

ARAŞTIRMA MAKALESİ

Makale No: 93

Hipoksik Meme Kanseri Hücreleri, Tümör Agresifliğine Bağlı Olarak DRG Akson Uzamasını Modüle Eder

Hypoxic Breast Cancer Cells Modulate DRG Axon Outgrowth in a Tumor Aggressiveness-Dependent Manner

Neşe AYŞİT^{1,2}, Esra ALTINTAŞ²¹İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye²İstanbul Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü (SABİTA), İstanbul, Türkiye

ÖZ

Giriş ve Amaç: Tümör–nöron etkileşimleri, kanserin ilerlemesi, invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, meme kanserinde tümör agresifliği ve hipoksinin nöronal yeniden yapılanma üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Yüksek metastatik potansiyele sahip 4T1 ve daha az agresif EMT6 meme kanseri hücreleri ile bu hücrelere ait koşullandırılmış ortamların, normoksik ve hipoksik koşullar altında dorsal kök ganglionu (DRG) akson uzaması üzerindeki etkileri incelendi. Toplam sekiz deney grubu analiz edildi. Akson uzunlukları NeuronJ yazılımı kullanılarak üç bağımsız deneyde ölçüldü. İstatistiksel analizler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post-hoc testi ile gerçekleştirildi.

Bulgular: Normoksik koşullar altında 4T1 hücrelerinin en belirgin akson

uzamasını indüklediği gözlemlendi. Hipoksi ise tüm deney gruplarında nöral uzantı gelişimini baskıladı. Ayrıca, yalnızca koşullandırılmış ortamların doğrudan ko-kültürlere kıyasla daha zayıf etkiler oluşturduğu belirlendi; bu durum, doğrudan hücre–hücre etkileşimlerinin önemini ortaya koydu.

Sonuç: Bu çalışma, tümör agresifliği ve oksijen düzeylerinin meme kanserinde nöronal yeniden yapılanmayı farklı şekillerde düzenlediğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, tümör–nöron etkileşiminin meme kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Akson uzaması, arka kök ganglionu (DRG), hipoksi, meme kanseri, nöron–tümör etkileşimi, tümör mikroçevresi

ABSTRACT

Introduction: Tumor–nerve interactions play a critical role in cancer progression, invasion, and metastasis. However, how tumor aggressiveness and hypoxic conditions influence neuronal remodeling remains incompletely understood in breast cancer.

Methods: This study investigated the effects of highly metastatic 4T1 and less aggressive EMT6 breast cancer cells, as well as their conditioned media, on dorsal root ganglion (DRG) axon elongation under normoxic and hypoxic conditions. Eight experimental groups were analyzed. Axon lengths were quantified using NeuronJ software in triplicate experiments. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

Results: Under normoxic conditions, 4T1 cells induced the most

pronounced axon elongation compared to EMT6 cells and control groups. In contrast, hypoxia consistently suppressed neurite extension across all experimental conditions. Additionally, conditioned media alone exerted weaker effects than direct co-culture systems, indicating the importance of juxtacrine signaling and direct cell-to-cell interactions in tumor–neuron communication.

Conclusion: These findings demonstrate that tumor aggressiveness and oxygen availability differentially regulate neuronal remodeling in breast cancer. The results highlight neuron–tumor crosstalk as a potential therapeutic target in breast cancer progression.

Keywords: Axon elongation, breast cancer, dorsal root ganglia (DRG), hypoxia, neuron–tumor interaction, tumor microenvironment

Cite this article as: Ayşit N and Altıntaş E. Hypoxic Breast Cancer Cells Modulate DRG Axon Outgrowth in a Tumor Aggressiveness-Dependent Manner. Arch Neuropsychiatry 2026;63:598–605. doi: 10.29399/npa.29348

GİRİŞ

Son yıllarda elde edilen bulgular, periferik sinir sisteminin yalnızca duysal iletimde görev alan bir yapı olmadığını, aynı zamanda tümör oluşumu, ilerlemesi ve tedaviye yanıt üzerinde etkili olan kanser biyolojisinin aktif ve ayrılmaz bir bileşeni olduğunu giderek daha fazla ortaya koymaktadır (1). Kanser–sinir etkileşimleri, özellikle tümör kaynaklı aksonogenez ve perinöral invazyon gibi mekanizmalar aracılığıyla hastalığın biyolojik davranışını belirleyen kritik faktörler olarak giderek daha fazla ilgi görmektedir (2). Bu süreçler, neoplastik hücreler ile sinir yapıları arasında

gerçekleşen dinamik ve çift yönlü bir iletişimi yansıtmakta olup, hem tümör progresyonu hem de nöral plastisite açısından önemli sonuçlar doğurmaktadır (3).

Meme kanseri, tümör progresyonunun nörobiyolojik boyutlarının araştırılması için klinik açıdan uygun bir model sunmaktadır (4). Tümör kaynaklı nörotrofik mediyatörler ve akson kılavuzluk molekülleri, sinir uzantılarının tümör mikroçevresine doğru büyümesini teşvik edebilirken,

Öne Çıkan Noktalar

- Yüksek metastatik meme kanseri hücreleri DRG akson uzamasını artırır.
- Hipoksi, tüm gruplarda nöral uzantı gelişimini baskılar.
- Doğrudan tümör-nöron teması, koşullandırılmış besiyerinden daha etkilidir.
- Tümör agresifliği, nöron-tümör etkileşimini farklı şekilde düzenler.

buna karşılık nöral sinyalizasyon da tümör proliferasyonu, invazyonu, anjiyogenez ve tedavi direncine katkıda bulunmaktadır (5). Bu karşılıklı etkileşim, nöral yeniden yapılanmanın tümör-konak etkileşimlerinin temel ancak halen yeterince araştırılmamış bir bileşeni olduğunu göstermektedir.

Preklinik meme tümörü modelleri, tümör agresifliğinin nöral yanıtları nasıl etkilediğine ilişkin mekanistik bilgiler sağlamaktadır (6). Yüksek metastatik potansiyele sahip 4T1 hücre hattı belirgin nörotrofik aktivite göstermekte ve agresif üçlü negatif meme kanserini başarılı bir şekilde modellemektedir (7). Buna karşılık EMT6 hücreleri daha düşük agresiflik gösteren ve hormonal tedavilere daha duyarlı bir fenotipi temsil etmektedir (8). Bu iki modelin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, nöronal büyüme ve plastisite üzerindeki alt tip spesifik etkilerin ortaya konulması açısından önemli bir fırsat sunmaktadır (9).

Tümör mikroçevresinin karakteristik özelliklerinden biri olan hipoksi, hem tümör biyolojisinin hem de nöral yanıtların şekillenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (10). Hipoksiye bağlı sinyal yollarının aktivasyonu aracılığıyla hipoksik stres; nörotrofik faktörlerin, anjiyojenik mediyatörlerin ve akson kılavuzluk moleküllerinin ekspresyonunu düzenleyerek nöronal yeniden yapılanmayı bağlama özgü şekilde etkileyebilmektedir (11). Bununla birlikte, meme kanserinde hipoksinin tümör-sinir etkileşimleri üzerindeki etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (12).

Bu çalışmada, normoksik ve hipoksik koşullar altında 4T1 ve EMT6 meme kanseri hücreleri kullanılarak oluşturulan doğrudan ko-kültür ve koşullandırılmış besiyeri deney modellerinde dorsal kök ganglionu (DRG) nörit uzaması kantitatif olarak değerlendirildi. Bu deneysel yaklaşım, tümör agresifliği ile mikroçevredeki oksijen düzeyinin nöronal yeniden yapılanma süreçlerini nasıl etkilediğinin sistematik olarak araştırılmasına olanak sağlamıştır.

Agresif tümör fenotiplerinin daha güçlü nörotrofik sinyalizasyon sergilediğini ve hipoksik strese farklı yanıtlar verdiğini gösteren mevcut kanıtlar doğrultusunda, hipoksik meme kanseri hücrelerinin DRG akson uzamasını tümör agresifliğine bağlı olarak farklı biçimlerde düzenlediği hipotezini ortaya koyduk. Özellikle, yüksek metastatik potansiyele sahip 4T1 hücrelerinin, daha düşük agresiflik gösteren EMT6 fenotipine kıyasla nörit uzaması üzerinde daha belirgin düzenleyici etkiler oluşturacağını ve bunun hem parakrin hem de doğrudan hücre teması aracılığıyla gerçekleşen alt tipe özgü tümör-sinir etkileşim mekanizmalarını yansıttığını öngördük.

YÖNTEM

Bu çalışmada, İstanbul Medipol Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilen erişkin dişi Beta III-Tubulin-GFP transgenik fareler (şuş 4779; 6–8 haftalık; n=10) kullanıldı. Tüm deneysel prosedürler, deney hayvanlarının bakım ve kullanımına ilişkin kurumsal etik kurallar doğrultusunda gerçekleştirildi.

Hayvanlar derin anestezi altında ötenazi edildikten sonra dorsal kök ganglionları (DRG) steril koşullar altında mikrocerrahi teknikler kullanılarak

dikkatlice izole edildi. Dorsal kök ganglionu dokuları %1 kolajenaz çözeltisi içerisinde 45 dakika inkübe edildi ve ardından Hanks Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS) ile üç kez yıkandı. Daha sonra dokular, Neurobasal A (NBA) ortamında hazırlanmış %0,25 tripsin (%10 çalışma çözeltisi) ile 15 dakika inkübe edildi ve pipet yardımıyla nazikçe pipetlenerek mekanik olarak ayrıştırıldı. Mekanik ayrıştırmanın ardından hücre agregasyonunu önlemek amacıyla hücre süspansiyonuna %0,1 DNaz eklendi. Nöronal saflaştırma Percoll yoğunluk gradyanı santrifüjü ile gerçekleştirildi ve elde edilen primer DRG nöronları poli-L-lizin ve laminin ile kaplanmış kültür kaplarına ekildi. Hücreler, B27, L-glutamin ve penisilin/streptomisin ile desteklenmiş Neurobasal A besiyerinde, %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37°C'de kültüre edildi.

Farklı metastatik potansiyele sahip fare meme kanseri hücre hatları olan yüksek metastatik 4T1 ve daha düşük agresif özellik gösteren EMT6 hücreleri standart kültür koşullarında çoğaltıldı. Doğrudan ko-kültür deneylerinde, nöronların kültür yüzeyine tutunmasını takiben kanser hücreleri aynı kültür kuyularına eklenerek tümör hücreleri ile DRG nöronları arasında doğrudan hücre-hücre teması sağlandı.

Parakrin etkilerin değerlendirilmesi amacıyla, kanser hücrelerinden 24 saatlik kültür sonunda elde edilen koşullandırılmış besiyerleri hücresel artıkların uzaklaştırılması için santrifüj edildi ve tümör hücreleri ile nöronlar arasında doğrudan fiziksel temas olmaksızın DRG nöron kültürlerine uygulandı.

Deney grupları; yalnızca DRG nöronları (kontrol), 4T1 hücreleri ile ko-kültüre edilen DRG nöronları, 4T1 koşullandırılmış besiyeri uygulanan DRG nöronları, EMT6 hücreleri ile ko-kültüre edilen DRG nöronları ve EMT6 koşullandırılmış besiyeri uygulanan DRG nöronlarından oluşturuldu. Her deney grubu hem normoksik (%21 O₂) hem de hipoksik koşullarda değerlendirildi. Hipoksi, kontrollü bir hipoksi kabininde hücrelerin %1 O₂ ortamında altı saat inkübe edilmesiyle oluşturuldu.

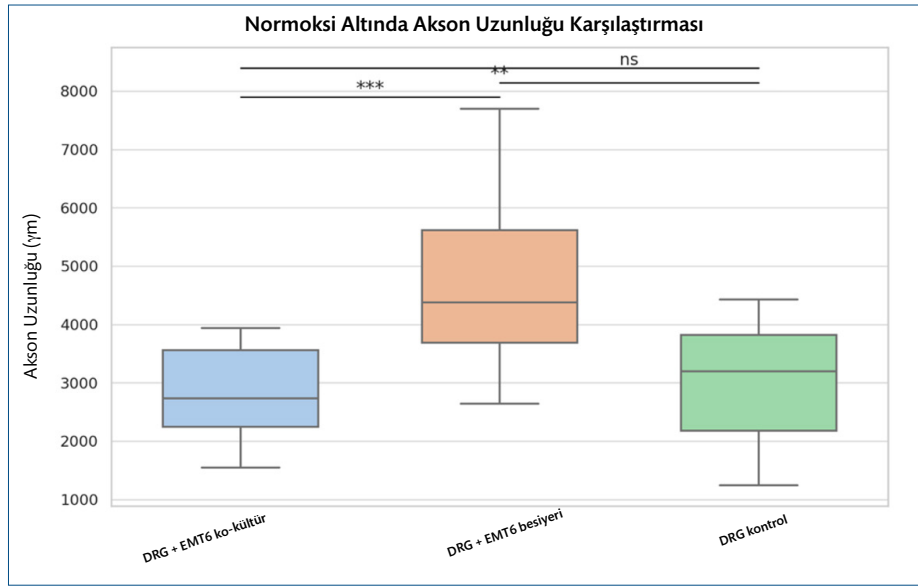
Nörit uzaması, βIII-tubulin pozitif nöronlarda GFP ekspresyonuna dayalı floresan mikroskopisi kullanılarak değerlendirildi. Her deney grubu için rastgele seçilen 10 mikroskopik alandan görüntüler elde edildi. Akson uzunlukları NeuronJ yazılımı kullanılarak ölçüldü ve tüm deneyler üç bağımsız biyolojik tekrar halinde gerçekleştirildi.

İstatistiksel analizler GraphPad Prism sürüm 10 yazılımı kullanılarak yapıldı. Veriler tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma post hoc testi ile analiz edildi. Sonuçlar ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak ifade edildi ve p < 0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

ChatGPT, yalnızca metnin dil düzenlemesi amacıyla kullanılmış olup, çalışmanın bilimsel içeriği, veri analizi, yorumlanması veya sonuçları üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır.

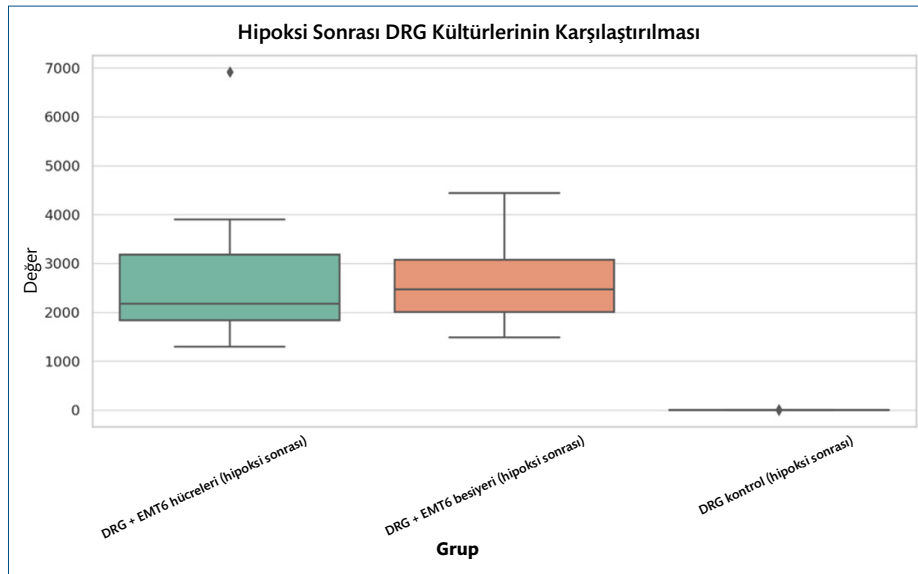
BULGULAR

Dorsal kök ganglionu nörit uzaması; tümör alt tipi, etkileşim modeli ve mikroçevredeki oksijen düzeyinden anlamlı şekilde etkilendi. Normoksik koşullar altında (%21 O₂), EMT6 koşullandırılmış besiyerine maruz bırakılan DRG nöronlarında akson uzaması, hem EMT6 ko-kültür grubuna hem de kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha fazlaydı (Şekil 1). Buna karşılık, EMT6 ko-kültür grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Benzer bir bulgu agresif 4T1 modelinde de gözlemlendi. Bu modelde koşullandırılmış besiyeri, hem ko-kültür hem de kontrol gruplarına göre nörit uzamasını anlamlı düzeyde artırırken, doğrudan ko-kültür grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 2). Bu bulgular, normoksik koşullar altında tümör kaynaklı çözünür faktörlerin nörit uzamasını desteklemede baskın rol oynadığını göstermektedir.



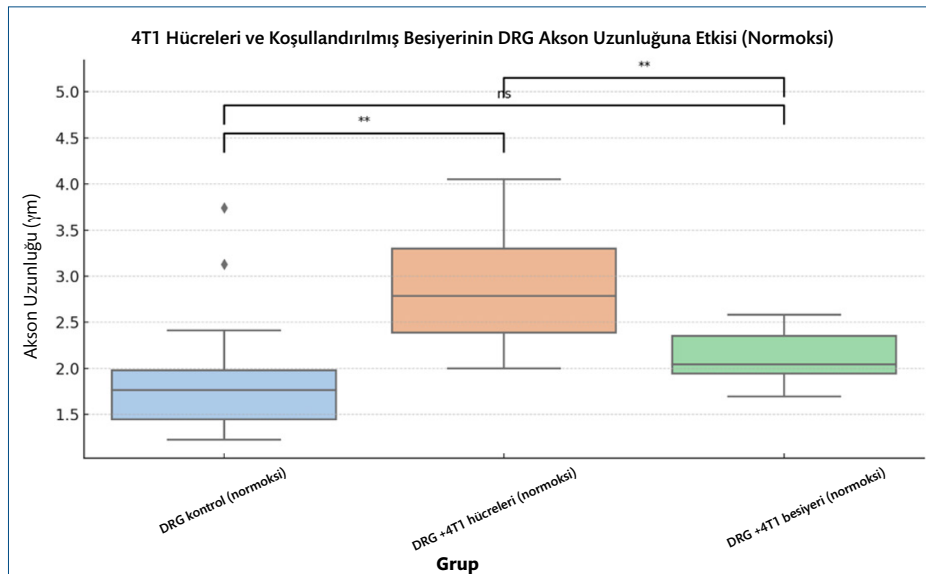
Şekil 1. Normoksik koşullar altında EMT6 ko-kültürü, EMT6 koşullandırılmış besiyeri ve kontrol gruplarında DRG akson uzunluğunun karşılaştırılması

Primer DRG nöronları tek başına (kontrol), EMT6 meme kanseri hücreleri ile doğrudan ko-kültür halinde veya normoksi (%21 O₂) koşullarında EMT6 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış medyuma maruz bırakılarak kültüre edildi. Akson uzunluğu ölçüldü ve gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi kullanılarak gerçekleştirildi. EMT6 koşullandırılmış medyumunu, hem EMT6 ko-kültür hem de kontrol grubuna kıyasla akson uzunluğunu anlamlı düzeyde artırırken, EMT6 ko-kültür ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Veriler, medyan (orta çizgi), çeyrekler arası aralık (kutu) ve minimum-maksimum değerleri (bıyıklar) gösteren kutu-bıyık grafikleri şeklinde sunuldu. **p < 0,01; ***p < 0,001; ns, anlamlı değil.



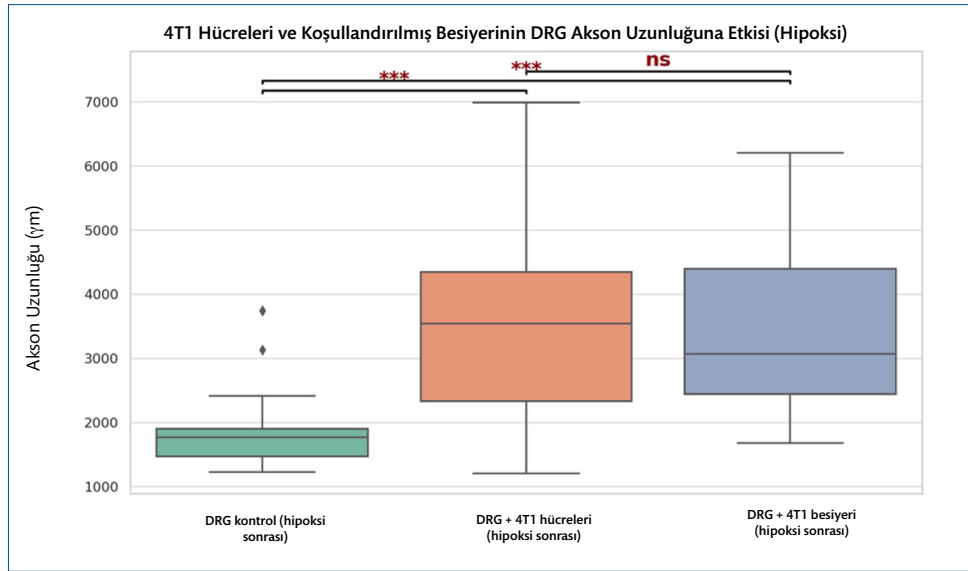
Şekil 2. Normoksik koşullar altında 4T1 ko-kültürü, 4T1 koşullandırılmış besiyeri ve kontrol gruplarında DRG akson uzunluğunun karşılaştırılması

Primer DRG nöronları tek başına (kontrol), yüksek metastatik özellik gösteren 4T1 meme kanseri hücreleri ile doğrudan ko-kültür halinde veya normoksi (%21 O₂) koşullarında 4T1 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış medyuma maruz bırakılarak kültüre edildi. Akson uzunluğu ölçüldü ve gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi kullanılarak gerçekleştirildi. 4T1 koşullandırılmış medyumunu, hem 4T1 ko-kültür hem de kontrol grubuna kıyasla akson uzunluğunu anlamlı düzeyde artırırken, ko-kültür ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Veriler, medyan (orta çizgi), çeyrekler arası aralık (kutu) ve minimum-maksimum değerleri (bıyıklar) gösteren kutu-bıyık grafikleri şeklinde sunuldu. *p < 0,05; ns, anlamlı değil.



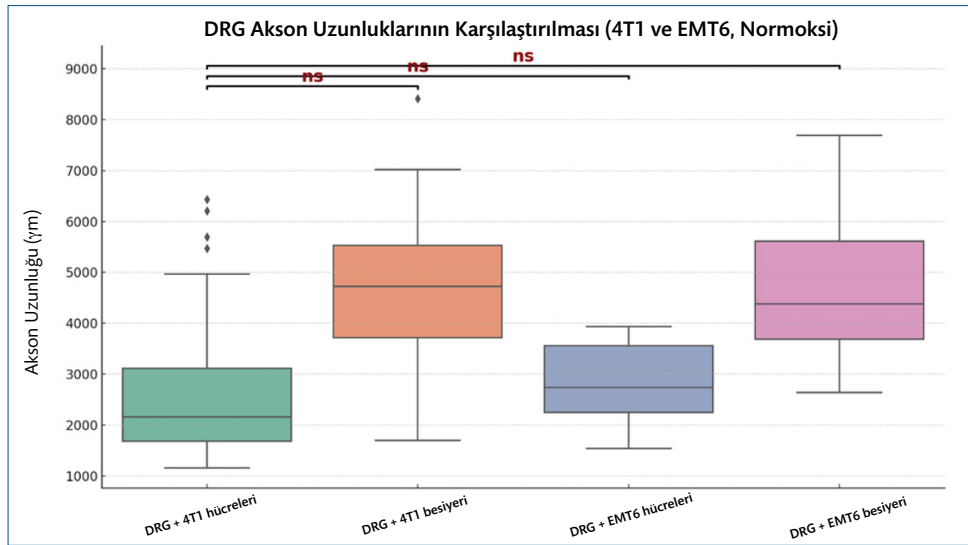
Şekil 3. Hipoksik koşullar altında EMT6 ko-kültürü, EMT6 koşullandırılmış besiyeri ve kontrol gruplarında DRG akson uzunluğunun karşılaştırılması

Primer DRG nöronları tek başına (kontrol), EMT6 meme kanseri hücreleri ile doğrudan ko-kültür halinde veya hipoksi (%1 O₂) koşullarında EMT6 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış medyuma maruz bırakılarak kültüre edildi. Akson uzunluğu ölçüldü ve gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey post hoc testi kullanılarak gerçekleştirildi. Hem EMT6 ko-kültürü hem de EMT6 koşullandırılmış medyumunu, kontrol grubuna kıyasla akson uzunluğunu anlamlı düzeyde artırırken, ko-kültür ve koşullandırılmış medyum grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Veriler, medyan (orta çizgi), çeyrekler arası aralık (kutu) ve minimum-maksimum değerleri (bıyıklar) gösteren kutu-bıyık grafikleri şeklinde sunuldu. *p < 0,05; **p < 0,01; ns, anlamlı değil.



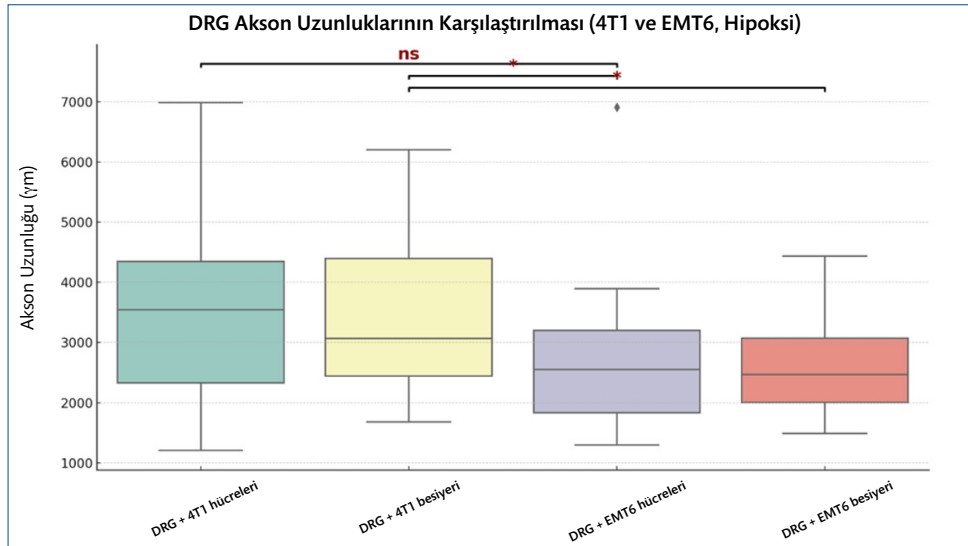
Şekil 4. Hipoksik koşullar altında 4T1 ko-kültürü, 4T1 koşullandırılmış besiyeri ve kontrol gruplarında DRG akson uzunluğunun karşılaştırılması

Primer DRG nöronları tek başına (kontrol), yüksek metastatik potansiyele sahip 4T1 meme kanseri hücreleri ile doğrudan ko-kültürde veya 4T1 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerine maruz bırakılarak hipoksik koşullarda (%1 O₂) kültüre edildi. Akson uzunlukları ölçüldü ve gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve ardından Tukey post hoc testi kullanılarak gerçekleştirildi. Hem 4T1 ko-kültür grubu hem de 4T1 koşullandırılmış besiyeri grubu, kontrol grubuna kıyasla akson uzunluğunu anlamlı düzeyde artırırken, ko-kültür ile koşullandırılmış besiyeri grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Veriler, medyanı (orta çizgi), çeyrekler arası aralığı (kutu) ve minimum-maksimum değerleri (bıyıklar) gösteren kutu-grafik (box-and-whisker plot) olarak sunulmuştur. ***p<0,001; ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 5. Normoksik koşullar altında EMT6 ve 4T1 meme kanseri modellerinde DRG akson uzunluğunun karşılaştırmalı analizi

Primer DRG nöronları tek başına (kontrol), EMT6 veya yüksek metastatik potansiyele sahip 4T1 meme kanseri hücreleri ile doğrudan ko-kültürde ya da her iki hücre hattından elde edilen koşullandırılmış besiyerine maruz bırakılarak normoksik koşullarda (%21 O₂) kültüre edildi. Akson uzunlukları ölçüldü ve gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve ardından Tukey post hoc testi kullanılarak gerçekleştirildi. Hem EMT6 hem de 4T1 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerleri, kontrol grubuna ve ilgili ko-kültür gruplarına kıyasla akson uzunluğunu anlamlı düzeyde artırdı. Buna karşın, EMT6 ve 4T1 ko-kültür grupları arasında veya EMT6 ve 4T1 koşullandırılmış besiyeri grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Veriler, medyanı (orta çizgi), çeyrekler arası aralığı (kutu) ve minimum-maksimum değerleri gösteren kutu-grafik (box-and-whisker plot) olarak sunulmuştur. **p<0,01; ***p<0,001; ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir.

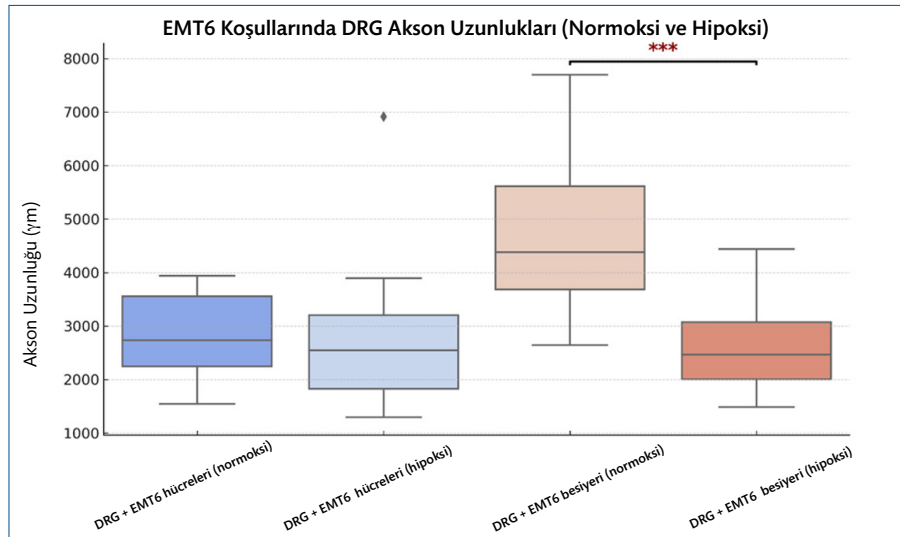


Şekil 6. Hipoksik koşullar altında EMT6 ve 4T1 meme kanseri modellerinde DRG akson uzunluğunun karşılaştırmalı analizi

Primer DRG nöronları tek başına (kontrol), EMT6 veya yüksek metastatik potansiyele sahip 4T1 meme kanseri hücreleri ile doğrudan ko-kültürde ya da her iki tümör hücre hattından elde edilen koşullandırılmış besiyerine maruz bırakılarak hipoksik koşullarda (%1 O₂) kültüre edildi. Akson uzunlukları ölçüldü ve gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve ardından Tukey post hoc testi kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol grubuna kıyasla hem 4T1 ko-kültür grubunda hem de 4T1 koşullandırılmış besiyeri grubunda nörit uzaması anlamlı düzeyde artarken, EMT6 ile ilişkili deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Veriler, medyanı (orta çizgi), çeyrekler arası aralığı (kutu) ve minimum-maksimum değerleri (bıyıklar) gösteren kutu-grafik (box-and-whisker plot) olarak sunulmuştur. **p<0,01; ***p<0,001; ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir.

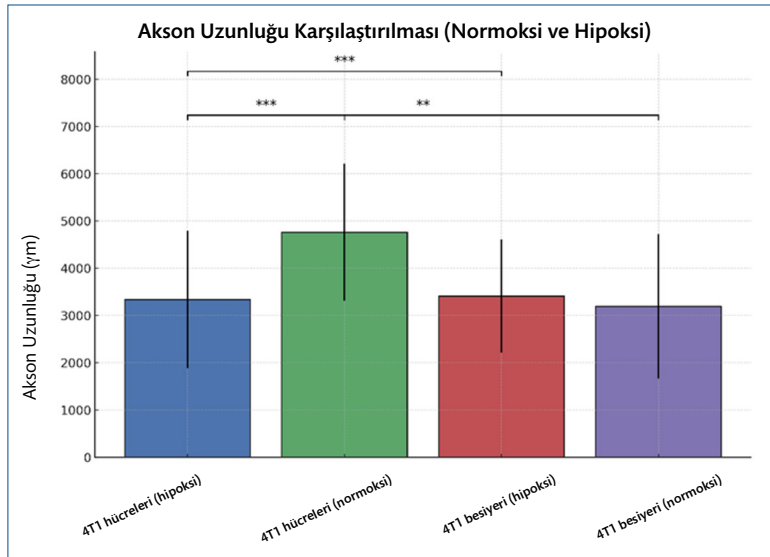
Hipoksik koşullar altında (%1 O₂) etkileşim dinamikleri değişiklik gösterdi. EMT6 modelinde hem ko-kültür hem de koşullandırılmış besiyeri uygulaması, kontrol grubuna kıyasla akson uzunluğunu anlamlı düzeyde

artırdı; ancak bu iki etkileşim modeli arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 3). Benzer şekilde, 4T1 modelinde de hem ko-kültür hem de koşullandırılmış besiyeri uygulamaları, hipoksik koşullar altında kontrol



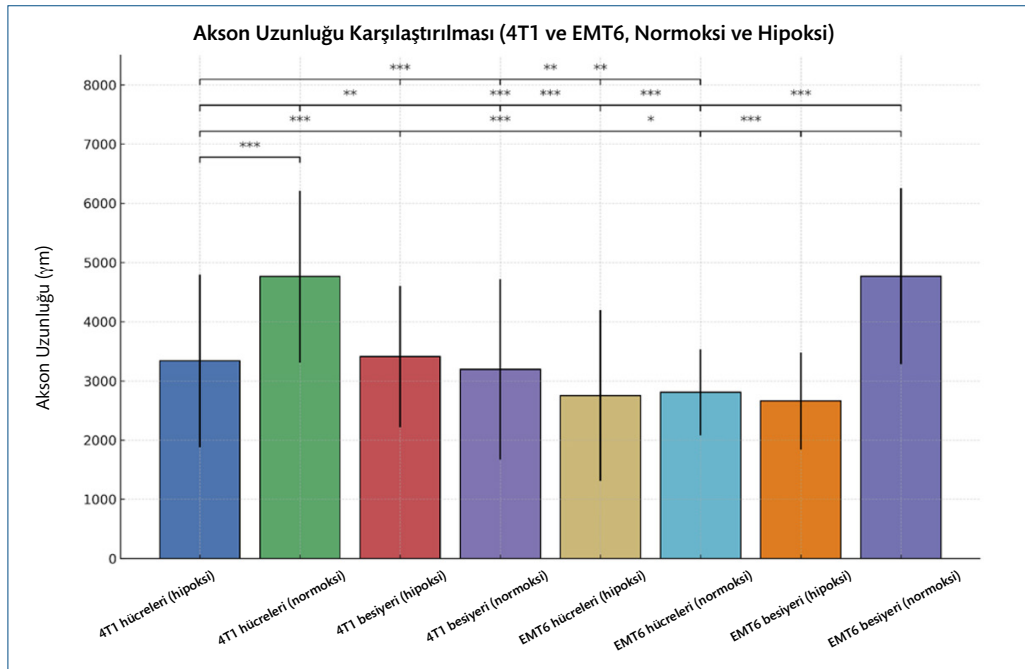
Şekil 7. EMT6 tümör-nöron etkileşim modelinde hipoksinin DRG akson uzunluğu üzerindeki etkileri

Primer DRG nöronları, normoksik (%21 O₂) veya hipoksik (%1 O₂) koşullar altında doğrudan EMT6 meme kanseri hücreleri ile ko-kültüre edildi veya EMT6 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerine maruz bırakıldı. Akson uzunluğu ölçümleri, hipoksinin koşullandırılmış besiyeri aracılığıyla uyarılan nörit uzamasını anlamlı düzeyde azalttığını, buna karşın normoksik ve hipoksik ko-kültür koşulları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını gösterdi. Normoksik ve hipoksik gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, bağımsız iki örneklemli iki kuyruklu t-testi kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler, medyanı (orta çizgi), çeyrekler arası aralığı (kutu) ve minimum-maksimum değerleri (bıyıklar) gösteren kutu-bıyık grafikleri olarak sunulmuştur. *p < 0,05; ***p < 0,001; ns, istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 8. 4T1 tümör-nöron etkileşim modelinde hipoksinin DRG akson uzunluğu üzerindeki etkileri

Primer DRG nöronları, normoksik (%21 O₂) veya hipoksik (%1 O₂) koşullar altında doğrudan yüksek metastatik potansiyele sahip 4T1 meme kanseri hücreleri ile ko-kültüre edildi veya 4T1 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerine maruz bırakıldı. Akson uzunluğu ölçümleri, normoksik ve hipoksik ko-kültür koşulları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını, buna karşın koşullandırılmış besiyeri aracılığıyla uyarılan nörit uzamasının oksijenlenme durumuna göre anlamlı farklılık gösterdiğini ortaya koydu. Normoksik ve hipoksik gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar bağımsız iki örneklemli iki kuyruklu t testi kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler, medyanı (orta çizgi), çeyrekler arası aralığı (kutu) ve minimum-maksimum değerleri gösteren kutu-grafik (box-and-whisker plot) olarak sunulmuştur. **p<0,01; ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 9. EMT6 ve 4T1 meme kanseri modellerinde hipoksinin tümör kaynaklı DRG akson uzaması üzerindeki farklı etkileri

Primer dorsal kök ganglionu (DRG) nöronları, normoksik (%21 O₂) veya hipoksik (%1 O₂) koşullar altında doğrudan tümör hücreleri ile ko-kültüre edildi ya da tümör hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerine maruz bırakıldı. EMT6 modelinde hipoksi, koşullandırılmış besiyeri aracılığıyla indüklenen akson uzamasını anlamlı düzeyde azaltırken, normoksik ve hipoksik ko-kültür koşulları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Buna karşılık, agresif 4T1 modelinde hipoksi, koşullandırılmış besiyeri aracılığıyla uyarılan nörit uzamasını orta düzeyde değiştirirken, hücre temasına bağımlı tümör-nöron sinyalleşmesini korudu. Normoksik ve hipoksik gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar bağımsız iki örneklemli iki kuyruklu t testi kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler, medyanı (orta çizgi), çeyrekler arası aralığı (kutu) ve minimum-maksimum değerleri gösteren kutu-grafik (box-and-whisker plot) olarak sunulmuştur. **p < 0,01; ***p < 0,001; ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir.

grubuna göre nörit uzamasını anlamlı biçimde artırdı ve iki etkileşim modeli arasında benzer etkiler gözlemlendi (Şekil 4). Bu bulgular, hipoksinin temas bağımlı ve parakrin tümör-nöron sinyalizasyonunun göreceli katkısını değiştirdiğini düşündürmektedir.

Normoksik koşullarda tümör modellerinin doğrudan karşılaştırılması, hem EMT6 hem de 4T1 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerlerinin, kontrol ve ilgili ko-kültür gruplarına kıyasla nörit uzamasını anlamlı düzeyde artırdığını ortaya koydu. Bununla birlikte, aynı etkileşim modeli içerisinde iki tümör alt tipi arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 5). Buna karşın, hipoksik koşullar altında nörit uzaması özellikle agresif 4T1 modelinde belirgin olarak artarken, EMT6 ile ilişkili deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmedi (Şekil 6). Bu sonuçlar, tümör agresifliğinin hipoksik strese karşı gelişen nöral yanıtı modüle ettiğini göstermektedir.

Model içi karşılaştırmalar, hipoksinin EMT6 modelinde koşullandırılmış besiyeri aracılığıyla uyarılan nörit uzamasını anlamlı düzeyde azalttığını, buna karşın doğrudan ko-kültür aracılığıyla gerçekleşen akson uzamasının değişmeden kaldığını gösterdi (Şekil 7). Buna karşılık, 4T1 modelinde koşullandırılmış besiyeri ile indüklenen nörit uzaması normoksik ve hipoksik koşullar arasında anlamlı farklılık gösterirken, ko-kültür yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Şekil 8). Bu sonuçlar, hipoksinin özellikle parakrin tümör kaynaklı nörotrofik sinyalizasyon yollarını seçici olarak modüle ettiğini göstermektedir.

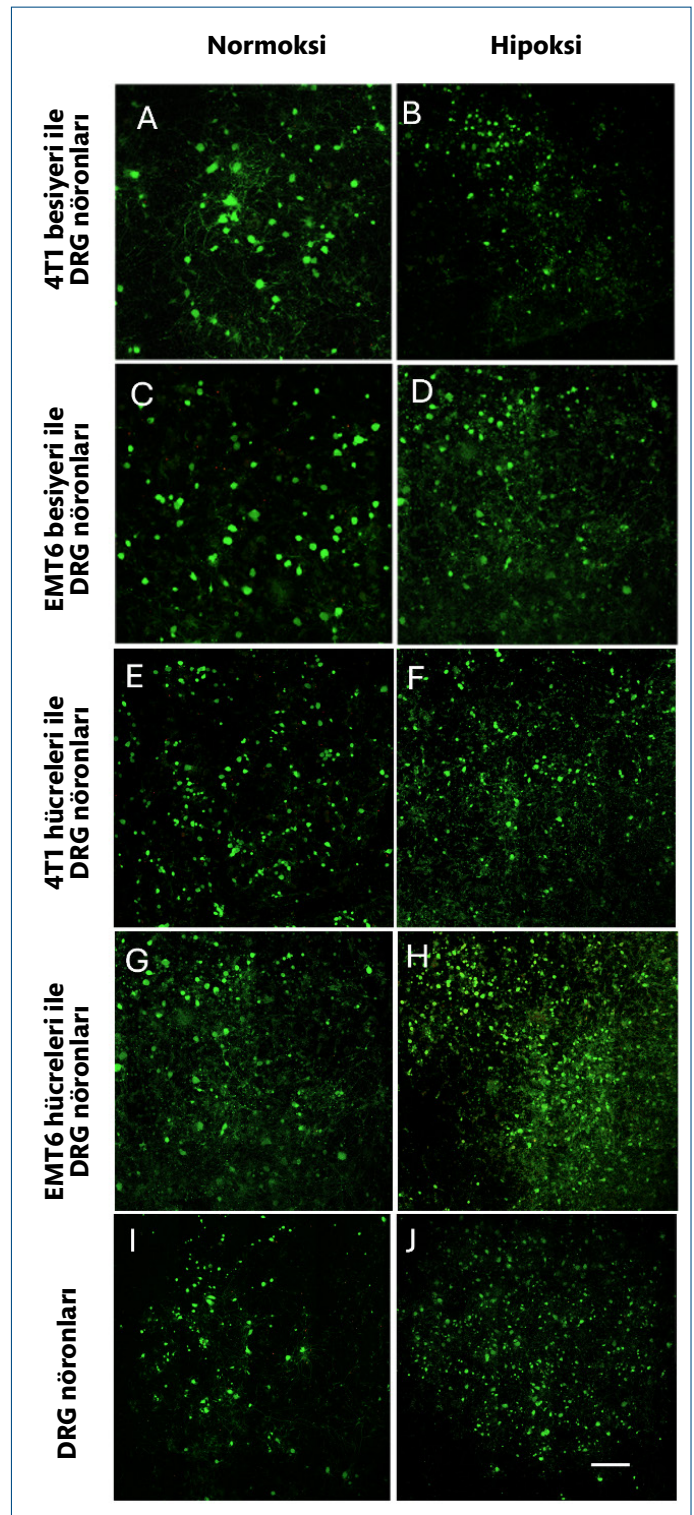
Tüm deney gruplarını kapsayan bütünlük analizi, hipoksinin tümör kaynaklı DRG aksonogenezini tümör agresifliğine bağlı olarak farklı şekillerde etkilediğini doğruladı (Şekil 9). Özellikle hipoksi, EMT6 modelinde temas bağımlı sinyalizasyonu etkilemeksizin koşullandırılmış besiyeri aracılığıyla oluşan nörit uzamasını belirgin şekilde baskımlarken, 4T1 modelinde parakrin etkileri orta düzeyde değiştirmiş, ancak doğrudan tümör-nöron etkileşimi ile gerçekleşen akson uzamasını büyük ölçüde korumuştur.

Genel olarak bu bulgular, tümör agresifliği, etkileşim modeli ve oksijenasyon durumunun birlikte DRG nörit uzamasının büyüklüğünü ve örüntüsünü belirlediğini göstermektedir. Tüm deneysel koşullarda DRG nörit uzamasını gösteren temsili konfokal görüntüler Şekil 10'da sunulmuştur.

TARTIŞMA

Elde ettiğimiz bulgular, tümör agresifliği ile oksijenasyon durumunun tümörle ilişkili nöral yeniden yapılanmayı birlikte düzenlediğini göstermekte ve periferik sinir sisteminin (PSS) kanser progresyonunda yalnızca pasif bir gözlemci değil, aynı zamanda aktif bir düzenleyici olduğunu destekleyen kanıtları güçlendirmektedir (13). Normoksik koşullar altında 4T1 hücrelerinin DRG nörit uzamasını en güçlü şekilde artırması, yüksek metastatik potansiyele sahip üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin bol miktarda sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) salgıladığını; bu faktörlerin ise duyu nöronları üzerindeki TrkA, TrkB ve RET reseptörlerini aktive ederek nörit filizlenmesini uyardığını gösteren çalışmalarla uyumludur (14). Bu nörotrofik sinyaller, SEMA3C, netrin-1 ve ephrin-A ligandları gibi akson kılavuzluk molekülleri ile birlikte yalnızca nöronal göçü desteklemekle kalmamakta, aynı zamanda karşılıklı nörotransmitter salınımı yoluyla tümör hücrelerinin hareketliliğini ve invazyon kapasitesini de artırmaktadır (15).

Buna karşılık, hipoksi (%1 O₂, altı saat) nörit büyümesini belirgin biçimde baskımlamıştır. Bu bulgu, hipoksinin HIF-1α ve HIF-2α yollarını aktive ederek hücre metabolizmayı glikolize yönlendirdiğini ve buna paralel olarak nörotrofik faktörlerin salgılanmasını azalttığını bildiren



Şekil 10. Tüm deneysel koşullar altında dorsal kök ganglionu (DRG) nörit uzamasını gösteren temsili konfokal görüntüler

Dorsal kök ganglionu nöronları, normoksik (%21 O₂) veya hipoksik (%1 O₂, altı saat) koşullar altında EMT6 veya 4T1 meme kanseri hücreleri ile doğrudan ko-kültürde ya da bu hücrelerden elde edilen koşullandırılmış besiyerine maruz bırakılarak kültüre edildi. A-J panelleri, tümör alt tipi, kültür koşulu ve oksijenlenme durumunun her bir kombinasyonunu temsil etmektedir. Ölçek çubuğu=20 µm. Doğrudan hücre-hücre teması, koşullandırılmış besiyerine kıyasla daha belirgin nörit uzamasını desteklemiş, hipoksi ise tüm deney gruplarında akson uzamasını tutarlı bir şekilde baskımlamıştır.

önceki çalışmalarla uyumludur (16). Ayrıca hipoksi; SEMA3A, VEGF-A ve ephrin-A5 gibi itici akson kılavuzluk moleküllerinin ekspresyonunu artırarak nöronal büyüme konilerinin stabilitesini bozabilir ve nörit

uzamasını sınırlandırabilir (17). Benzer mekanizmalar glioblastom ve pankreatik adenokarsinom da dâhil olmak üzere birçok kanser türünde gösterilmiş; hipoksik bölgelerde güçlü anjiyojenik sinyallere rağmen aksonogenezin azaldığı bildirilmiştir (18).

Çalışmamızın önemli bulgularından biri de yalnızca koşullandırılmış besiyerinin, doğrudan ko-kültüre kıyasla daha sınırlı düzeyde nörit uzamasına neden olmasıdır. Bu durum, NCAM1, L1CAM ve integrinler gibi hücre yüzey adezyon moleküllerinin jukstakrin nöron-tümör sinyalizasyonundaki kritik rolünü ortaya koymaktadır (19). Bu adezyon molekülleri, çözünür faktörlerin tek başına oluşturmayaacağı lokalize parakrin gradyanların ve sinaps benzeri hücreler arası etkileşimlerin meydana gelmesini sağlamaktadır (20).

4T1 hücrelerinin EMT6 hücrelerine kıyasla daha güçlü aksonogenez oluşturmaları, tümör fenotipinin nöral yeniden yapılanmayı belirlediğini göstermektedir. Bu bulgu, perinöral invazyon ve tümör innervasyonunun meme, pankreas ve prostat kanserlerinde erken nüks ve kötü sağkalımla ilişkili olduğunu gösteren klinik verilerle uyumludur (21). Özellikle sempatik innervasyonun adrenerjik sinyalizasyon yoluyla metastatik yayılımı artırdığı gösterilmiştir (22). Bu nedenle tümör-sinir eksen, kanser hücrelerinin yayılımını hızlandıran bir “metastatik otoyol” olarak değerlendirilebilir.

Elde edilen bulgular, nörotrofik sinyal yollarının (NGF/Trk, BDNF/TrkB), akson kılavuzluk sistemlerinin (SEMA3-neuropilin, netrin-DCC) ve hücre adezyon moleküllerinin hedeflenmesinin tümör kaynaklı aksonogenez baskılayabileceğini ve metastatik progresyonu sınırlayabilecek yeni tedavi yaklaşımları sunabileceğini düşündürmektedir (23,24). Nöronal ablasyon, β -adrenerjik blokaj ve semaforin-neuropilin inhibisyonu uygulanan preklinal çalışmaların tümör büyümesini ve metastazı azalttığını göstermesi bu yaklaşımı desteklemektedir (25). Bulgularımız, özellikle mevcut tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu üçlü negatif meme kanserinde bu stratejilerin daha ayrıntılı araştırılmasının önemini ortaya koymaktadır.

Bu çalışma, meme kanserine bağlı akson rejenerasyonunun hem tümör alt tipi hem de tümör mikroçevresindeki oksijen düzeyi tarafından şekillendirildiğini göstermektedir.

- Normoksik koşullar altında 4T1 hücreleri, agresif ve nörotrofik faktörlerden zengin fenotipleri sayesinde DRG nörit uzamasını güçlü şekilde uyarmaktadır.
- Hipoksi, büyük olasılıkla HIF aracılı metabolik yeniden programlanma ve itici akson kılavuzluk moleküllerinin endüksiyonu yoluyla akson büyümesini sürekli olarak baskılamaktadır.
- Maksimum nörit uzaması için yalnızca salgılanan çözünür faktörler yeterli olmayıp, doğrudan nöron-tümör teması kritik öneme sahiptir.
- Tümör agresifliği nöral yeniden yapılanma ile doğrudan ilişkilidir ve 4T1 hücreleri pro-nörojenik etkileri bakımından sürekli olarak EMT6 hücrelerinden daha güçlü etki göstermektedir.

Bu bulgular, meme kanseri agresifliğinin nörobiyolojik yönünü ortaya koymakta ve tümör-sinir ekseninin umut verici bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir. Gelecekte gerçekleştirilecek; *in vivo* uzunlamasına görüntüleme, nöronal ablasyon ve NGF/Trk ile semaforin-neuropilin yollarının farmakolojik inhibisyonunu içeren çalışmalar, bu eksenin hedeflenmesinin metastazı azaltıp sağkalımı iyileştirip iyileştiremeyeceğini ortaya koymada önemli olacaktır. Benzer nöron-tümör etkileşimlerinin bildirildiği veteriner onkolojisi açısından da bu yaklaşımlar potansiyel uygulama alanı sunabilir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmanın güçlü yönlerine rağmen bazı sınırlılıkları bulunmaktadır.

Öncelikle, tümör kaynaklı akson rejenerasyonunu yönlendiren moleküler mekanizmalar ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Bulgularımız hipoksiye duyarlı sinyal yollarını, nörotrofinlerin biyoyararlanımını ve temas bağımlı nöron-tümör etkileşimlerini güçlü biçimde işaret etmesine rağmen, bu etkilerin altında yatan spesifik sinyal mekanizmaları doğrudan araştırılmamıştır. Bu moleküler yolların ayrıntılı olarak aydınlatılması, çalışmanın biyolojik ve translaşyonel değerini daha da artıracak olup, gelecekte planlanan daha kapsamlı araştırmalarda ele alınacaktır.

Etik Komite Onayı: İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- NA; Tasarım- NA; Denetleme- NA; Kaynaklar- NA; Malzemeler- NA, EA; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- NA, EA; Analiz ve/veya Yorum- NA, EA; Literatür Taraması- NA, EA; Yazıyı Yazan- NA; Eleştirel İnceleme- NA.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, kamu, ticari veya kâr amacı gütmeyen herhangi bir kuruluş tarafından özel bir araştırma fonu ile desteklenmemiştir.

Veri Erişilebilirliği: Bu çalışma kapsamında üretilen ve/veya analiz edilen veri setleri, makul bir talep üzerine sorumlu yazardan temin edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Amit M, Na'ara S, Gil Z. Mechanisms of cancer dissemination along nerves. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):399-408. [\[Crossref\]](#)
2. Jobling P, Pundavela J, Oliveira SMR, Roselli S, Walker MM, Hondermarck H. Nerve-cancer cell cross-talk: a novel promoter of tumor progression. *Cancer Res*. 2015;75(9):1777-1781. [\[Crossref\]](#)
3. Harrington AM, Castro J, Erickson A, Grundy L, Brierley SM. Extrinsic sensory afferent nerves innervating the gastrointestinal tract in health and disease. In: Said HM, editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 6th ed. Elsevier; 2018. pp. 387-418. [\[Crossref\]](#)
4. Neman J, Termini J, Wilczynski S, Vaidehi N, Choy C, Kowolik CM, et al. Human breast cancer metastases to the brain display GABAergic properties in the neural niche. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:984-989. [\[Crossref\]](#)
5. Renz BW, Tanaka T, Sunagawa M, Takahashi R, Jiang Z, Macchini M, et al. Cholinergic signaling via muscarinic receptors directly and indirectly suppresses pancreatic tumorigenesis and cancer stemness. *Cancer Discov*. 2018;8:1458-1473. [\[Crossref\]](#)
6. Wang K, Zhao X-h, Liu J, Zhang R, Li J-p. Nervous system and gastric cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1873:188313. [\[Crossref\]](#)
7. Kuol N, Stojanovska L, Apostolopoulos V, Nurgali K. Role of the nervous system in cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37:5. [\[Crossref\]](#)
8. Neophytou CM, Panagi M, Stylianopoulos T, Papageorgis P. The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancers (Basel)*. 2021;13:2053. [\[Crossref\]](#)
9. Wang K, Demir IE, D'Haese JG, Tiefrunk E, Kujundzik K, Schorn S, et al. The neurotrophic factor neurturin contributes toward an aggressive cancer cell phenotype, neuropathic pain and neuronal plasticity in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2014;35:103-113. [\[Crossref\]](#)
10. Wu D, Yotnda P. Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp*. 2011:2899. [\[Crossref\]](#)
11. Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, et al. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab*. 2005;1:393-399. [\[Crossref\]](#)
12. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2002;277:23111-23115. [\[Crossref\]](#)
13. Faulkner S, Jobling P, March B, Jiang CC, Hondermarck H. Tumor neurobiology and the war of nerves in cancer. *Cancer Discov*. 2019;9:702-710. [\[Crossref\]](#)
14. Miknyoczki SJ, Lang D, Huang L, Klein-Zanto AJ, Dionne CA, Ruggeri BA. Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma: expression patterns and effects on *in vitro* invasive behavior. *Int J Cancer*. 1999;81:417-427. [\[Crossref\]](#)
15. Lagadee C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, et al. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene*. 2009;28:1960-1970. [\[Crossref\]](#)

16. Li D, Bai T, Brorson JR. Adaptation to moderate hypoxia protects cortical neurons against ischemia - reperfusion injury and excitotoxicity independently of HIF-1 α . *Exp Neurol*. 2011;230:302–310. [\[Crossref\]](#)
17. Ding Y, He D, Florentin D, Frolov A, Hilsenbeck S, Ittmann M, et al. Semaphorin 4F as a critical regulator of neuroepithelial interactions and a biomarker of aggressive prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19:6101–6111. 10. [\[Crossref\]](#)
18. Ceyhan GO, Bergmann F, Kadihasanoglu M, Altintas B, Demir IE, Hinz U, et al. Pancreatic neuropathy and neuropathic pain –a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*. 2009;136:177–186.e1. [\[Crossref\]](#)
19. Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*. 2003;113:867–879. [\[Crossref\]](#)
20. Gil Z, Cavel O, Kelly K, Brader P, Rein A, Gao SP, et al. Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:107–118. [\[Crossref\]](#)
21. Maugeri A, Calderaro A, Patanè GT, Navarra M, Barreca D, Cirmi S, et al. Targets involved in the anti-cancer activity of quercetin in breast, colorectal and liver neoplasms. *Int J Mol Sci*. 2023;24:2952. [\[Crossref\]](#)
22. Guo K, Ma Q, Li J, Wang Z, Shan T, Li W, et al. Interaction of the sympathetic nerve with pancreatic cancer cells promotes perineural invasion through the activation of STAT3 signaling. *Mol Cancer Ther*. 2013;12:264–273. [\[Crossref\]](#)
23. Kim MS, Lee WS, Jin W. TrkB promotes breast cancer metastasis via suppression of Runx3 and Keap1 expression. *Mol Cells*. 2016;39:258–265. [\[Crossref\]](#)
24. Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB. β -adrenergic receptors (β -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high β -AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130:747–758. [\[Crossref\]](#)
25. Sinha S, Fu Y-Y, Grimont A, Ketcham M, Lafaro K, Saglimbeni JA, et al. PanIN neuroendocrine cells promote tumorigenesis via neuronal cross-talk. *Cancer Res*. 2017;77:1868–1879. [\[Crossref\]](#)