






İnsan diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin meme kanseri kök hücreleri üzerine etkisi

Effect of human dental pulp derived mesenchymal stem cells on breast cancer stem cells

Gizem İnetiş Yengin¹  Öykü Gönül Geyik³  Hüsnü Alper Bağrıyanık^{4,5} 
Zeynep Yüce⁶  Gülperi Öktem^{1,2} 

¹ Ege Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³ İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁵ İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG) İzmir, Türkiye

⁶ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Kanser kök hücreleri; kendini yenileyebilen, farklılaşma kapasitesi yüksek ve uzun süreli proliferasyon ile normal dokuya invazyon kabiliyeti olan hücrelerdir. Bu yetenekleriyle geleneksel kanser tedavisine direnç oluşturarak tümör büyümesi ve metastazda rol oynar. Başarılı kanser tedavileri için kanser kök hücre mekanizmalarına yönelik araştırmalar yapmak önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, insan diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin meme kanseri kök hücreleri üzerine etkisinin hücre canlılığı, hücre döngüsü ve apoptoz yöntemleriyle araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Meme kanseri hücreleri (MCF7) akış sitometrisi ile CD44⁺/CD24⁻ boyaması yapılarak ayrılmıştır. CD44⁺/CD24⁻ popülasyonuna meme kanseri kök hücresi denilmiştir. Diş pulpasından izole edilen mezenkimal kök hücreler kültüre edilip karakterizasyonu yapılmıştır. Mezenkimal kök hücre grubu mCitrine, meme kanseri kök hücresi grubu ise mCherry ile plazmit transfeksiyonu yapılarak işaretlenmiştir. Bu hücreler 48 saat boyunca ko-kültüre edilmiş ve sonrasında hücre canlılığı, hücre döngüsü ve apoptoz analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile ko-kültüre edilen meme kanseri kök hücrelerinin kontrol grubuna göre hücre canlılığı, hücre döngüsü ve apoptoz değerlerinde zamana bağlı olarak istatistiksel anlamlı değişiklikler görülmüştür. Ko-kültüre grubu kontrole göre kıyaslandığında zamana bağlı olarak G0/G1 evresinde artış gözlenmiştir. Ko-kültüre edilen hücrelerin floresan mikroskop ile yapılan incelemesinde sarı floresan işaretli hibrit hücreler gözlenmiştir ve immüno-floresan Ki67 boyamasında hücre sayısında azalma gözlenmiştir.

Sonuç: Ko-kültür sonrası diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin meme kanser kök hücreleri üzerinde hücre proliferasyonunu inhibe edici etkileri olduğu ve apoptozu teşvik ettiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, meme kanser kök hücreleri üzerinde diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tedaviye yönelik bir etkisi olabilir.

Anahtar Sözcükler: Meme kanseri, kanser kök hücresi, mezenkimal kök hücre, diş pulpası kök hücresi, ko-kültür.

ABSTRACT

Aim: Cancer stem cells are cells that can renew themselves, have a high differentiation capacity and have the ability to invade normal tissue with long-term proliferation.

Sorumlu yazar: Gizem İnetiş Yengin
Ege Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Kök Hücre
Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
E-posta: gizeminetas@gmail.com

Başvuru tarihi: 06.12.2022 Kabul tarihi: 09.03.2023

With these abilities, it plays a role in tumor growth and metastasis by creating resistance to traditional cancer treatment. It is important to conduct research on cancer stem cell mechanisms for successful cancer treatments. The aim of this study is to investigate the effects of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells on breast cancer stem cells by cell viability, cell cycle and apoptosis methods.

Materials and Methods: Breast cancer cells (MCF7) were separated by flow cytometry with CD44+/CD24- staining. The CD44+/CD24- population was called breast cancer stem cells. Mesenchymal stem cells isolated from dental pulp were cultured and characterized. Mesenchymal stem cell group was labeled with mCitrine and breast cancer stem cell group with mCherry by plasmid transfection. These cells were co-cultured for 48 hours and then cell proliferation, cell cycle and apoptosis analyzes were performed.

Results: Statistically significant changes were observed in cell viability, cell cycle and apoptosis values of breast cancer stem cells co-cultured with dental pulp-derived mesenchymal stem cells compared to the control group over time. When the co-culture group was compared to the control, an increase in the G0/G1 stage was observed depending on time. Yellow fluorescent-labeled hybrid cells were observed in the examination of co-cultured cells with fluorescent microscope, and a decrease in cell number was observed in immunofluorescent Ki67 staining.

Conclusion: When mesenchymal stem cells from dental pulp were co-cultured with breast cancer stem cells, an increase in the G0/G1 stage of breast cancer stem cells was observed depending on time. After co-culture, it has been observed that dental pulp-derived mesenchymal stem cells have cell proliferation inhibitory effects on breast cancer stem cells and promote apoptosis. In conclusion, dental pulp derived mesenchymal stem cells may have a therapeutic effect on breast cancer stem cells.

Keywords: Breast cancer, cancer stem cell, mesenchymal stem cell, dental pulp stem cell, co-culture.

GİRİŞ

Meme kanseri, 2020 yılı dünya kanser insidansına göre tüm kanser vakalarının %11,7'sini oluşturarak tahmini 2,3 milyon yeni vaka ile akciğer kanserini de geçerek dünya genelinde en yaygın tanı konulan kanserdir (1). Dünya genelinde kadınlarda, özellikle beyaz ırkta en sık görülen kanser çeşidi olmakla beraber (2), Türkiye'de de en çok görülen kanser türüdür (3). Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %44,5'i 50-69 yaş arasında, %40,4'ünün ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir (3).

Son yirmi yılda yapılan kanser çalışmalarına bakıldığında; dokulardaki tümör yapılarında küçük bir alt popülasyon olarak bulunan, kök hücre benzeri özellikler gösteren hücreler tanımlanmış ve bu hücrelere kanser kök hücresi (KKH) ismi verilmiştir (4, 5). KKH'lerin kendini yenileyebilme ve farklılaşma kapasitesi, uzun süreli proliferasyon ve normal dokuya invazyon kabiliyeti, anjiyogenez oluşumu, bağışıklık sisteminden kaçma ve geleneksel anti-kanser tedavisine direnç oluşturma yollarıyla tümör büyümesine ve nüks etmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (6). Mikro-çevrede immün hücreler, çeşitli doku-spesifik parankimal hücreler, nöral hücreler, endotel hücreler, fibroblastlar ve multipotent progenitör hücreler bulunmaktadır (7).

Bu kanser progenitör hücrelerini hedefleyecek farklı sinyal iletim yollarının kullanılması, nüks kabiliyeti olan agresif kanserler için hedeflenen terapötik tedavilerin geliştirilmesi mikro-çevre odaklı yaklaşımlar ile mümkün olabilir (8). Bu nedenle, başarılı kanser tedavileri için KKH'lerin tamamen ortadan kaldırılması oldukça önemlidir (9). KKH'ler ile buldukları niş arasındaki ilişkiyi ve tedaviye verilen yanıt ve direnç mekanizmalarını anlamak yeni terapötik tekniklerin ve kanser tedavisi stratejilerinin bulunmasına yardımcı olabilir (9).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) çoğu dokuda bulunabilen, kendini yenileme ve farklılaşma kapasitelerine sahip önemli bir kök hücre benzeri hücre popülasyonudur (10). Kemik iliği, kas, yağ, diş pulpası, kordon kanı, plasenta, amniyon sıvısı, periferik kan gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir (10). Kanser araştırmalarında da kullanılmaya başlanan MKH'ler, kanserli dokulara sistemik olarak verildiğinde kanserli dokuya migrasyon ve invazyon yaptığı ve burada dokuya karşı savunma mekanizması geliştirdiği gösterilmiştir (11). MKH'ler ayrıca, inflamatuvar süreçlerin modülasyonu, anjiyogenez, metastaz, KKH oluşumu ve tümör büyümesi dahil olmak üzere kanser oluşumunda kritik rollere sahiptir (12, 13). MKH'lerin migrasyon yetenekleri, klinik

uygulamalarda kullanılmalarına izin verir, ancak MKH migrasyonu kemokinler ve reseptörlerle ilgilidir, bu da diğer yardımcı hücrelerin tümörlere transferini de destekler (14). Tümör hücreleri ile MKH'lerin karşılıklı iletişimleri sonucunda metastatik potansiyeli ve epitelyal-mezenkimal geçişi arttırdığı gösterilmiştir (13). MKH'lerin tümör gelişiminde, hem tümör oluşumunu teşvik eden hem de tümörü baskılayan farklı görev ve özelliklerinin olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (15, 16). Literatürdeki farklı kanser türlerinde MKH uygulamalarıyla tümörün teşvik edilmesi/ baskılanması farklılıkları sebebiyle bu çalışmada meme KKH'leri ile diş pulpasından kökenlenen mezenkimal kök hücreleri (DPKH) ko-kültüre edilerek oluşturulan popülasyondaki değişimlerin incelenmesi hedeflenmiştir.

DPKH'ler biyolojik atık materyal olan 3. molar dişlerden elde edilen, kolay bulunabilirliği ve yüksek kök hücre içeriği nedeniyle tercih edilen bir MKH kaynağı olarak ortaya çıkmıştır (17). Özellikle biyolojik olarak güvenli olması ve etik problemler teşkil etmemesi sebebiyle rejeneratif tıpta önemli bir yere sahiptir (18). Kemik iliği gibi diğer MKH elde etme yöntemlerine göre daha az girişimsel olması ve etik sorunlar taşımaması, allojenik transplantasyon uygulamalarına uygunluğu sebebiyle DPKH'ler tercih edilebilir (17). Diş pulpasından MKH izolasyonu 20 yıldan fazladır uygulanan bir yöntem olup (19), DPKH'ler ile prostat, meme, kolorektal ve baş-boyun kanserlerine yönelik araştırmalar mevcuttur (15, 20-22).

Hücre kanibalizmi kanser biyolojisinde bir asırdır çalışılan ve ökaryotik canlılarda evrimsel olarak korunmuş bir sistemdir (23). En basit tanımıyla bir hücrenin kendine benzeyen ya da farklı bir tipteki hücreyi yemesi/ hücre içine almasıyla oluşan duruma hücre kanibalizmi denir (15). Hücre kanibalizminin kanser mikro-çevresi ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (24-26). Kanser hücrelerinin kendi türü ve farklı tipteki hücreleri canlı olarak kanibalizme uğrattığı gösterilmiştir (27). Buna ek olarak meme kanseri ve kolorektal kanser çalışmalarında mitotik entoz gözlenmiştir (25). Mitotik entoz, sağlıklı hücrelerde görülmeyip kanser hücrelerinde görülen, bir hücrenin başka bir hücrenin sitoplazmasına girmesi durumudur (28). Mitotik entoz epitel hücre kanibalizmine sebep olur (25). Hücre kanibalizmi bir hücrenin başka bir hücreyi canlı olarak sindirmesi olduğundan; fagositoz, emperipolezis ya da mitotik entoz gibi diğer hücre içine alma yöntemlerinden farklı bir durum

olduğunu belirtilmiştir (27). Bu araştırmada, meme KKH ile DPKH'lerin birlikte var olan davranışlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Ko-kültüre edilen bu hücrelerin birbiriyle olan iletişiminin hücre döngüsü ve hücre apoptozu üzerindeki etkileri incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre kültürü

DPKH

Araştırma süresi boyunca yeterli sayıda DPKH için Ege Üniversitesi ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Ağız, Diş ve Çene Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Primer DPKH'ler 18-29 yaş arası sağlıklı, sistemik hastalığı bulunmayan gönüllülerin 3. molar dişlerinden izole edilmiştir. Ege Üniversitesi 20.02.2019 tarihli ve 19-2.1T/41 sayılı etik kurul onayı ile çalışmaya katılan sağlıklı bireylerden çalışmaya ilişkin yazılı bilgilendirilmiş onay alınmıştır.

DPKH için çekime uygun olan sağlıklı adaylara işlem öncesi %0,2 klorheksidin ile gargara yaptırılmıştır (29). Dişin etrafındaki periyodontal yapılar uzaklaştırılmış ve diş povidon-iyot (PVP-I) antiseptiğinde ile 1 dakika bekletilmiştir. Dişlerin yüzeyinde iyota bağlı oluşan artıkları uzaklaştırmak için dişler %70'lik etil alkol ve sonrasında 1X PBS tamponuyla yıkanmıştır. Pulpanın zarar görmemesi için steril gazlı bezle sarılarak diş kırılmıştır ve pulpa dokusu ayrılmıştır. Mekanik parçalama sonrası pulpa dokusu %10 FBS, 100 µg/ml Pen/Strep eklentili Mem- α besisi ile hücre ekimi yapılmıştır. Hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücre besisi yeri 2-3 günde değiştirilerek taze besisi yeri eklemesi yapılmıştır. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır. Deneylerde 3. ve 4. pasajdaki DPKH hücreleri kullanılmıştır.

Meme KKH

Çalışmada insan meme KKH eldesi için MCF7 adenokarsinoma hücre hattı (HTB-22, ATCC, ABD) kullanılmıştır. Bu hücreler %10 FBS, 100 µg/ml Pen/Strep ve L-Glutamin içeren RPMI 1640 besisi ortamı kullanılmıştır. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ nem içeren inkübatörde çoğaltılmıştır ve yoğunluk %80 ve üzeri olduğunda hücreler CD44⁺/CD24⁻ biyobelirteçleri ile Floresan Aktif Hücre Ayırma (FACS Aria II, Becton Dickenson, ABD) işlemine hazırlanmıştır.

Akış Sitometrisi

DPKH'lerin karakterizasyon analizi için CD31, CD34, CD44, CD45, CD90 ve CD105 (Santa Cruz Biotechnology, ABD) yüzey belirteçleri

kullanılmıştır (30). Sekonder belirteç olarak Alexa Fluor 594 ve FITC (Jackson ImmunoResearch, ABD) kullanılmıştır. FITC CD44 ve PE CD24 yüzey belirteçleri (Miltenyi Biotec, Almanya) MCF-7 meme KKH için kullanılmıştır. %0,25 Tripsin/EDTA ile kaldırılan hücreler içerisinde %1 BSA (Bovin serum albümin) bulunan tampon ile yıkanmıştır. Hücreler 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde $1 \mu\text{L}$ yüzey belirteçlerinden eklenerek karanlık ortamda $+4^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında peletler dPBS ile yıkanarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak tekrar %1 BSA ve $1 \mu\text{L}$ ikincil antikor ile $100 \mu\text{L}$ soğuk dPBS eklenmiştir. Tüm analizler Accuri C6 (Becton Dickenson, ABD) ile ölçülmüş ve FACS Aria II (Becton Dickenson, ABD) ile hücrelerin ayrımı yapılmıştır.

MCF7 hücreleri $\text{CD44}^+/\text{CD24}^-$ biyobelirteçlerine göre pozitif olan grup toplanmıştır ve bu grup MKKH olarak adlandırılmıştır. İzole edilen hücreler, %1 FBS, L-Glutamin ve $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ Pen/Strep içeren RPMI-1640 besi ortamında çoğaltılmıştır.

DPKH'lerin Adipojenik, Kondrojenik ve Osteojenik Farklandırılması

Farklandırma yöntemi için adipojenik, kondrojenik ve osteojenik gruplar için 6 kuyulu plakaların her bir kuyusuna 15 mm yuvarlak lameller üzerine 1×10^4 DPKH ekilmiştir. Farklandırma kitleri kullanılarak Adipojenik: A1007001, Kondrojenik: A1007101, Osteojenik: A1007201, Gibco, ABD) kullanılarak bazal besiyeri ve eklentiler üreticinin protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 sağlayan ortamda hücreler 3 hafta kültüre edilmiştir. Besiyeri 2-3 günde bir değiştirilmiştir (31). 3. hafta sonunda yüzeye kaplanan hücreler besiyeri uzaklaştırılarak dPBS ile yıkanmıştır. Hücreler %4 PFA içeren solüsyonda oda sıcaklığında 30 dakika fikse edilmiştir. PFA uzaklaştırıldıktan sonra hücreler dH_2O ile yıkanmıştır. Adipojenik grup için suyun ortamdaki uzaklaştırılmasından sonra oda sıcaklığında beş dakika boyunca %60 izopropanol ile yıkanmıştır. Yüzey kurutulup izopropanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra %0,5 Oil Red O (O0625, Sigma Aldrich, Almanya) eklenerek on dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (32). Boya uzaklaştırıldıktan sonra yüzey distile su ile yıkanmıştır. Kondrojenik farklandırma grubunda fiksasyon sonrası %1 Alsiyan Mavisi (B8438, Sigma Aldrich, Almanya) oda sıcaklığında eklenmiştir (32). Örnekler karanlıkta 30 dakika 100 rpm 'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası boya

uzaklaştırılmış ve $0,1\text{N}$ HCl çözeltisi ile yıkanmış ve sonrasında distile su ile yıkaması yapılarak lama kapatılmıştır. Osteojenik grupta ise fiksasyon sonrası %2 Alizarin Kırmızısı (A5533, Sigma Aldrich, Almanya) oda sıcaklığında eklenmiştir (32). 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası boya çekilerek distile su yıkaması yapılmıştır. Bütün örnek grupları inverted faz kontrast mikroskopunda (Olympus Medical Systems Corp, Japonya) görüntülenmiştir.

Plazmit eldesi ve Transfeksiyon İşlemi

Ko-kültürlerde hücre popülasyonlarının ayırt edilmesi için DPKH ve meme KKH hücrelerinin floresan etiketlemesi için neomisin ve kanamisin direnç geni içeren mCitrine-N1 (54594) ve mCherry-N1 (54517) 2. nesil bir lentiviral SIN vektörleri kullanılmıştır. Plazmitler *E.coli* bakterisi DH5 α (E003, abm, Kanada) suşunda üreticinin önerdiği protokole çoğaltılmıştır. Plazmitlerin çoğaltma işleminde besiyeri olarak LB Broth (L3152, Sigma Aldrich, Almanya) içerisine Kanamisin Sülfat (sc-257635, Santa Cruz Biotechnology, ABD) eklenerek çalkalamalı su banyosunda 120 rpm ve 37°C 'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Plazmitlerin izolasyonu için Endofree Plasmid Maxi Kit (12362, Qiagen, Çin) kullanılmıştır. İzolasyon sonrası DNA miktarı ve saflık tayini Multiskan Go Spectrum (ThermoFisher Scientific, ABD) ile ölçülmüştür. İzolasyonu yapılan plazmitlerin DPKH, MKKH transfeksiyonu için Lipofectamine 2000 (11668019, ThermoFisher Scientific, ABD) ajanı kullanılmıştır.

Plazmit Transfeksiyonu ile İşaretlenen Hücrelerin Ko-kültüre Edilmesi

Hücrelerin canlılık ve sayımı için Count and Viability test kiti (MCH100102, Merck Millipore, Almanya) kullanılarak analizi yapılmıştır. DPKH ile MKKH'ler 1:1 oranda ekimleri yapılmıştır ve 1:1 besiyeri içerikleriyle ko-kültüre edilmiştir (15, 20). Her hücre grubundan 5×10^4 hücre olmak üzere ko-kültüre olan hücrelerin toplam sayısı 1×10^5 olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ko-kültüre edilen hücrelerin görüntülenmesi floresan mikroskobu (Olympus IX71, Olympus Medical Systems Corp, Japonya) ile 24. ve 48. saatlerde yapılmıştır.

Hücre Döngüsü

Muse Cell Cycle Kit (MCH100106, Merck Millipore, Almanya) kullanılarak 24 ve 48. saatlerde toplanan hücrelerden hücre döngüsü analizi yapılmıştır. 6 kuyulu plaklara her kuyuya

total 1×10^5 hücre olacak şekilde hücreler 1:1 oranında ekilerek ko-kültüre edilmiştir. Hücreler %0,25 Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. Sonrasında örnekler 300 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra hücre peleti 1 mL %70 soğuk etanol ile -20°C 'de 3 saat üreticinin protokolüne uygun olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler oda sıcaklığında 300 g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir ve pelet PBS içinde yeniden süspansiyon edilmiştir. Hücreler tekrar oda sıcaklığında 5 dakika 300 g'de santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti 200 μL Muse hücre döngüsü reaktifi içinde yeniden süspansiyon edilerek karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir (33). Sonuçlar için Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında ölçümleri yapılmıştır.

Apoptoz Ölçümü

Apoptoz için Muse Annexin V & Dead Cell Kit (MCH100105, Merck Millipore, Almanya) kullanılmıştır ve 24 ve 48. saatlerde analizi yapılmıştır. 6 kuyulu plakalara her kuyuya total 1×10^5 hücre olacak şekilde hücreler 1:1 oranında ekilerek ko-kültüre edilmiştir. Hücreler %0,25 Tripsin-EDTA ile tripsinizasyon işlemi yapılmıştır ve hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüplerine 100 μL pellet ve 100 μL Muse Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilmiştir (34). Sonuçlar için Muse cihazında ölçümleri yapılmıştır.

Hücre Proliferasyonu

Hücre proliferasyonu için DPKH ve MKKH grubu 48 saat ko-kültüre edilmiş ve sonrasında immüno-floresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak MKKH hücreleri kullanılmıştır. Deney grupları 6 kuyulu plakaların içine yerleştirilen lameller üzerine bir gün önceden 3×10^4 hücre ekimi yapılmıştır. Ertesi gün yüzeye oturan hücrelerin süpernatantı uzaklaştırılıp 1mL dPBS ile 5 dakika yıkama yapılmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 1 mL %4 PFA çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilerek fikse edilmiştir (15). Fiksasyon işleminden sonra tekrar PBS yıkaması yapılmıştır. PBS uzaklaştırılıp hücrelere 1mL dPBS içinde hazırlanmış %0,25 Triton X-100 solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tekrar PBS yıkaması yapılan hücrelere %1 BSA bloklayıcı solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat

bekletilmiştir. Sonrasında örnekler 1/100 oranında dilüe edilmiş Ki67 (ab16667, Abcam, Birleşik Krallık) biyobelirteci ile boyanmış ve örnekler bir gece $+4^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün PBS yıkaması ile primer antikor uzaklaştırılmıştır ve FITC bağlı sekonder antikor (ab98692, Abcam, Birleşik Krallık) 1:200 dilüsyon ile dPBS içerisinde çözülüp eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler tekrar dPBS ile yıkanmıştır. Son aşamada ortamdaki PBS uzaklaştırılıp hücrelere DAPI (sc-24941, Santa Cruz Biotechnology, USA) eklenerek lamaların üzerine kapatılmıştır, floresan mikroskopta (Olympus BX 50, Olympus Medical Systems Corp, Japonya) görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

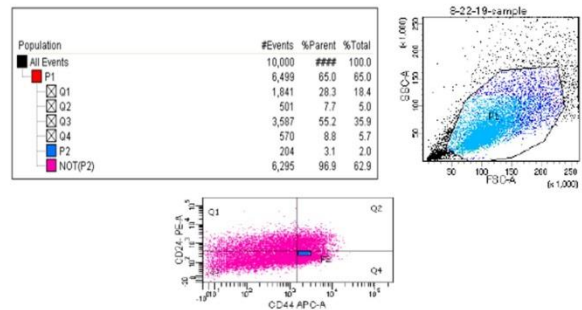
İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 9.3.0 kullanılarak Two-way ANOVA ve student- t testi yapılmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir. 0.01-0.05 değerler arası "**", 0.001- 0.01 arası "***", 0.0001-0.001 arası "****" ve <0.0001 'den küçük değerler "*****" olarak gösterilmiştir.

BULGULAR

CD44⁺/CD24⁻ meme KKH izolasyonu

Çalışmamızda MCF-7 meme kanser hücre hattı kullanılmış olup hücre popülasyonu içerisindeki CD44⁺/CD24⁻ yüzey özelliklerine sahip olan hücreler akış sitometrisi kullanılarak izole edilmiştir (Şekil-1). MKKH grubu %2,0 olarak gösterilmiştir.

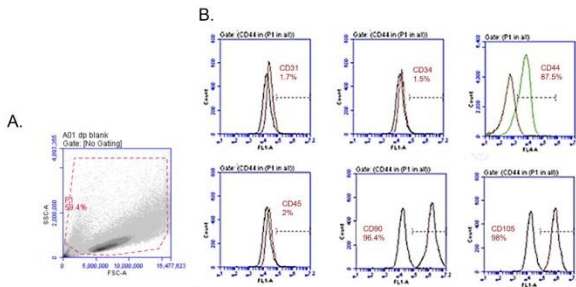


Şekil-1. MCF7 Hücrelerinin Akış Sitometrisi ile CD44⁺/CD24⁻ İşaretlenmesi

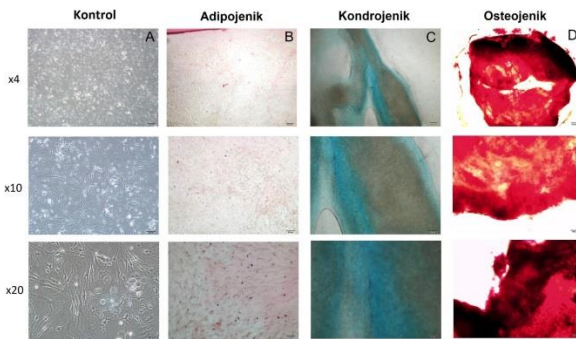
DPKH izolasyonu ve karakterizasyonu

DPKH'ler akış sitometrisi ile analiz edildiğinde belirteçler sırasıyla CD44 %87,5, CD90 %96,4 ve CD105 %98,0 oranındadır. Negatif belirteçler ise CD31 %1,7, CD34 %1,5 ve CD45 %2,0 oranındadır (Şekil-2). Adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farkedirilmesi yapılmış DPKH

hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri Şekil-3'te verilmiştir.



Şekil-2. DPKH'lerin Akış Sitometresi Karakterizasyon Sonuçları A. DPKH akış sitometresi genel hücre popülasyonu B. DPKH akış sitometresi ile CD44, CD31, CD34, CD45, CD90 ve CD105 biyobelirteçleri ifadenmeleri



Şekil-3. DPKH'lerin farklıdırılması A. Kontrol DPKH B. Adipojenik C. Kondrojenik D. Osteojenik farklıdırılması yapılmış grupların x4 (200µM), x10 (100µM) ve x20 (50µM) büyütmede faz-contrast mikroskobu görüntüleri

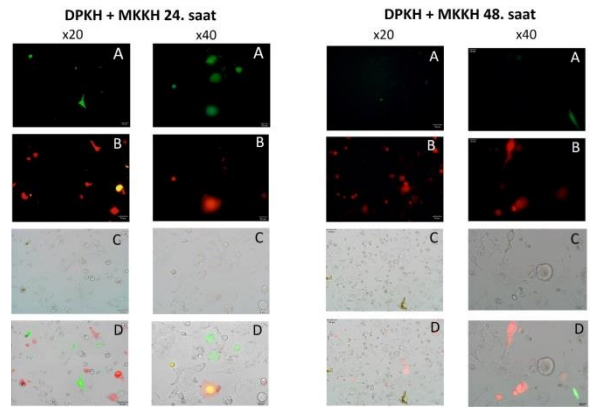
Plazmit Transfeksiyonu ile İşaretlenen Hücrelerin Ko-kültüre Edilmesi

Plazmit transfeksiyonu sonrası işaretlenen hücreler ko-kültüre edilmiştir. DPKH + MKKH hücrelerinin 24 ve 48. saat görüntüleri Şekil 4'te verilmiştir. Ko-kültüre edilen hücrelerin görüntülemesi floresan mikroskobuyla yapılmıştır, aynı alan içerisindeki mCitrine ile işaretli DPKH hücreleri yeşil (Şekil-4A), mCherry ile işaretli MKKH hücreleri kırmızı (Şekil 4B), aynı alanın DIC (Differential interference contrast) görüntüsü (Şekil 4C) ve bu görüntülerin floresan mikroskobu ile birleştirilmiş sonuçları verilmiştir (Şekil-4D).

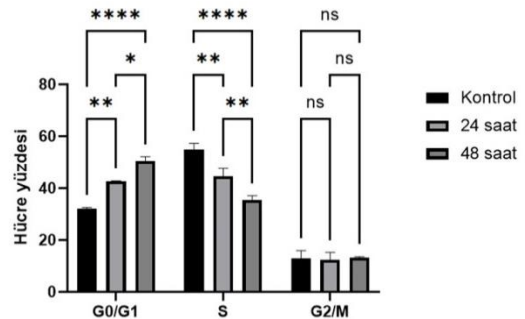
Hücre döngüsü

G0/G1 fazı için ko-kültür grubu kontrol MKKH ile kıyaslandığında p değerleri 24. saat için 0,0029 ve 48. saat için <0.0001 ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil-5). G0/G1 fazı için 24. saat ile 48. saat kıyaslandığında 0,0154 ile

istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. S fazı için ko-kültür grubu kontrol ile kıyaslandığında p değerleri 24. saat için 0.0038 ve 48. saat için <0.0001 ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. S fazı için 24. saat ile 48. saat kıyaslandığında 0.0050 ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. G2/M gruplarında kontrole ve saatler arası kıyaslamaya göre istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir. Bu bilgileri ışığında, kontrol grubu olan MKKH'ye göre DPKH ile muamele edilen ko-kültüre grubunun saate bağlı olarak S fazı yüzdesinin azalıp G0/G1 fazı yüzdesinin arttığı görülmüştür.



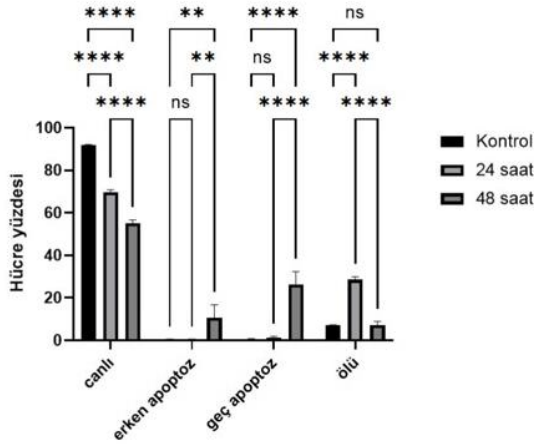
Şekil-4. Ko-kültür edilmiş DPKH + MKKH hücrelerinin 24 ve 48. saat floresan mikroskop görüntüleri Ko-kültür edilmiş hücrelerin x20 (50µM) ve x40 (20µM) büyütmede mikroskop görüntüleri A. mCitrine ile işaretli DPKH hücreleri B. mCherry ile işaretli MKKH hücreleri C. Alanın DIC (Differential interference contrast) görüntüleri D. Alanın floresan mikroskobu ile birleştirilmiş görüntüleri.



Şekil-5. Kontrol MKKH ve ko-kültür edilmiş DPKH + MKKH hücrelerinin 24 ve 48. saat hücre döngüsü sonuçları. 0.01-0.05 değerler arası "*", 0.001- 0.01 arası "**", 0.0001-0.001 arası "***" ve <0.0001'den küçük değerler "****" olarak gösterilmiştir.

Apoptoz

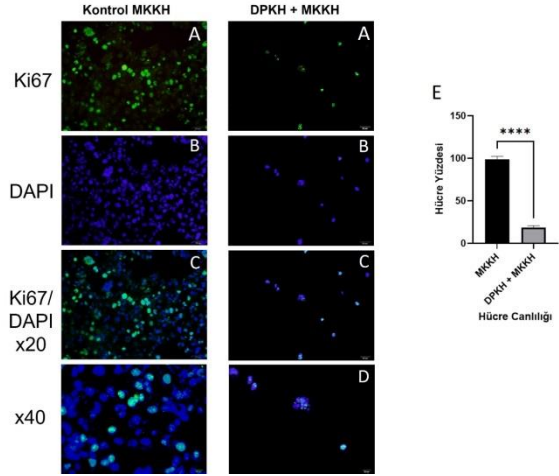
Apoptoz bulgularına bakıldığında ko-kültür grubu kontrol MKKH ile canlılık parametresinde kıyaslandığında p değerleri 24. saat için $<0,0001$ ve 48. saat için $<0,0001$ ve 24. saat ile 48. saat kıyaslandığında hücre canlılığındaki azalma $<0,0001$ ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil-6). Erken apoptoz parametresinde ko-kültür grubu kontrol ile kıyaslandığında p değerleri 24. saat için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır, 48. saat için ise 0,0049 ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu parametrede 24. saat ile 48. saat kıyaslandığında 0,0047 zamana bağlı olarak erken apoptoza giren hücre sayısında ile istatistiksel artış gözlenmiştir. Geç apoptoz parametresinde ko-kültür grubu kontrol ile kıyaslandığında p değerleri 24. saat için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır, 48. saat için ise $<0,0001$ ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu parametrede 24. saat ile 48. saat kıyaslandığında $<0,0001$ ile geç apoptoza giren hücre sayısında zamana bağlı olarak istatistiksel artış görülmüştür. Ölü hücre grubunda ise p değerleri 24. saat için $<0,0001$ ve 48. saat için ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu parametrede 24. saat ile 48. saat kıyaslandığında $<0,0001$ ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bulgular doğrultusunda kontrol grubu MKKH'ye göre DPKH ile muamele edilen ko-kültüre grubunun zamana bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı ve hücrelerin apoptoza girdiği görülmektedir.



Şekil-6. Kontrol MKKH ve ko-kültür edilmiş DPKH + MKKH hücrelerinin 24 ve 48. saat apoptoz sonuçları. 0,01-0,05 değerler arası “*”, 0,001-0,01 arası “***”, 0,0001-0,001 arası “****” ve $<0,0001$ 'den küçük değerler “*****” olarak gösterilmiştir.

Hücre proliferasyonu

Hücre proliferasyonu tayini için Ki67 biyobelirteci kullanılarak immüno-floresan boyama yapılmıştır. 48 saatlik inkübasyonun ardından Ki67 ile boyanan hücrelerde, ko-kültüre grubun hücre sayısında kontrol grubu MKKH'ya göre anlamlı bir azalma görülmüştür (Şekil-7). İki grup birbiriyle kıyaslandığında ko-kültüre grubun hücre sayısındaki azalış $<0,0001$ ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil-7E).



Şekil-7. Kontrol MKKH ve ko-kültür edilmiş DPKH + MKKH hücrelerinin 48. saat sonucundaki proliferasyon sonuçları A. Ki67 B. DAPI C. Ki67/ DAPI birleştirilmiş x20 (50µM) büyütmedeki floresan mikroskopu görüntüleri D. Birleştirilmiş x40 (20µM) büyütmedeki floresan mikroskopu görüntüleri E. Proliferasyon sonuç grafiği. 0.01-0.05 değerler arası “*”, 0.001- 0.01 arası “***”, 0,0001-0,001 arası “****” ve $<0,0001$ 'den küçük değerler “*****” olarak gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Kanser 21. yüzyılda hala önemli bir sistematik hastalık olarak yer almaktadır. Güncel yaklaşımlarda solid tümörler cerrahiyle alınıp kemoterapi ile tedaviler desteklenmektedir (5). Uygulanan tedavi yöntemlerine rağmen, var olan tümörün agresyonuna sebebiyet veren yaklaşık %2'lik KKH popülasyonunun mikro-metastazı başlattığı düşünülmektedir (5, 16). KKH'lerin diğer hücreler ve tedavi ajanları ile olan etkileşim mekanizmalarını anlayarak yeni kanser tedavi yaklaşımları geliştirebilir (9). Buradan yola çıkarak bu çalışmada MCF7 meme kanseri hücre hattının KKH grubuna DPKH uygulaması ile

hücre döngüsü, hücre canlılığı ve apoptoz üzerinden incelenmiştir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) 1970'lerde keşfedilmiştir (35) ve günümüzde nöronal, kemik, karaciğer hastalıkları, böbrek hastalıkları, kalp hastalıkları, otoimmün hastalıklar, yara iyileşmesi, diyabet ve organ nakillerinde direkt ya da dolaylı olarak rejeneratif tıpta kullanımları bulunmaktadır (36, 37). Atık materyal olan 3. molar dişlerin kök hücre bakımından zengin ve izolasyon kolaylığı sağlaması açısından değerlendirilmesi önemlidir (38). Literatürde DPKH ile kanser hücrelerinin ko-kültüre edildiği çalışmalar bulunmaktadır (15, 20, 39). MKH'lerin MCF-7 hücre hattı üzerinde proliferasyonu baskılayan etkisi olduğu ve ko-kültür edilmesiyle meme kanseri hücrelerinin kanibalizm ile MKH'leri yok ettiği görüşü belirtilmiştir (15, 40). Benzer başka bir *in vitro* çalışmada göbek kordonu kökenli MKH ile MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin ko-kültüründe 3 ile 6 gün arasında yapılan gözlemlerde işaretli hücrelerde hibrit hücreler olduğu gözlenmiştir (41). Çalışmamızda ise DPKH hücreleri mCitrine ile MKKH hücreleri ile mCherry ile işaretlenmiştir. Hücreler ko-kültüre edilip floresan mikroskopunda 24 ve 48. saatlerde incelenmiştir. Çalışmamızdaki Şekil 4'te bulunan 24. saat görüntülerinde yeşil (Şekil 4A) ve kırmızı (Şekil 4B) işaretli hücrelerin birbiriyle oluşturduğu hücre-hücre iletişimiyle beraber sarı işaretli (Şekil 4D) hücre kümeleri izlenmiştir. Bu iki floresan ışımı da gösteren hücreler, hücre-hücre iletişiminden kaynaklanan hibrit hücreler olabilir ya da MKKH tarafından kanibalizme uğramış DPKH hücreleri olabileceğini düşündürmüştür. Sonuçlar literatürde daha önce yapılan çalışmalar (15, 41) ile korele görülmüştür. Başka bir çalışmada MKH'lerden kökenlenen ekstraselüler veziküller ile MCF7 hücre hattı etkileşimine kemik iliği nişinde meme kanseri metastazı oluşturulmuştur (42). Burada MCF7 hücrelerinin sadece MKH türevli ekstraselüler veziküller (EV) ile tedavi edilmesiyle MKH-EV'lerinin MCF7 hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ve adezyonu arttırdığı gösterilmiştir (42).

Kaynaklar

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians [Internet]. 2021 Feb 4;71(3):209–49.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2017 Jan;67(1):7–30.

Proliferasyon belirteci olan Ki67 ile bakılan hücrelerin MKH ile girdiği etkileşim sonrası proliferasyonun azaldığı ve meme kanseri hücrelerinin dormansi sürecine girdiği gösterilmiştir (15, 43). Literatürdeki bu sonuçlar, çalışmamızdaki Şekil 5 ve Şekil 7 ile uyumludur. MKH'lerin tümör hücrelerini G0/G1 fazında tutabildiği önceki çalışmalarda gösterilmiştir (44). MKH'ler, hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan proteinlerin, anjiyogenez reseptörlerinin ve pro-apoptotik proteinlerin ifadenmesini düzenleyerek hücre ölüm mekanizmalarını aktive edebilir (45). Bizim çalışmamızda da literatürle benzer olarak, ko-kültüre grup kontrol ile kıyaslandığında zamana bağlı hücre canlılığında azalma, hücre döngüsünde S fazından G0/G1 fazına geçişte artış (Şekil 5) ve apoptoz giren hücre sayısında artış (Şekil 6) görülmüştür.

SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar DPKH ile ko-kültüre edilen MKKH'lerin KKH hedeflenmesinde kullanılabileceğini göstermektedir. MKH'ler, tümörögenез ve ilaç direncinde önemli bir rol oynamaktadır ve çeşitli yollarda da yer alır (46). MKH'lerin hem tümör oluşumunu teşvik edici hem de tümör baskılayıcı özelliklerinin anlaşılabilmesi için KKH-MKH ilişkisinin açıklanması önemlidir. Bu çalışma DPKH varlığının MKKH hücre çoğalması üzerindeki engelleyici etkisini göstermesiyle özgündür. Çalışmanın *in vitro* olması sebebiyle tümör mikro-çevresi ve immünojenitesinden yoksun olmasından kaynaklanan limitasyonları mevcut olsa da, KKH-MKH ve tümör mikro-çevresindeki değişimlerin daha detaylı araştırılmasına dikkat çekerek yeni çalışmalara fikir sunabilir.

Çıkar çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Teşekkür: Çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi TYL-2019-20624 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Çalışmada dental pulpa temini katkılarından dolayı Dr. Dt. İlkay Aydoğdu ve Doç.Dr. Onur Şahin'e teşekkür ederiz.

3. Şencan, İ., & Keskinliç, B. Türkiye kanser istatistikleri. TC Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2017; 19-44.
4. Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Oct 3;121(10):3804–9.
5. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Molecular Cancer* [Internet]. 2017 Feb 1;16(1).
6. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nature medicine* [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 15];23(10):1124–34.
7. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*. 2012 Dec 1;125(23):5591–6.
8. Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007 Sep;11(5):981–1011.
9. Abugomaa A, Elbadawy M. Patient-derived organoid analysis of drug resistance in precision medicine: is there a value? *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. 2020 Jan 2;5(1):1–5.
10. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*. 2011 May 14;9(1).
11. Heldring N, Mäger I, Wood MJA, Le Blanc K, Andaloussi SEL. Therapeutic Potential of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles. *Human Gene Therapy* [Internet]. 2015 Aug;26(8):506–17
12. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct;449(7162):557–63.
13. López de Andrés J, Griñán-Lisón C, Jiménez G, Marchal JA. Cancer stem cell secretome in the tumor microenvironment: a key point for an effective personalized cancer treatment. *Journal of Hematology & Oncology*. 2020 Oct 15;13(1).
14. Liang W, Chen X, Zhang S, Fang J, Chen M, Xu Y, et al. Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2021 Jan 20;26(1).
15. Bartosh TJ, Ullah M, Zeitouni S, Beaver J, Prockop DJ. Cancer cells enter dormancy after cannibalizing mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Oct 3;113(42):E6447–56.
16. Luo M, Brooks M, Wicha M. Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Breast Cancer Stem Cells: Implications for Metastasis and Therapeutic Resistance. *Current Pharmaceutical Design*. 2015 Feb 3;21(10):1301–10
17. Patil VR, Kharat AH, Kulkarni DG, Kheur SM, Bhonde RR. Long term explant culture for harvesting homogeneous population of human dental pulp stem cells. *Cell Biology International*. 2018 Nov 22;42(12):1602–10.
18. Nakashima M, Iohara K, Murakami M. Dental pulp stem cells and regeneration. *Endodontic Topics*. 2013 Mar;28(1):38–50.
19. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000 Nov 21;97(25):13625–30.
20. Doğan A, Demirci S, Apdik H, Apdik EA, Şahin F. Dental pulp stem cells (DPSCs) increase prostate cancer cell proliferation and migration under in vitro conditions. *Tissue and Cell*. 2017 Dec;49(6):711–8
21. Nikkhah E, Kalalinia F, Asgharian Rezaee M, Tayarani-Najaran Z. Suppressive effects of dental pulp stem cells and its conditioned medium on development and migration of colorectal cancer cells through MAPK kinase pathways. *Iranian journal of basic medical sciences* [Internet]. 2021;24(9):1292–300.
22. Merckx G, Lo Monaco M, Lambrechts I, Himmelreich U, Bronckaers A, Wolfs E. Safety and Homing of Human Dental Pulp Stromal Cells in Head and Neck Cancer. *Stem Cell Reviews and Reports* [Internet]. 2021 Oct 1;17(5):1619–34.
23. Borensztein K, Tyrna P, Gawel AM, Dziuba I, Wojcik C, Bialy LP, et al. Classification of Cell-in-Cell Structures: Different Phenomena with Similar Appearance. *Cells* [Internet]. 2021 Sep 28;10(10):2569.
24. Fais S, Overholtzer M. Cell-in-cell phenomena in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018 Nov 12;18(12):758–66.

25. Durgan J, Florey O. Cancer cell cannibalism: Multiple triggers emerge for entosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2018 Jun;1865(6):831–41
26. Wang X, Li Y, Li J, Li L, Zhu H, Chen H, et al. Cell-in-Cell Phenomenon and Its Relationship With Tumor Microenvironment and Tumor Progression: A Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2019 Dec 3;7
27. Sharma N, Dey P. Cell cannibalism and cancer. *Diagnostic Cytopathology*. 2010; 39(3), 229-233
28. Durgan J, Tseng Y-Y, Hamann JC, Domart M-C, Collinson L, Hall A, et al. Mitosis can drive cell cannibalism through entosis. Yap A, editor. *eLife [Internet]*. 2017 Jul 11;6:e27134.
29. Raoof M, Yaghoobi MM, Derakhshani A, Kamal-Abadi AM, Ebrahimi B, Abbasnejad M, et al. A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dental research journal [Internet]*. 2014;11(2):244–50.
30. Al Madhoun A, Sindhu S, Haddad D, Atari M, Ahmad R, Al-Mulla F. Dental Pulp Stem Cells Derived From Adult Human Third Molar Tooth: A Brief Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology [Internet]*. 2021 Oct 12;9:717624.
31. Alsulaimani RS, Ajlan SA, Aldahmash AM, Alnabaheen MS, Ashri NY. Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation. *Saudi Medical Journal [Internet]*. 2016 May;37(5):551–60.
32. Al-Habib M, Huang GT-J . Dental Mesenchymal Stem Cells: Dental Pulp Stem Cells, Periodontal Ligament Stem Cells, Apical Papilla Stem Cells, and Primary Teeth Stem Cells-Isolation, Characterization, and Expansion for Tissue Engineering. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ) [Internet]*. 2019;1922:59–76.
33. Wang W, Zhang L, Wang Y, Ding Y, Chen T, Wang Y, et al. Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer. *Cell Death & Disease [Internet]*. 2017 Oct 1;8(10):e3071–1.
34. Akekawatchai C, Roytrakul S, Phaonakrop N, Jaresithikunchai J, Jitrapakdee S. Proteomic Analysis of the Anoikis-Resistant Human Breast Cancer Cell Lines. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ) [Internet]*. 2020;2138:185–93.
35. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*. 2007;9(1):204.
36. Margiana R, Markov A, Zekiy AO, Hamza MU, Al-Dabbagh KA, Al-Zubaidi SH, et al. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Research & Therapy*. 2022 Jul 28;13(1).
37. Deo D, Marchioni M, Rao P. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Organ Transplantation. *Pharmaceutics [Internet]*. 2022 Apr 1 [cited 2023 Feb 20];14(4):791.
38. Ledesma-Martínez E, Mendoza-Núñez VM, Santiago-Osorio E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells International*. 2016;2016:1–12.
39. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. Breast Cancer Stem Cells Are Regulated by Mesenchymal Stem Cells through Cytokine Networks. *Cancer Research*. 2011 Jan 11;71(2):614–2
40. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Ye L, Zhang X. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Letters*. 2008 Sep;269(1):67–77.
41. Mandel K, Yang Y, Schambach A, Glage S, Otte A, Hass R. Mesenchymal Stem Cells Directly Interact with Breast Cancer Cells and Promote Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Stem Cells and Development*. 2013 Dec;22(23):3114–27.
42. Casson J, Davies OG, Smith C-A, Dalby MJ, Berry CC. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles may promote breast cancer cell dormancy. *Journal of Tissue Engineering*. 2018 Jan;9:204173141881009.
43. Melzer C, von der Ohe J, Luo T, Hass R. Spontaneous Fusion of MSC with Breast Cancer Cells Can Generate Tumor Dormancy. *International Journal of Molecular Sciences [Internet]*. 2021 May 31;22(11):5930
44. Ramasamy R, Lam EW-F, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*. 2006 Dec 14;21(2):304–10.
45. Gilazieva Z, Ponomarev A, Rizvanov A, Solovyeva V. The Dual Role of Mesenchymal Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles in Carcinogenesis. *Biology [Internet]*. 2022 May 25;11(6):813
46. Li X, Fan Q, Peng X, Yang S, Wei S, Liu J, et al. Mesenchymal/stromal stem cells: necessary factors in tumour progression. *Cell Death Discovery [Internet]*. 2022 Jul 22;8(1):333