisinin MTT yöntemiyle araştırılması. *: $p<0.05$.

4.3 Mekanik titreşimlerin agresif tip meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerine etkisi

MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri kültüre yerleştirildikten sonra günlük yüksek frekanslı (90Hz) ve düşük yoğunluklu (0.15Hz) titreşimlere maruz bırakılmış ve bu girdinin hücrelerde yarattığı değişiklikler gözlenmiştir. Tüm deney sonuçları için hücreler kontrol (**Control**) ve titreşim (low magnitude mechanical signal - **LMMS**) olarak kodlanmıştır. Mekanik titreşimlerin başladığı gün 0.ıncı gün olarak kabul edilmiş (D0), deneyler seçili günler için tamamlanmıştır (D1, D3, D5, D9, D12 ve D19).

4.3.1 Hücre büyüme ve canlılıkları

Bir hafta boyunca mekanik girdiye maruz bırakılan hücrelerin bir haftalık uygulama sonunda canlılıkları Trypan Blue sayımı ve MTT analizi ile test edilmiştir (**Şekil 10**). Sonuçlara göre: MDA-MB-231 hücre sayıları başlangıçtan itibaren üç hafta içerisinde 108-kat artarken, titreşim uygulanan hücrelerde bu fark 92-kat olarak gerçekleşmiştir. Deneylerin başlamasının 2.inci haftasından itibaren titreşim ve kontrol grubu arasında anlamlı farklar oluşmaya başlamıştır. Bu farklar D9, D12 ve D19 için %41, %32 ve %18 (tüm $p < 0.05$) olarak gerçekleşmiştir (**Şekil 10a**). Trypan blue sayımı ile benzer şekilde MTT deneylerinde de titreşim uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre D5, D9 ve D19 için %62, %18 ve %50 (tüm $p < 0.05$) daha az aktivite gözlemlenmiştir (**Şekil 10b**).

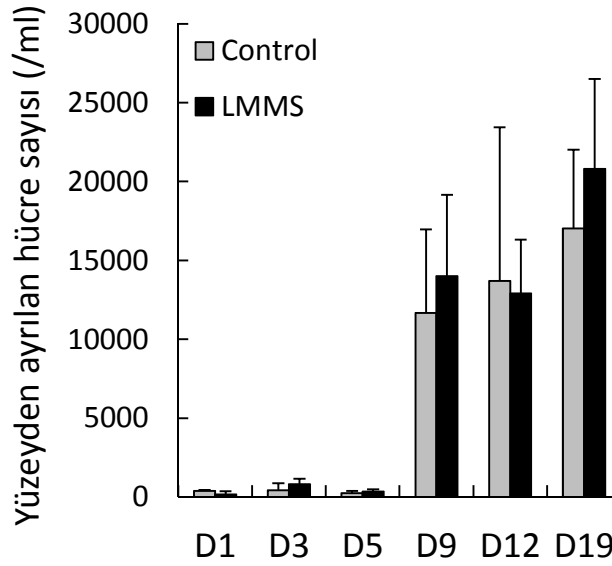


Şekil 10. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin a) Trypan blue ile sayılması, b) MTT ile canlılık testlerinin farklı günler için yapılması *: $p < 0.05$.

4.3.2 Hücrelerin kültür plastiğinden ayrılmaları

Günlük mekanik titreşim uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin kültürlerdeki azalma sebepleri arasında bulunabilecek “yüzeyden ayrılma” ihtimalini test etmek için günlük titreşim uygulanan meme kanseri hücre kültürlerinde 1, 3, 5, 9, 12 ve 19. günlerde tüm besiyeri toplanarak besiyerinde bulunan tüm hücreler trypan blue boyaması aracılığı ile ve hemacytometer kullanılarak sayılmıştır (**Şekil 11**). Sayımlar sonucunda bahsi geçen günler için kontrol ve titreşim grupları arasında istatistiki bir fark görülmemiştir (tüm $p > 0.1$). Bu

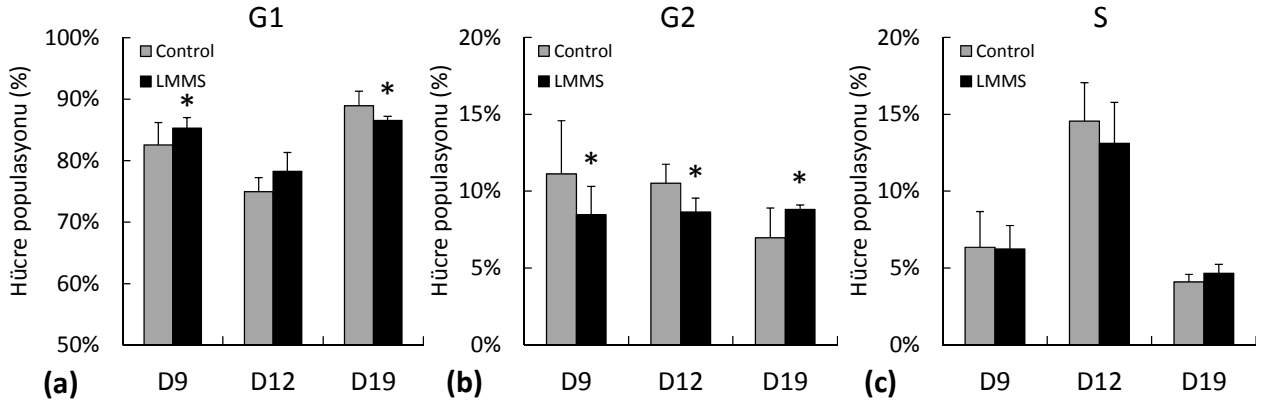
sonuçlara göre kullanılan mekanik sinyalin oluşturabileceği ajitasyonun hücreler üzerinde ciddi bir etkisi bulunmadığı düşünülmektedir.



Şekil 11. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin plastikten ayrılma sayılarının Trypan blue yöntemi ile belirlenmesi. *: $p < 0.05$.

4.3.3 Mekanik sinyallerin hücre döngüsüne etkisi

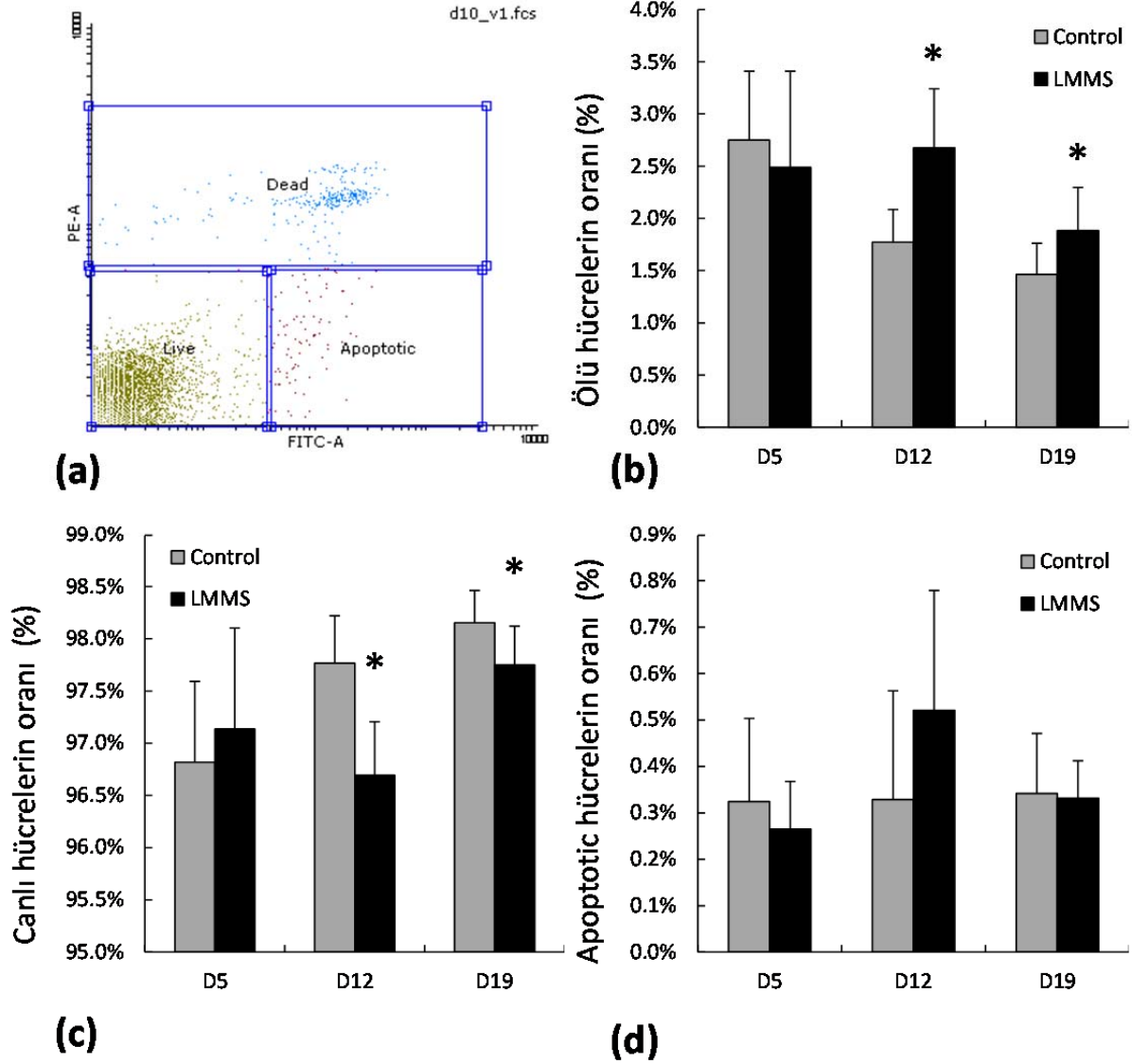
MDA-MB-231 günlük titreşim uygulanan kültürlerdeki azalma sebepleri arasında bulunabilecek hücre üreme döngüsü üzerinde oluşabilecek değişiklikler PI boyama ve akış sitometrisi aracılığı ile test edilmiştir (**Şekil 12**). Sonuçlara göre 9.uncu günde titreşim uygulanan meme kanseri hücreleri G1 fazında kontrollere oranla %3 ($p=0.03$) daha fazla ve G2 fazında %24 daha az ($p=0.03$) bulunmuşlardır. İkinci haftanın sonunda titreşim uygulanan hücrelerin G1 fazında kontrollere oranla %18 daha az ($p=0.02$) buldukları gözlemlenmiştir. Üçüncü haftanın sonunda ise titreşim uygulanan hücrelerin G1 fazında bulunma oranı kontrollere göre %3 daha az ($p=0.05$), G2 de bulunma oranı %27 daha fazladır. Hiçbir zaman aralığı için titreşim ve kontrol hücrelerinin S fazında bulunma oranları ile ilgili istatistiki anlam taşıyan bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlara göre mekanik sinyal uygulamasının sonunda kanser hücre sayısı ve canlılıklarında meydana gelen azalmaların hücre döngüsünün G1 ve G2 kontrol noktalarında meydana gelen kilitlemelerden dolayı olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 12. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin hücre döngüsündeki oranlarının PI yöntemi ile belirlenmesi. a) G1, b) G2, c) S fazındaki hücreler. *: $p < 0.05$.

4.3.4 Mekanik sinyallerin apoptoza etkisi

MDA-MB-231 günlük titreşim uygulanan kültürlerdeki azalma sebepleri arasında bulunabilecek hücre intiharı (apoptosis) üzerinde oluşabilecek değişiklikler Annexin V – PI boyaması ve akış sitometrisi aracılığı ile test edilmiştir (**Şekil 13**). Sonuçlara göre analiz edilen hiçbir noktada kontrol hücreleri ile titreşim uygulanan hücrelerin apoptotik hücre oranları ile ilgili anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.1$). Buna rağmen, titreşim uygulanan hücrelerdeki ölü (nekrotik) hücre oranı kontrol hücrelerine kıyasla ikinci haftanın sonunda %51 ($p < 0.01$), üçüncü haftanın sonunda %28 ($p = 0.05$) daha fazladır. Benzer şekilde titreşim uygulanan hücrelerin sağlıklı hücre oranı aynı günler için kontrol hücrelerine göre daha az olarak gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre günlük yüksek frekanslı mekanik titreşim uygulamasının meme kanser hücrelerinin üremelerini baskılaması sırasında kontrollü hücre ölümü mekanizmasını kullandıklarına dair bir intiba oluşmamıştır.

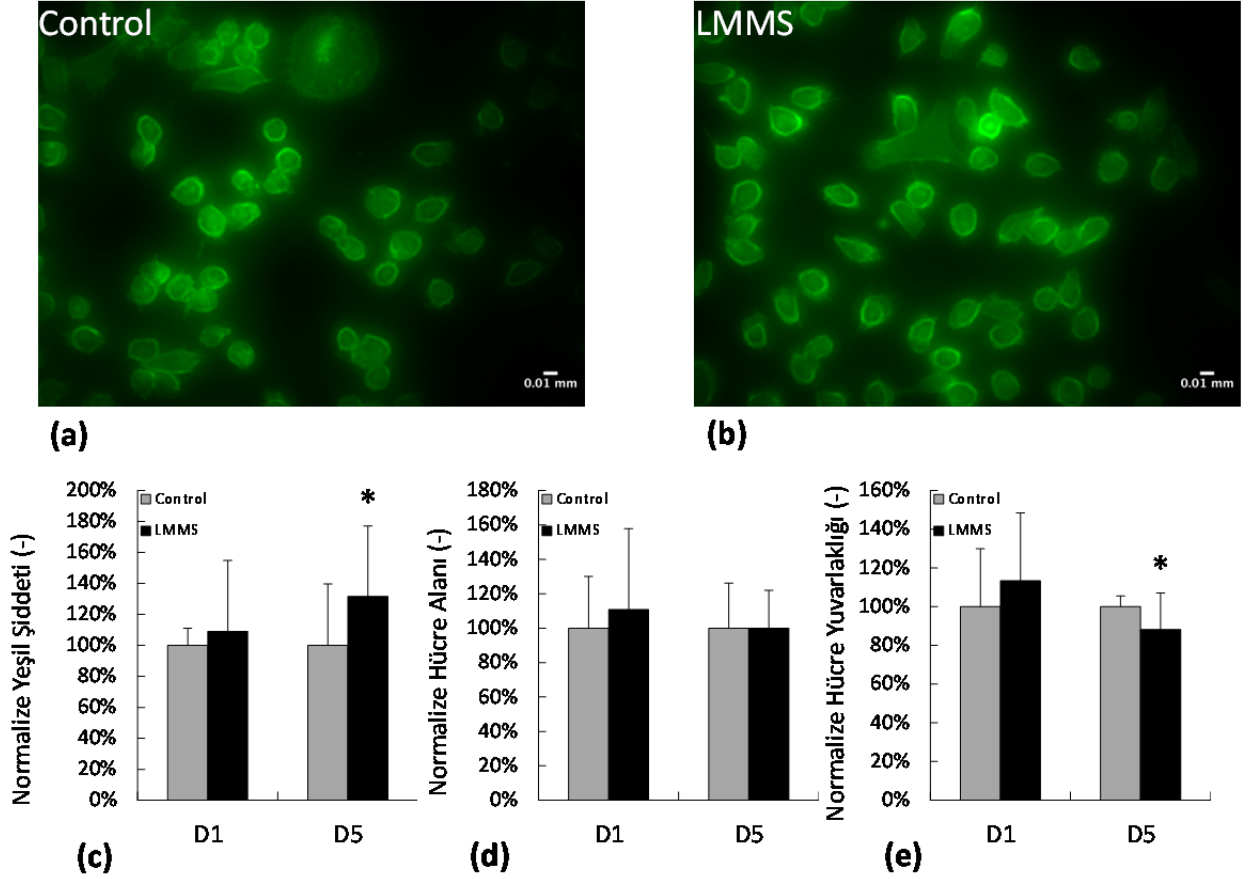


Şekil 13. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin sağlıklı apoptotik ve nekrotik/ölü hücre oranlarının Annexin V - PI yöntemi ile belirlenmesi. a) Örnek bir deney için hücre dağılımı ve hücre statüsünün kategorizasyonu, b) Ölü (nekrotik) hücre oranları, c) Sağlıklı hücre oranları, d) Apoptotik hücre oranları. *: p<0.05.

4.3.5 Mekanik sinyallerin kısa dönemde hücre morfolojisi üzerine etkisi

Mekanik sinyallerin MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin morfolojisine olan etkisi hücrelerin phalloidin (Alexa488 – Yeşil) boyanması ve tekil hücrelerin Image J kullanılarak analiz edilmesi ile incelenmiştir (**Şekil 14**). Bu analizlerde hücre başına düşen aktin sinyali, hücre alanı ve hücre yuvarlaklığı belirlenmiştir. Hücrelerin tekil analizi hedeflendiği için analizler bir hafta içerisinde yapılmıştır. Sonuçlara göre titreşim maruziyetinin birinci gününde hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla herhangi bir morfolojik fark oluşmamakla beraber, birinci haftanın sonunda titreşim uygulanan meme kanseri

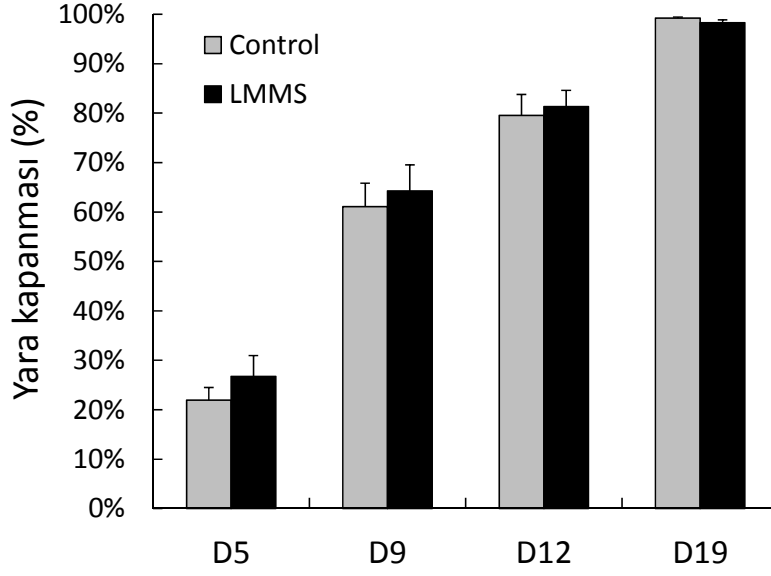
hücrelerinin aktin sinyalleri %32 ($p=0.02$) artmış, buna karşılık hücre yuvarlaklıkları %12 ($p=0.04$) azalmıştır. Bu sonuçlar mekanik sinyal uygulamasına karşı hücrelerin adapte olarak daha kuvvetli, katı ve yayvan bir yapı oluşturduklarını düşündürmüştür.



Şekil 14. Mekanik titreşimlere maruz kalan MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücrelerinin morfolojisinin phalloidin boyaması ile incelenmesi a ve b) kontrol ve titreşim hücrelerine ait örnek mikroskop görüntüsü, c) aktin sinyal şiddeti, d) hücre alanı, e) hücre yuvarlaklığı. *: $p < 0.05$.

4.3.6 Mekanik sinyallerin hücre hareketliliği üzerine etkisi

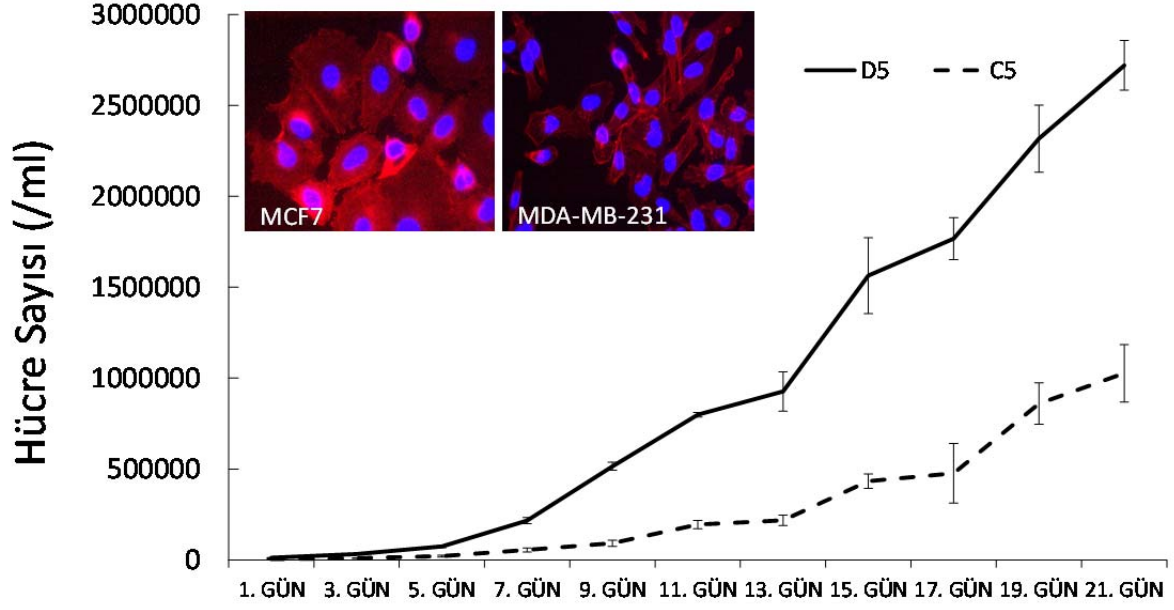
Günlük uygulanan mekanik titreşimlerin MDA-MB-231 hücrelerinin yara kapatma (scratch-wound assay) üzerindeki etkileri test edilmiştir. Deney sonuçlarına göre kontrol ve titreşim grupları arasında deney süresinden bağımsız olmak üzere anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.1$) (Şekil 15).



Şekil 15. Mekanik titreşimlerin büyüme besiyerindeki hücrelerin yara kapanmasına etkisi.

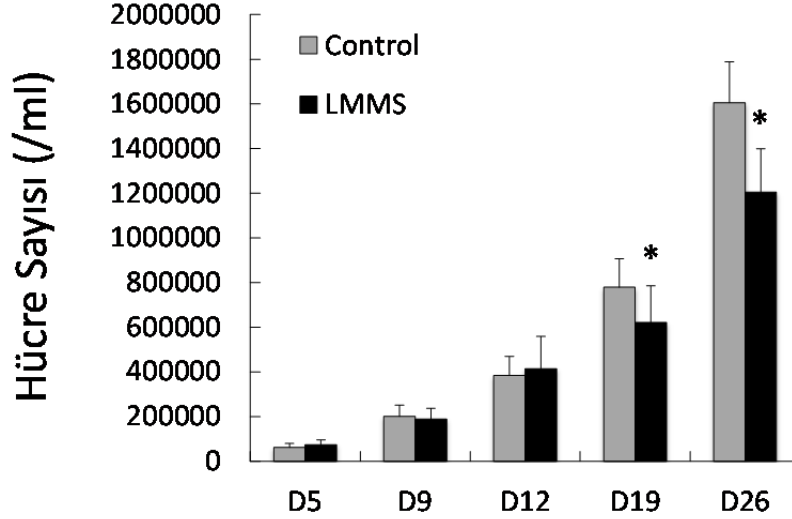
4.4 Mekanik titreşimlerin atıl tip meme kanseri (MCF7) hücrelerine etkisi

MCF7 ER+ atıl tip insan meme kanseri hücreleri, önceden kullanılan MDA-MB-231 hücrelerine göre daha geniş ve yayvan olup üreme hızı olarak MDA-MB-231 hücrelerine göre daha yavaşlardır (**Şekil 16**). Kültüre yerleştirildikten sonra günlük yüksek frekanslı (90Hz) ve düşük yoğunluklu (0.15Hz) titreşimlere maruz bırakılmış ve bu girdinin hücrelerde yarattığı değişiklikler gözlenmiştir. Tüm deney sonuçları için hücreler kontrol (**Control**) ve titreşim (low magnitude mechanical signal - **LMMS**) olarak kodlanmıştır. Mekanik titreşimlerin başladığı gün 0.ıncı gün olarak kabul edilmiş (D0), deneyler seçili günler için tamamlanmıştır (D1, D3, D5, D9, D12 ve D19).



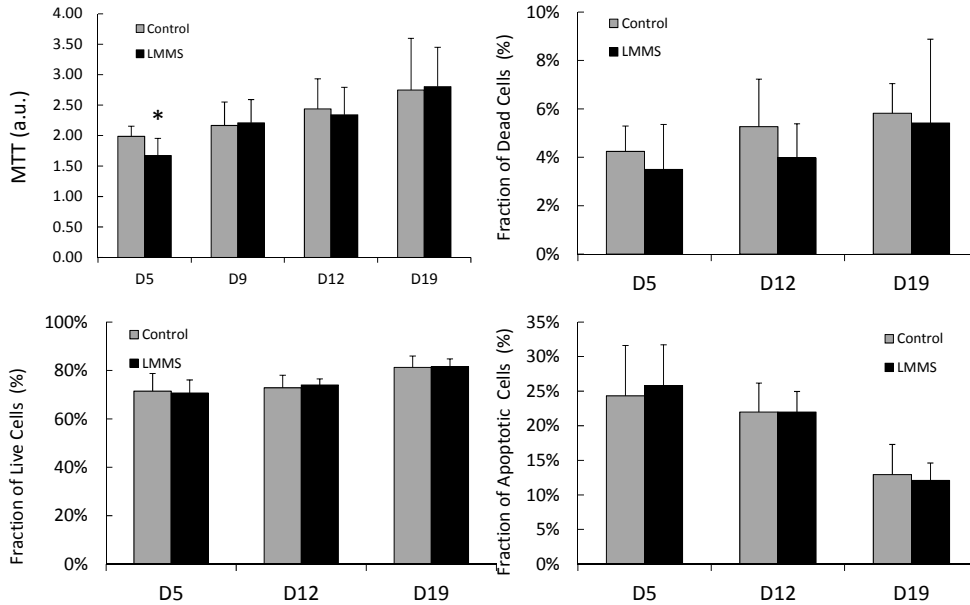
Şekil 16. MCF7 atıl tip meme kanseri ve MDA-MB-231 agresif tip meme kanseri hücreleri arasındaki morfolojik ve üreme hızı farkları C: MCF7, D: MDA-MB-231. Kültür başlangıç sayısı 5000 hücre. İç panelde yansıtılan resimlerde kırmızı: phalloidin, mavi: DAPI çekirdek boyasına karşılık gelmektedir.

MCF7 hücrelerinde yapılan Trypan blue hücre sayımlarına göre mekanik titreşim uygulanan hücrelerin sayısı kontrol hücrelerine kıyasla üç hafta sonuna kadar istatistiki bir fark göstermemiş, üçüncü haftanın sonunda ise kontrollere oranla %20 azalma ($p=0.01$) göstermiştir (**Şekil 17**). MCF7 hücrelerinin üremelerindeki yavaşlık gözönüne alınarak bu hücreler MDA-MB-231 hücre deneylerinden farklı olarak 4.üncü hafta sonuna kadar titreşime maruz bırakılmış ve bu noktada kontrol hücrelerine göre sayılarında %25 azalma ($p=0.01$) tespit edilmiştir.



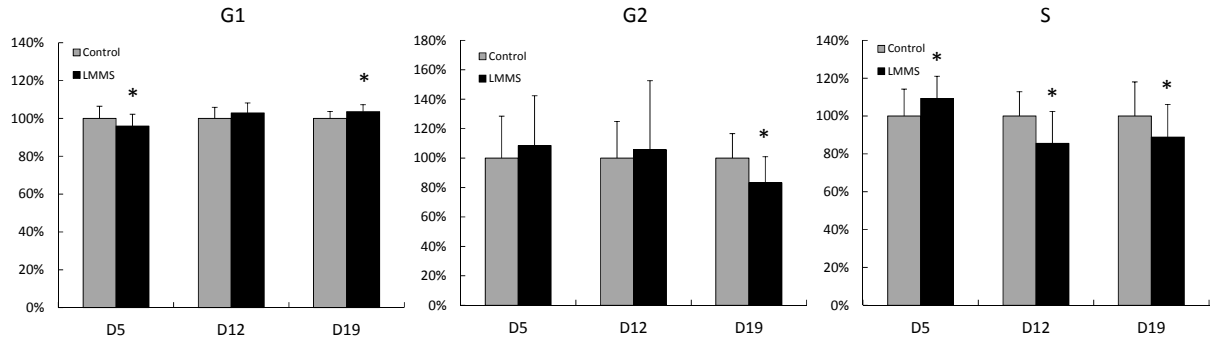
Şekil 17. Mekanik titreşim uygulanan MCF7 atıl tip meme kanseri hücrelerinin farklı günler için kültürde bulunma sayılarının Trypan Blue yöntemi ile sayılması. Kültür başlangıç sayısı 5000 hücre. *: $p < 0.05$.

MCF7 hücrelerinde yapılan MTT testlerinde ise D19 da titreşim uygulanan hücrelerde sayıca görülen fark hücre canlılığı ve metabolik aktivitesi için gözlemlenememiştir (**Şekil 18a**). Ek olarak MCF7 hücrelerinde yapılan Annexin V-PI apoptoz deneyleri günlük uygulanan mekanik titreşimlerin MCF7 hücrelerinin kontrollü hücre ölümüne etkide bulunmadığını düşündürmüştür (**Şekil 18b-d**). Ayrıca mekanik titreşimlerin kısa vadede yara kapanması üzerine etkileri de MCF7 hücreleri için anlamlı bir sonuç vermemiştir (**Veri gösterilmemiştir**).



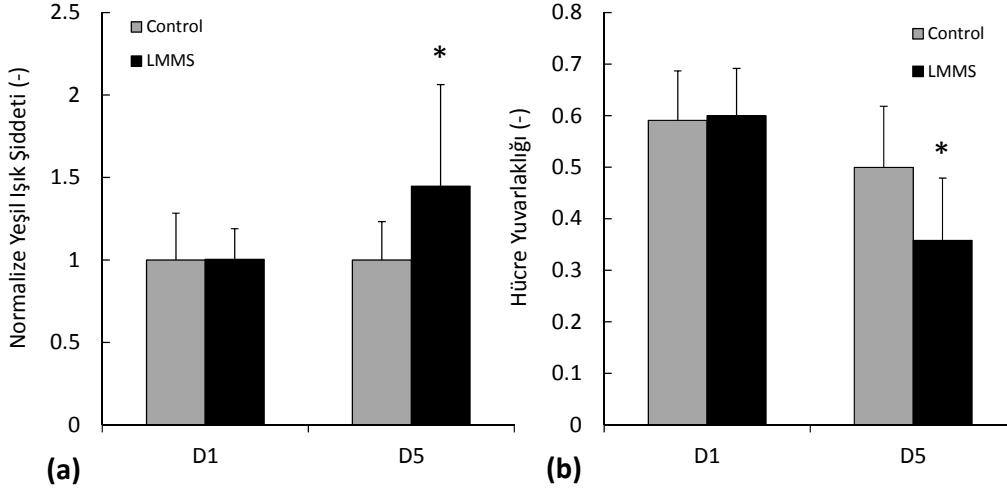
Şekil 18. Mekanik titreşim uygulanan MCF7 atıl tip meme kanseri hücrelerinin farklı günler için **a)** MTT ile canlılıklarının, ve Annexin-V deneyi ile populasyondaki **b)**ölü hücre, **c)** sağlıklı hücre ve **d)** apoptotik hücre oranlarının belirlenmesi *: $p < 0.05$.

Bu noktadan sonra günlük mekanik titreşim uygulanan MCF7 hücreleri için PI yöntemi ile hücre döngüsü analizleri yapılmıştır. (**Şekil 19**). Bu sonuçlara göre birinci haftanın sonunda titreşim uygulanan MCF7 hücreleri kontrollere oranla G1 fazında %4 daha az ($p=0.05$) ve S fazında %9 daha fazla ($p=0.03$) gözlenmişlerdir. Bu sonuçlara göre ilk hafta sonunda titreşim uygulanan MCF7 hücrelerinin daha hızlı üredikleri düşünülmüştür. Bu gözleme zıt şekilde ikinci hafta sonunda S fazındaki titreşim uygulanan hücre oranı kontrollere göre %14 ($p<0.01$), üçüncü hafta sonunda ise %11 daha az ($p=0.05$) olmuştur. Hücre üreme hızındaki bu yavaşlama üçüncü haftadan itibaren titreşim hücrelerinin sayıca azalmasının bir sebebi olabileceği düşünülmektedir, fakat bu gözlemin MTT deneyleri için teyit edilememesi MCF7 hücrelerinin MDA-MB-231 hücrelerine göre oldukça yavaş olan üreme döngüleri yüzünden olası etkilerin belki daha uzun süreli deneylerle araştırılması gerekliliğinin ortaya koymaktadır. 3-4 haftayı aşan hücre kültürü deneyleri çok sağlıklı olmadığından bu deneyler ileriki aşamada in vivo olarak planlanacaktır.



Şekil 19. Mekanik titreşimlere maruz kalan MCF7 meme kanseri hücrelerinin hücre döngüsündeki oranlarının PI yöntemi ile belirlenmesi. a) G1, b) G2, c) S fazındaki hücreler. *: $p<0.05$.

Son olarak günlük mekanik titreşim uygulamasının MCF7 hücre morfolojisine olan etkisi de phalloidin boyama yöntemiyle araştırılmıştır. Buna göre bir günlük titreşim uygulamasının sonunda titreşim uygulanan ve kontrol hücreleri arasında aktin moleküllerinden gelen ışık şiddeti ile hücre yuvarlıkları benzer olarak gözlemlenmiştir (**Şekil 20**). Beşinci günün sonunda ise aynı MDA-MB-231 hücrelerinde gözlemlendiği gibi titreşim uygulanan MCF7 hücrelerinden %45 ($p=0.03$) daha fazla aktin ışık şiddeti gözlemlenmiştir (**Şekil 20a**). Aynı zamanda bu hücreler beşinci günün sonunda yuvarlaklıklarını %28 ($p=0.01$) kaybederek daha fibroblast benzeri bir yapı kazanmışlardır (**Şekil 20b**).



Şekil 20. Mekanik titreşimlere maruz kalan MCF7 meme kanseri hücrelerinin morfolojisinin phalloidin boyaması ile birinci ve beşinci günün sonunda incelenmesi, **a)** aktin sinyal şiddeti, **b)** hücre yuvarlaklığı. *: $p < 0.05$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu projede düşük yoğunluklu mekanik titreşimlerin (low magnitude mechanical signals – LMMS) farklı tiplerdeki meme kanseri hatlarının hücre biyolojileri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Projede elde edilen sonuçlar LMMS sinyallerinin tipinden bağımsız olarak meme kanseri hücrelerinin morfoloji ve hücre döngülerine etki ettikleri gösterilmiştir. Bu etki agresif tip (MDA-MB-231) meme kanseri hücrelerinde birinci haftadan sonra kanser hücrelerinin sayı ve canlılıkları açısından anlamlı bir azalmayla sonuçlanırken, daha atıl tip (MCF7) meme kanseri hücrelerinde bahsi geçen parametrelerdeki yarattığı fark belirgin değildir. LMMS sinyalleri kanser olmayan meme epitel (MCF10a) hücreleri üzerinde anlamlı bir etki yaratmamıştır. LMMS sinyalleri her ne kadar kanser hücrelerinin üremeleri üzerine etki etse de, onların istila potansiyeline bir etkide bulunmamıştır.

Günde 15 dakika boyunca LMMS uygulanan kanser hücrelerinden MDA-MB-231 için kısa vadede ve MCF7 için ise uzun vadede hücre döngüsünün G1 fazında kaldığı gözlemlenmiştir. Buna benzer bir kilitlenme kayma gerilimlerine (shear stress) maruz kalan kolon kanseri hücrelerinde de gözlemlenmiştir (Avvisato vd., 2007). Her ne kadar kayma

gerilmeleri fiziksel olarak bu çalışmada uygulanan mekanik sinyallere göre önemli farklılıklar içerse de, bu durum genel anlamda kanser hücrelerinde görülen mekanik sinyaller sonucu üremedeki azalmanın temel mekanizmalarından birine işaret ediyor olabilir. Bu görüşü destekler nitelikte veri uzay uçuşu yani mekanik yüklerin tamamen ortadan kalktığı durumlarda (Ozcivici, 2013) MCF7 hücrelerinde gözlemlenen üreme artışı ve hücrelerin daha çabuk hücre döngüsüne girmesi gösterilebilir (Vassy vd., 2001). Ek veri olarak, mekanik kuvvetlerin ortadan kalktığı durumların tiroid kanseri hücreleri için de kolaylıkla gelişebildikleri, apoptoz şansını baskıladıkları ve daha kolay hareket edebildikleri bir ortam oluşturdukları gözlenmiştir (Infanger vd., 2006). Bir araya getirildiğinde varolan bu veriler kanser hücreleri üzerindeki mekanik kuvvetlerin yarattığı denetlemenin bu hücrelerin gelişimini durdurmak için oldukça önemli bir faktör olabileceği ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan LMMS sinyalleri daha önce *in vivo* olarak kas iskelet dokularındaki arttırıcı (anabolic) etkisi nedeniyle oldukça fazla test edilmişlerdir. Bu çalışmalardan bir kaçına örnek olarak LMMS sinyalleri mekanik kuvvet yoksunluğundan oluşan kemik erimesinin rejenerasyonunu kolaylaştırmakta (Ozcivici vd., 2010b), yağ hücrelerinin oluşmalarını ve büyümelerini yağ dokusunda (Rubin vd., 2007), karaciğerde (Luu vd., 2010) ve yüksek kalorili besin dietlerinde azaltmaktadır (Chan vd., 2012). Bu çalışmalardan hiçbirisi LMMS sinyalleri ile ilgili negatif bir etki bildirmemişlerdir. Bir süre önce bu çalışmada kullanılanana benzer LMMS sinyalleri yumurtalık kanseri olan farelerde denenmiş, ve bu farelerin ömründe bir etkiye yol açmadığı halde LMMS sinyalleri kanserle ilintili kemik kaybını engellemiştir (Pagnotti vd., 2012). Her ne kadar farelerin ömürleri artmasa da, yapılan organ incelemelerinde LMMS uygulanan farelerde tümör oluşumunun daha az organ sistemini etkilediği gözlemlenmiştir bu durum LMMS'in kanserin oluşmasına değil fakat gelişmesine engel olduğunu düşündürmüştür (Pagnotti vd., 2012). Doğası itibariyle dinamik özellikteki tek bir mekanik kuvvetin çok sayıda bileşeni olduğu için (genlik, frekans, yoğunluk, süre, tekrar, vb.) farklı kanser tiplerini ve/veya fazları etkilemek için ileride yapılacak çalışmaların bu bileşenlerin optimizasyonuna yönelik olması önemlidir.



Bu çalışmada her ne kadar kanser hücreleri ve mekanik sinyaller arasında direkt bir ilişki test edilmişse de, fiziksel egzersizin kanser oluşumunu engellemekte dolaylı olarak bir çok faktörü etkileyebileceği gözardı edilmemelidir. Örneğin fiziksel egzersiz vücuttaki yağ depolarında azalmaya yol açar ki bu depolar bir çok karsinojen bileşenin uzun süreli saklanabildiği mecralardır (Brown ve Simpson, 2012; Wang vd., 2012; Zhao vd., 2012; Denham vd., 2013). Ek olarak vücut yağ kütlesi kadınlarda doğurganlıkla ters ilişkili olduğu için meme ve yumurtalık kanseri için belirleyicidir (Frisch, 1987). Fiziksel egzersiz aynı zamanda dolaşımdaki insülin seviyelerini baskıladığı için etkili bir büyüme faktörü (growth factor) olan bu molekülün kanserli hücrelerle etkileşmesi ve onların üremelerini sağlaması engellenmiş olur. (Cononie vd., 1994; Marliss ve Vranic, 2002). Son ve belki de en önemli faktör fiziksel egzersizle insan bağışıklık sistemi arasındaki ilişkidir. Egzersiz bağışıklık sistemini güçlendirdiği için organizmanın kansere dönüşen hücre/hücre gruplarıyla etkili mücadelesine önemli bir katkı yapabilir (Morgado vd., 2012; Gleeson ve Williams, 2013).

Sonuç olarak bu projede günlük çok düşük genlikli ve yüksek frekanslı mekanik sinyal uygulamasının meme kanseri hücrelerinin üremesinde bir baskılama oluşturduğu gösterilmiştir. Her ne kadar bu çalışma hücre seviyesinde de olsa, bunu takip edecek çalışmaların moleküler seviyedeki mekanizmaları anlamaya yönelik olması kaçınılmazdır. Başarıya ulaştığı taktirde bu çalışma kapsamında kullanılan sinyaller biyomedikal cihaz uygulamalarıyla kanser ile savaşta önleyici ya da tamamlayıcı tedavi yöntemlerinin oluşturulmasına hizmet edebilirler.



6. KAYNAKLAR

- Anand P., Kunnumakkara A. B., Sundaram C., Harikumar K. B., Tharakan S. T., Lai O. S., vd. 2008. "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes", *Pharm Res*, 25(9): 2097-116.
- Avvisato C. L., Yang X., Shah S., Hoxter B., Li W., Gaynor R., vd. 2007. "Mechanical force modulates global gene expression and beta-catenin signaling in colon cancer cells", *J Cell Sci*, 120(Pt 15): 2672-82.
- Brabek J., Mierke C. T., Rosel D., Vesely P., Fabry B. 2010. "The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion", *Cell communication and signaling : CCS*, 8: 22.
- Brown K. A., Simpson E. R. 2012. "Obesity and breast cancer: Mechanisms and therapeutic implications", *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 4: 2515-24.
- Bush J. L., Wilson J. B., Vail T. P. 2006. "Management of bone loss in revision total knee arthroplasty", *Clin Orthop Relat Res*, 452: 186-92.
- Chan M. E., Adler B. J., Green D. E., Rubin C. T. 2012. "Bone structure and b-cell populations, crippled by obesity, are partially rescued by brief daily exposure to low-magnitude mechanical signals", *FASEB J*, 26(12): 4855-63.
- Chen K., Li D., Jiang Y. H., Yao W. J., Wang X. J., Wei X. C., vd. 2004. "Influence of expressed trail on biophysical properties of the human leukemic cell line jurkat", *Cell research*, 14(2): 161-8.
- Chotard-Ghodsnia R., Haddad O., Leyrat A., Drochon A., Verdier C., Duperray A. 2007. "Morphological analysis of tumor cell/endothelial cell interactions under shear flow", *J Biomech*, 40(2): 335-44.
- Coinu R., Chiaviello A., Galleri G., Franconi F., Crescenzi E., Palumbo G. 2006. "Exposure to modeled microgravity induces metabolic idleness in malignant human mcf-7 and normal murine vsmc cells", *FEBS Lett*, 580(10): 2465-70.
- Colbert L. H., Westerlind K. C., Perkins S. N., Haines D. C., Berrigan D., Donehower L. A., vd. 2009. "Exercise effects on tumorigenesis in a p53-deficient mouse model of breast cancer", *Med Sci Sports Exerc*, 41(8): 1597-605.
- Cononie C. C., Goldberg A. P., Rogus E., Hagberg J. M. 1994. "Seven consecutive days of exercise lowers plasma insulin responses to an oral glucose challenge in sedentary elderly", *Journal of the American Geriatrics Society*, 42(4): 394-8.
- Cristofolini L. 1997. "A critical analysis of stress shielding evaluation of hip prostheses", *Crit Rev Biomed Eng*, 25(4-5): 409-83.
- Cross S. E., Jin Y. S., Lu Q. Y., Rao J., Gimzewski J. K. 2011. "Green tea extract selectively targets nanomechanics of live metastatic cancer cells", *Nanotechnology*, 22(21): 215101.
- Denham J., Marques F. Z., O'Brien B. J., Charchar F. J. 2013. "Exercise: Putting action into our epigenome", *Sports medicine (Auckland, NZ)*.
- Discher D. E., Janmey P., Wang Y. L. 2005. "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate", *Science*, 310(5751): 1139-43.
- Edwards J. H., Reilly G. C. 2015. "Vibration stimuli and the differentiation of musculoskeletal progenitor cells: Review of results in vitro and in vivo", *World journal of stem cells*, 7(3): 568.
- Friedenreich C. M., Orenstein M. R. 2002. "Physical activity and cancer prevention: Etiologic evidence and biological mechanisms", *J Nutr*, 132(11 Suppl): 3456S-64S.



- Frisch R. E. 1987. "Body fat, menarche, fitness and fertility", *Human reproduction* (Oxford, England), 2(6): 521-33.
- Garman R., Gaudette G., Donahue L. R., Rubin C., Judex S. 2007a. "Low-level accelerations applied in the absence of weight bearing can enhance trabecular bone formation", *Journal of Orthopaedic Research*, 25(6): 732-40.
- Garman R., Rubin C., Judex S. 2007b. "Small oscillatory accelerations, independent of matrix deformations, increase osteoblast activity and enhance bone morphology", *PLoS One*, 2(7): e653.
- Gillette C. A., Zhu Z., Westerlind K. C., Melby C. L., Wolfe P., Thompson H. J. 1997. "Energy availability and mammary carcinogenesis: Effects of calorie restriction and exercise", *Carcinogenesis*, 18(6): 1183-8.
- Gleeson M., Williams C. 2013. "Intense exercise training and immune function", *Nestle Nutrition Institute workshop series*, 76: 39-50.
- Guck J., Schinkinger S., Lincoln B., Wottawah F., Ebert S., Romeyke M., vd. 2005. "Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence", *Biophysical Journal*, 88(5): 3689-98.
- Guo W., Giancotti F. G. 2004. "Integrin signalling during tumour progression", *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(10): 816-26.
- Hahn C., Schwartz M. A. 2009. "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis", *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1): 53-62.
- Hanahan D., Weinberg R. A. 2011. "Hallmarks of cancer: The next generation", *Cell*, 144(5): 646-74.
- Hood J. D., Cheresh D. A. 2002. "Role of integrins in cell invasion and migration", *Nature reviews Cancer*, 2(2): 91-100.
- Huang S., Ingber D. E. 2005. "Cell tension, matrix mechanics, and cancer development", *Cancer Cell*, 8(3): 175-6.
- Infanger M., Kossmehl P., Shakibaei M., Bauer J., Kossmehl-Zorn S., Cogoli A., vd. 2006. "Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells", *Cell and tissue research*, 324(2): 267-77.
- Ingber D. E. 2005. "Mechanical control of tissue growth: Function follows form", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(33): 11571-2.
- Inoue M., Grp J. S. 2010. "Impact of lifestyle on overall cancer risk among japanese: The japan public health center-based prospective study (jphc study)", *J Epidemiol*, 20(2): 90-6.
- Johnson K. A., Sistrunk M. L., Polisensky D. H., Braam J. 1998. "Arabidopsis thaliana responses to mechanical stimulation do not require *etr1* or *ein2*", *Plant Physiology*, 116(2): 643-9.
- Kruse K., Julicher F. 2005. "Oscillations in cell biology", *Curr Opin Cell Biol*, 17(1): 20-6.
- Lam W. A., Rosenbluth M. J., Fletcher D. A. 2007. "Chemotherapy exposure increases leukemia cell stiffness", *Blood*, 109(8): 3505-8.
- Lee C. D., Sui X., Hooker S. P., Hebert J. R., Blair S. N. 2011. "Combined impact of lifestyle factors on cancer mortality in men", *Annals of epidemiology*, 21(10): 749-54.



- Lekka M., Laidler P., Gil D., Lekki J., Stachura Z., Hryniewicz A. Z. 1999. "Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy", *European biophysics journal : EBJ*, 28(4): 312-6.
- Levental K. R., Yu H., Kass L., Lakins J. N., Egeblad M., Erler J. T., vd. 2009. "Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling", *Cell*, 139(5): 891-906.
- Lu Q. Y., Jin Y. S., Pantuck A., Zhang Z. F., Heber D., Beldegrun A., vd. 2005. "Green tea extract modulates actin remodeling via rho activity in an in vitro multistep carcinogenic model", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(4): 1675-83.
- Luu Y. K., Ozcivici E., Capilla E., Adler B., Chan E., Shroyer K., vd. 2010. "Development of diet-induced fatty liver disease in the aging mouse is suppressed by brief daily exposure to low-magnitude mechanical signals", *International journal of obesity*, 34(2): 401-5.
- Marliss E. B., Vranic M. 2002. "Intense exercise has unique effects on both insulin release and its roles in gluoregulation: Implications for diabetes", *Diabetes*, 51 Suppl 1: S271-83.
- Meloni M. A., Galleri G., Camboni M. G., Pippia P., Cogoli A., Cogoli-Greuter M. 2004. "Modeled microgravity affects motility and cytoskeletal structures", *Journal of gravitational physiology : a journal of the International Society for Gravitational Physiology*, 11(2): P197-8.
- Meloni M. A., Galleri G., Pani G., Saba A., Pippia P., Cogoli-Greuter M. 2011. "Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line j-111", *Cytoskeleton*, 68(2): 125-37.
- Meloni M. A., Galleri G., Pippia P., Cogoli-Greuter M. 2006. "Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity", *Protoplasma*, 229(2-4): 243-9.
- Mizejewski G. J. 1999. "Role of integrins in cancer: Survey of expression patterns", *Proc Soc Exp Biol Med*, 222(2): 124-38.
- Moorman P. G., Jones L. W., Akushevich L., Schildkraut J. M. 2011. "Recreational physical activity and ovarian cancer risk and survival", *Annals of epidemiology*, 21(3): 178-87.
- Morgado J. M., Rama L., Silva I., de Jesus Inacio M., Henriques A., Laranjeira P., vd. 2012. "Cytokine production by monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers", *European journal of applied physiology*, 112(2): 471-82.
- Morris H. P. 1945. "Ample exercise and a minimum of food as measures for cancer prevention?", *Science*, 101(2627): 457-9.
- Murphy E. A., Davis J. M., Barrilleaux T. L., McClellan J. L., Steiner J. L., Carmichael M. D., vd. 2011. "Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in c3(1)sv40tag mice", *Cytokine*, 55(2): 274-9.
- Neel P. L., Harris R. W. 1971. "Motion-induced inhibition of elongation and induction of dormancy in liquidambar", *Science*, 173(3991): 58-9.
- Orr A. W., Helmke B. P., Blackman B. R., Schwartz M. A. 2006. "Mechanisms of mechanotransduction", *Developmental cell*, 10(1): 11-20.
- Ozcivici E. 2013. "Effects of spaceflight on cells of bone marrow origin", *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*, 30(1): 1-7.
- Ozcivici E., Garman R., Judex S. 2007. "High-frequency oscillatory motions enhance the simulated mechanical properties of non-weight bearing trabecular bone", *J Biomech*, 40(15): 3404-11.



- Ozcvici E., Luu Y. K., Adler B., Qin Y. X., Rubin J., Judex S., vd. 2010a. "Mechanical signals as anabolic agents in bone", *Nature reviews Rheumatology*, 6(1): 50-9.
- Ozcvici E., Luu Y. K., Rubin C. T., Judex S. 2010b. "Low-level vibrations retain bone marrow's osteogenic potential and augment recovery of trabecular bone during reambulation", *PLoS ONE*, 5(6): e11178.
- Pagnotti G. M., Adler B. J., Green D. E., Chan M. E., Frechette D. M., Shroyer K. R., vd. 2012. "Low magnitude mechanical signals mitigate osteopenia without compromising longevity in an aged murine model of spontaneous granulosa cell ovarian cancer", *Bone*, 51(3): 570-7.
- Park S., Koch D., Cardenas R., Kas J., Shih C. K. 2005. "Cell motility and local viscoelasticity of fibroblasts", *Biophys J*, 89(6): 4330-42.
- Paszek M. J., Zahir N., Johnson K. R., Lakins J. N., Rozenberg G. I., Gefen A., vd. 2005. "Tensional homeostasis and the malignant phenotype", *Cancer Cell*, 8(3): 241-54.
- Peyton S. R., Kim P. D., Ghajar C. M., Seliktar D., Putnam A. J. 2008. "The effects of matrix stiffness and rhoa on the phenotypic plasticity of smooth muscle cells in a 3-d biosynthetic hydrogel system", *Biomaterials*, 29(17): 2597-607.
- Pietsch J., Bauer J., Egli M., Infanger M., Wise P., Ulbrich C., vd. 2011. "The effects of weightlessness on the human organism and mammalian cells", *Current molecular medicine*, 11(5): 350-64.
- Rao J. Y., Li N. 2004. "Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development", *Curr Cancer Drug Tar*, 4(4): 345-54.
- Rathinam R., Alahari S. K. 2010. "Important role of integrins in the cancer biology", *Cancer metastasis reviews*, 29(1): 223-37.
- Rubin C. T., Capilla E., Luu Y. K., Busa B., Crawford H., Nolan D. J., vd. 2007. "Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals", *P Natl Acad Sci USA*, 104(45): 17879-84.
- Ryan G., Pandit A., Apatsidis D. P. 2006. "Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications", *Biomaterials*, 27(13): 2651-70.
- Suresh S. 2007. "Biomechanics and biophysics of cancer cells", *Acta biomaterialia*, 3(4): 413-38.
- Swaminathan V., Mythreye K., O'Brien E. T., Berchuck A., Blobe G. C., Superfine R. 2011. "Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines", *Cancer Res*, 71(15): 5075-80.
- Tabuchi Y., Ando H., Takasaki I., Feril L. B., Jr., Zhao Q. L., Ogawa R., vd. 2007. "Identification of genes responsive to low intensity pulsed ultrasound in a human leukemia cell line molt-4", *Cancer letters*, 246(1-2): 149-56.
- Taga M., Yamauchi K., Odle J., Furian L., Sundaresan A., Ramesh G. T., vd. 2006. "Melanoma growth and tumorigenicity in models of microgravity", *Aviat Space Environ Med*, 77(11): 1113-6.
- Tambe D. T., Hardin C. C., Angelini T. E., Rajendran K., Park C. Y., Serra-Picamal X., vd. 2011. "Collective cell guidance by cooperative intercellular forces", *Nature materials*, 10(6): 469-75.
- Ulrich T. A., de Juan Pardo E. M., Kumar S. 2009. "The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells", *Cancer Res*, 69(10): 4167-74.

- Vassy J., Portet S., Beil M., Millot G., Fauvel-Lafeve F., Karniguian A., vd. 2001. "The effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line mcf-7", *FASEB J*, 15(6): 1104-6.
- Wang Y. Y., Lehuède C., Laurent V., Dirat B., Dauvillier S., Bochet L., vd. 2012. "Adipose tissue and breast epithelial cells: A dangerous dynamic duo in breast cancer", *Cancer letters*, 324(2): 142-51.
- Winzer B. M., Whiteman D. C., Reeves M. M., Paratz J. D. 2011. "Physical activity and cancer prevention: A systematic review of clinical trials", *Cancer Causes Control*, 22(6): 811-26.
- Wu C., Guo X., Wang F., Li X., Tian X. C., Li L., vd. 2011. "Simulated microgravity compromises mouse oocyte maturation by disrupting meiotic spindle organization and inducing cytoplasmic blebbing", *PLoS One*, 6(7): e22214.
- Yashiro K., Shiratori H., Hamada H. 2007. "Haemodynamics determined by a genetic programme govern asymmetric development of the aortic arch", *Nature*, 450(7167): 285-8.
- Yoshigi M., Hoffman L. M., Jensen C. C., Yost H. J., Beckerle M. C. 2005. "Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement", *J Cell Biol*, 171(2): 209-15.
- Zhao M., Sachs P. C., Wang X., Dumur C. I., Idowu M. O., Robila V., vd. 2012. "Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type", *Cancer biology & therapy*, 13(9): 782-92.
- Zhou X. L., Batiza A. F., Loukin S. H., Palmer C. P., Kung C., Saimi Y. 2003. "The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(12): 7105-10.
- Zutter M. M., Mazoujian G., Santoro S. A. 1990. "Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast", *Am J Pathol*, 137(4): 863-70.
- Zutter M. M., Santoro S. A., Staats W. D., Tsung Y. L. 1995. "Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16): 7411-5.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. ENGİN ÖZÇİVİCİ
Proje No:	111M604
Proje Başlığı:	Mekanik Titreşimlerin Meme Kanseri Hücrelerinin Davranışlarına Etkisi
Proje Türü:	3501 - Kariyer
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	ÖZDEN YALÇIN ÖZUYSAL
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. MAKİNE MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2012 - 01/05/2015
Onaylanan Bütçe:	297000.0
Harcanan Bütçe:	201347.1
Öz:	<p>Her geçen gün artan epidemiyolojik bulgular fiziksel egzersizin kanser üzerinde, özellikle meme, prostat ve kolon kanserlerinde önleyici bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Varolan bulgulara rağmen kanser ve fiziksel egzersiz arasındaki etkileşimin biyolojik mekanizması hücre kültürü ve hayvan deneyleriyle ortaya çıkarılamamıştır. Tıbbi literatür egzersizin kanser üzerindeki önleyici etkisini sistemler bazında oluşan bağışıklık, metabolik aktivite, dolaşımdaki hormonlar ve vücuttaki yağ oranları ile açıklamaya çalışmaktadır. Buna rağmen, mekanik kuvvetlerin sağlıklı hücreler üzerindeki düzenleyici etkisi düşünüldüğünde bu etkilerin kanserli hücreler üzerinde de etkin olabileceğinden şüphelenilmektedir. Mekanik kuvvetleri kanser hücrelerinin üreme ve organizasyon özelliklerini kontrol etmek için kullanma düşüncesi alternatifleri göz önüne alındığında (örneğin kemoterapi, ışın tedavisi) yan etkilerinin yokluğu ve sinyallerin doğallığı sebebiyle oldukça avantajlıdır. Bu konuda yeterli bilimsel çalışma olmamakla beraber aynı zamanda kanser dokusu (tümör) mikroçevresi düşünüldüğünde bazı engeller ortaya çıkmaktadır. Tümörde hücre dışı matrisi sağlıklı dokulara göre daha sertken, kanser hücreleri bozulan altyapısal özellikleri sebebiyle sağlıklı hücrelere göre çok daha yumuşaktır. Bu yüzden tümör dokularında oluşan kuvvetler ?stress shielding? adı verilen prensip sebebiyle hücreleri değil daha sert olan hücre dışı matrisin yüklenmesini sağlarlar. Önerilen projede bu durumun önüne geçilmek için kanser hücreleri matriste oluşan kuvvetlerden bağımsız ve Newton prensipleriyle, yani ivmelenen kütlede oluşan kuvvetler sayesinde yüklenmeye maruz bırakılacaktır. Mekanik titreşimler aracılığı ile iletilecek bu kuvvetler daha önceki çalışmalarda gösterildiği üzere sağlıklı kemik, kas ve tendon gelişimini etkilediği bilinmektedir. Ayrıca titreşime dayalı bu tarz mekanik kuvvetler kemik iliğindeki kök hücre karar mekanizmalarını etkileyerek onları yağdan ziyade kemik oluşumuna yönlendirmektedirler.</p> <p>Bu projede genel olarak kanser hücrelerinin, özelde ise meme kanseri hücrelerinin dışarıdan girilen mekanik titreşimlere duyarlı olacağı ve onlara tepki göstereceği hipoteze edilmiştir. Bu hipotez hücrelerin üremesine, döngüsüne, ölümlerine, istilasına, altyapısına olan etkileri kontrollü deneyler sayesinde test edilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Mekanik sinyal, Meme Kanseri, Hücre iskeleti, Fiziksel Egzersiz
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır