

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPOKSİNİN KANSER KÖK HÜCRELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Kök Hücre Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Cansu GÖRGÜN

İZMİR

(2015)

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPOKSİNİN KANSER KÖK HÜCRELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Kök Hücre Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Aylin Şendemir Ürkmez

Yüksek Lisans Tezi

Cansu GÖRGÜN

İZMİR

(2015)

ÖNSÖZ

Çalışmalarım süresince bilimsel katkıları ile yol gösteren, destek olan, hem de sonu engellenemez fikirleri ile bana her zaman yeni ufuklar açan, sadece akademik hayatta değil, günlük hayatta da ihtiyacım olan her anda yanımda olan, akademik idolüm, sevgili tez danışmanım Yrd. Doç. Aylin Şendemir Ürkmez'e, engin tecrübeleri ile bana baştan sonra hücre kültürünü öğreten, tecrübelerini paylaşmaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum önceki danışmanım, laboratuvarımızın vazgeçilmez yol göstericisi sayın Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu Gürhan'a, her yardıma ihtiyacım olduğunda tecrübelerini benimle paylaşan Yrd. Doç. Sultan Gülçe İz'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İmmunohistokimyasal ve histolojik boyamalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca yanımda olan sevgili EgeREACT üyeleri Mert Duman, Şükrü Öztürk, Ece Bayır, Eyüp Bilgi, Şeyma Çoğan, Mehmet Özgün Özen, Duygu Ayyıldız Tamiş, Öznur Özarslan, Ilgın Kımız ve Müge Anıl arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince iyi ve kötü anılarımı paylaşan, manevi destek ve yardımlarını benden esirgemeyen dostum İsmail Eray Akgün'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca verdikleri maddi ve manevi destek ile her zaman yanımda olan annem, babam ve kardeşime, bana her zaman güvendikleri için içten teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel araştırma desteği ile tez çalışmamı destekledikleri için Aliye Üster Vakfı'na teşekkür ederim.

İzmir, 2015

Cansu Görgün



ÖZET

“Hipoksinin Kanser Kök Hücrelerine Etkisinin İncelenmesi”

Cansu Görgün

Yüksek Lisans Tezi, Kök Hücre Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Aylin Şendemir Ürkmez

2015

Hipoksi, oksijen eksikliği olarak tanımlanan bir ortamdır ve kanser kök hücrelerinin karakterinin devamlılığını sağlaması nedeniyle tümörlerde önemli bir role sahiptir. Bu çalışmanın amacı, kanser kök hücrelerinin 2 boyutlu (2B) ve 3 boyutlu (3B) kültürlerde hipoksik şartlar altında davranışlarını ve karakterlerini incelemektir. Çalışmada, CD133 yüzey proteini ile karakterize edilmiş olan osteosarkoma kanser kök hücreleri, manyetik aktiflenmiş hücre ayırımı (MACS) tekniği ile osteosarkoma kanser kök hücrelerinden izole edilmiştir. Kontrol grubu olarak da satın alınmış olan osteosarkoma kanser kök hücre hattı (OKKH, Celprogen Inc.) kullanılmıştır. OKKH, CD133+ ve CD133- hücreler 3 gün boyunca hipoksik (%1 O₂) ve normoksik (%21 O₂) koşullarda kültüre edilmiştir. 3B model için bakteriyel selüloz doku iskelesi kullanılmıştır. Hücrelerin 3 boyutlu morfolojileri SEM analizi ile incelenmiş, kantitatif PCR, ALP aktivitesi ve immünohistokimyasal boyama ise kanser kök hücrelerinin 2B ve 3B olarak hipoksik şartlar altında karakterlerinin incelenmesi için uygulanmıştır. Hücre canlılığı 3. ve 7.günlerde MTT analizi ile gösterilmiştir. Bu çalışma, kanser kök hücre davranışını ve *in vitro* tümörigenezin çalışılması için bir 3B hipoksik tümör model olarak da tanımlanabilir.

Bu tez projesi Aliye Üster Vakfı tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hipoksi; kanser kök hücreleri; 3B tümör modeli; bakteriyel selüloz



ABSTRACT

“The Hypoxia Effect on Cancer Stem Cells”

Cansu Görgün

MSc, Department of Stem Cell

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aylin Şendemir rkmez

2015

Hypoxia is known as a condition, which is characterized by the lack of oxygen. The hypoxia effect on tumors has a critical important role on maintenance of cancer stem cell phenotype . The aim of this study is to investigate the hypoxia effect on cancer stem cells on 3 dimensional (3D) *in vitro* culture models. In this study, osteosarcoma stem cells, which are characterized by CD133 surface protein, were isolated from osteosarcoma cell line (SaOs-2) by magnetic-activated cell sorting (MACS) technique. As a control group; osteosarcoma stem cell line (OSCs, Celprogen Inc.) was used. OSCs, CD133+ and CD133- cells were cultivated under hypoxic (1% O₂) and normoxic conditions (21% O₂) for 3 days. For the 3D model, bacterial cellulose scaffold was used as the culture substrate. 3D morphologies of cells were examined by scanning electron microscopy (SEM); RT-PCR, ALP activity and immunocytochemistry staining were used to demonstrate conservation of the cancer stem cell phenotype in 3D environment under hypoxic conditions. Also cell viability was shown by MTT assay on 3. and 7. culture days. This study is seen as an introduction to develop a 3D hypoxic cancer stem cell based tumor model to study CSC behaviour and tumorigenesis *in vitro* under. This thesis project was supported by Aliye ster Foundation.

Keywords: Hypoxia; cancer stem cells; 3D tumor model; bacterial cellulose



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
KISALTMALAR	
LİSTESİ.....	XV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kök Hücre.....	2
2.2. Kanser Kök Hücreleri	5
2.2.1. Kanser Kök Hücre Teorisi	5
2.2.2. Kanser Kök Hücre Belirteçleri	8
2.3. Kanser Metabolizması	10
2.3.1. Kanserde ROS Faktörleri	11
2.3.2. Kemik Kanseri.....	12
2.4. Hipoksi	13
2.4.1. Hipoksi ve Kanser İlişkisi.....	14
2.4.2. Hipoksi ve Kanser Kök Hücre İlişkisi.....	16
2.4.3. Hipoksi ve Kemik Kanser Kök Hücreleri.....	19
2.5. Doku İskeleleri ve Doku Mühendisliği	20
2.5.1. Üç Boyutlu Hücre Kültürü.....	21
2.5.1. Bakteriyel Selüloz Doku İskelesi.....	22
2.6. Üç Boyutlu Kanser Tümör Modellerinin Önemi	23
3. GEREÇ- YÖNTEM	26
3.1. Hipoksi Sistemin Kurulması	27
3.2. SaOS-2 ve OKKH Hücre Kültürü ve Hücre Hattının Karakterizasyonu	28

3.2.1 SaOS-2 Hücre Hattının Kültürü.....	28
3.2.1.1. SaOS-2 Hücre Hattının Stoklanması.....	28
3.2.1.2. SaOS-2 hücrelerinin dondurulması.....	29
3.2.1.3. SaOS-2 hücrelerinin pasajlanması	30
3.2.2. SaOS-2 Hücre Hattının Karakterizasyonu	31
3.2.2.1. SaOS-2 Hücre Hattının Büyüme Kinetiği.....	31
3.2.2.2. SaOS-2 Hücre Hattının Kalibrasyon Eğrisinin Çıkartılması	31
3.2.2.3. SaOS-2 Hücre Hattının Tutunma Testi	32
3.2.3. OKKH Hücre Hattının Kültürü	32
3.3. MACS Sistemi ile Hücre Ayrımı.....	33
3.4. Bakteriyel Selüloz Doku İskelelerinin Hazırlanması	34
3.5. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında Hücre Kültürü ve Analizler	35
3.5.1. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür ve Analizler	35
3.5.1.1. Hipoksik ve Normoksik Şartlar altında 2 Boyutlu Kültür MTT	
Analizi.....	35
3.5.1.2. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür	
İmmünohistokimyasal Boyama Analizleri.....	36
3.5.1.3. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür Kantitatif	
PCR Analizi	37
3.5.1.4. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür Alkalen	
Fosfataz Aktivitesi Analizi.....	41
3.5.2. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültür ve Analizler	42
3.5.2.1. Hipoksik ve Normoksik Şartlar altında 3 Boyutlu Kültür MTT	
Analizi.....	42
3.5.2.2. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültür	
İmmünohistokimyasal Analizleri.....	43
3.5.2.3. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültür Kantitatif	
PCR Analizi	44
3.5.2.4. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür Alkalen	
Fosfataz Aktivitesi Analizi.....	44

3.5.2.5. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kùltürlerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntü Analizi.....	44
3.6. İstatiksel Analiz	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Hücre Morfolojileri.....	47
4.2. SaOs-2 Hücre Hattının Kalibrasyon Eğrisi	48
4.3. SaOs-2 Tutunma Testi	49
4.4. SaOs-2 Büyüme Kinetiği	50
4.5. MACS Sisteminin Optimizasyonu	51
4.6. Bakteriyel Selüloz Doku İskelesi SEM Görüntüleri	52
4.7. Hipoksik ve Normoksik Şartlar altında 2 Boyutlu Kùltür MTT Analizi	53
4.8. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kùltür İmmunohistokimyasal Boyama Analizleri.....	54
4.9. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kùltür Kantitatif PCR Analizi	57
4.10. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kùltür Alkalen Fosfataz Aktivitesi Analizi	60
4.11. Hipoksik ve Normoksik Şartlar altında 3 Boyutlu Kùltür MTT Analizi	61
4.12. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kùltür İmmunohistokimyasal Analizleri.....	63
4.13. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kùltür Kantitatif PCR Analizi	65
4.14. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kùltür Alkalen Fosfataz Aktivitesi Analizi	70
4.15. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kùltürlerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntü Analizi.....	71
5. TARTIŞMA	75
7. KAYNAKLAR	81



Şekiller Dizini

Şekil 2.1: Kök hücrelerin sınıflandırması	4
Şekil 2.2: Kanser kök hücre evrimi	7
Şekil 2.3: Kanser kök hücre belirteçlerine örnekler	9
Şekil 2.4: HIF aktivitesinin kanser kök hücrelere etkisi	17
Şekil 2.5: Tümör büyümesi (a) 2B kültür (b) 3B kültür (c) <i>in vivo</i>	24
Şekil 3.1: Çalışma planı	26
Şekil 3.2: Hipoksi cihazı, akış ölçer ve gaz tüpü	28
Şekil 4.1: Hücrelerin ters faz ışık mikroskop görüntüleri.. ..	47
Şekil 4.2: SaOs-2'ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi	48
Şekil 4.3: SaOs-2 tutunma testi	50
Şekil 4.4: SaOs-2 hücrelerinin büyüme kinetikleri	51
Şekil 4.5: BS doku iskelesinin gözenek çapları	52
Şekil 4.6: Hücrelerin 2B 3. gün MTT analizi	52
Şekil 4.7: Hücrelerin 2B 7. gün MTT analizi	53
Şekil 4.8: 2B kantitatif PCR OCT4 ekspresyonu	58
Şekil 4.9: 2B kültür kantitatif PCR NANOG ekspresyonu	58
Şekil 4.10: 2B kültür kantitatif PCR SOX2 ekspresyonu	59
Şekil 4.11: 2B kantitatif PCR HIF1-alfa ekspresyonu	60
Şekil 4.12: 2B kantitatif PCR HIF2-alfa ekspresyonu	60
Şekil 4.13: 2B ALP aktivite grafiği	61
Şekil 4.14: Hücrelerin 3B 3. gün MTT analizi	62
Şekil 4.15: Hücrelerin 3B 7. gün MTT analizi	63
Şekil 4.16: Kantitatif PCR CD133+ ekspresyonu	66
Şekil 4.17: Kantitatif PCR OCT4 ekspresyonu	67
Şekil 4.18: Kantitatif PCR HIF1- Alfa ekspresyonu	68
Şekil 4.19: Kantitatif PCR HIF2- Alfa ekspresyonu	68
Şekil 4.20: Kantitatif PCR NANOG ekspresyonu	69

Şekil 4.21: Kantitatif PCR SOX2 ekspresyonu.....	69
Şekil 4.22: 3B ALP aktivite grafiği.....	70
Şekil 4.23: Hücrelerin SEM görüntüleri.	71



Tablolar Dizini

Tablo 3: Deneyde kullanılan kantitatif PCR primerleri.....	40
Tablo 4.1: SaOs-2 kalibrasyon eğrisinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları.....	49
Tablo 4.2: MACS ayırım oranları.....	52
Tablo 4.3: Hipoksik şartlar altında 2B olarak inkübe edilen hücre gruplarının immünohistokimyasal boyama resimleri.....	55
Tablo 4.4: Normoksik şartlar altında 2B olarak inkübe edilen hücre gruplarının immünohistokimyasal boyama resimleri.....	55
Tablo 4.5: Hipoksik şartlar altında 3B olarak inkübe edilen hücrelerin immünohistokimyasal boyama resimleri.....	64
Tablo 4.6: Normoksik şartlar altında 3B olarak inkübe edilen hücrelerin immünohistokimyasal boyama resimleri.....	64





1. GİRİŞ

Kanser dünyadaki ölüm sebepleri arasında en başta yer almaktadır. Gelişen araştırma ve terapi olanaklarına rağmen, metastaz sebebi ile tedaviler başarısız kalmaktadır. Bu tedavilerin başarısız kalması genel olarak radyo- ve kemoterapiye olan direnç ile bağdaştırılmaktadır. Tümör hücrelerinin mikro çevresinin, direnç sağlanmasında önemli bir rolü olduğu hipotezi ise günümüzde araştırma konularında önem kazanmış bir alandır. (1) Düşük oksijen seviyesi olarak tanımlanan hipoksi ise tedavi direncinin ana nedeni olarak görülmektedir. Tümör mikro çevresinin düşük oksijen seviyesine sahip olması ancak bu düşük oksijen seviyesine rağmen yüksek bir glikoliz metabolizmasına sahip olması, hipoksinin tümör ve kanser hücreleri için önemini göstermektedir.(2)

Bir çok çalışma kök hücrelerin belirli mikro çevrelerde yoğunlaştıklarını ve bu mikro çevrelerin onların farklılaşmasını engellediğini ve kök hücre karakterlerini devam ettirmelerine olanak sağladığını göstermiştir (3). Kanser kök hücrelerinin hipoksi ile ilişkisi de birçok farklı çalışmada kanıtlanmıştır (4). Her ne kadar kanser kök hücreleri hipoksi varlığında kemo-direnç ve radyo-direnç geliştirme özelliği göstermiş olsa da bu konudaki çalışmaların sayısı sınırlıdır. (5) 2B olarak yapılan *in vitro* çalışmalar ne kadar bu hipotezi desteklese bile 3B oluşturulacak olan hipoksi modeli, hem kanser kök hücrelerini içermesi hem de tümörlerin *in vivo* ortamındaki davranışlarını yansıtmaları için uygun olmalıdır. (6) 3B olarak yapılan *in vitro* çalışmalar ne kadar bu hipotezi desteklese bile 3B oluşturulacak olan hipoksi modeli, hem kanser kök hücrelerini içermesi hem de tümörlerin *in vivo* ortamındaki davranışlarını yansıtmaları için uygun olmalıdır. (6) 3B olarak yapılan *in vitro* çalışmalar ne kadar bu hipotezi desteklese bile 3B oluşturulacak olan hipoksi modeli, hem kanser kök hücrelerini içermesi hem de tümörlerin *in vivo* ortamındaki davranışlarını yansıtmaları için uygun olmalıdır. (6)

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

Kök hücreler literatürde; kendini yenileme ve spesifik hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanmaktadır. Diğer hücreler örneğin; karaciğer hücreleri, kalp hücreleri belli bir işleve sahip olmalarına rağmen kök hücre karakterinde değildirler. Kök hücrelerin; asimetric veya simetric bölünerek, kas hücresi veya sinir hücresi gibi belli bir fonksiyonu olan hücreye dönüşmesine diferansiyasyon denir ve bu yetenekleri onları eşsiz kılmaktadırlar. Kök hücreler değişik tiplerde olmak üzere embriyodan, fetüsten ve erişkinlerden elde edilirler (6). Bu hücreler olgunlaşmamışlardır hücrelerdir ancak, vücuttaki herhangi bir hücreye farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Kök hücreler kendini yenileme ve bu farklılaşma özellikleriyle, yeni doku oluşturabilir ve zarar görmüş dokuları onarabilirler (7).

Kök hücreler diğer hücrelerden iki önemli özellikleriyle ayrılırlar. Bunlardan birincisi, hücre bölünmesiyle kendilerini yenileyebilme özelliğine sahip özelleşmemiş hücreler olmaları; ikincisi ise bazı spesifik fizyolojik veya deneysel koşullar altında doku veya organa özgü, özelleşmiş hücrelere dönüşebilmeleridir. Bağırsak ve kemik iliği gibi bazı kısımlarda bulunan kök hücreler hasarlı veya yıpranmış hücrelerin devamlılığını sağlayabilmek adına düzenli olarak bölünürler. Pankreas ve kalp gibi diğer bazı organlarda ise özel durumlarda bölünmeleri gözlemlenir.(8)

Kök hücrelerin, kök hücre özelliklerini koruduğu mikro çevreler niş olarak adlandırıldılar. Ancak bu çevreler teorik olarak büyük bileşenlerdir ve tek olarak kök hücrelerin tanımlanması ve manipüle edilmesi açısından büyük önem taşırlar. Teknik avantajlardan bazıları deri, gut gibi doku ve organlardaki küçük alanları karakterize edip kök hücrelerin aktivitelerini tanımlamaya yardımcı olabilir. Bu çalışmalar günümüzde daha çok kök hücre alanında niş tanımına yönelmekle beraber, kök hücre regülasyonunun moleküler ve hücre seviyesinde anlaşılması ve bu verilerin kök hücrelerin terapötik olarak kullanımını hedeflemektedir (9).

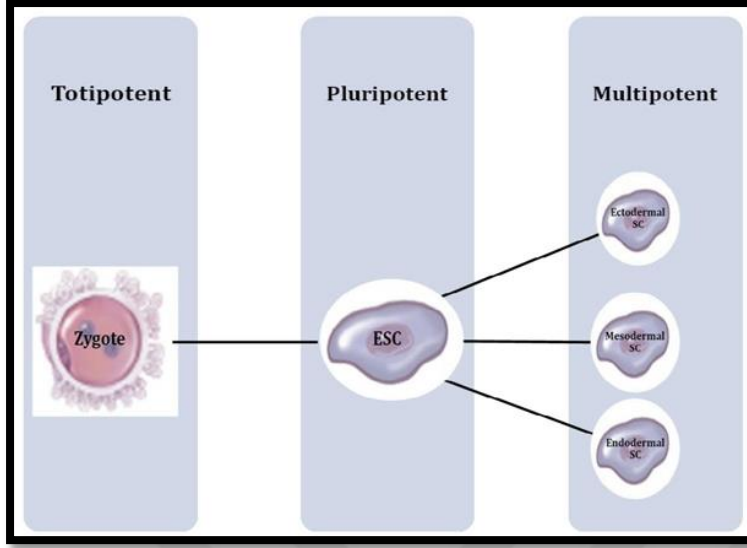
Kök hücreler; farklı tür hücelere farklılaşma kapasitelerine göre 3 alt grupta sınıflandırılmaktadır:

a) Totipotent Kök Hücreler: Yaşamı devamlı kılmasının yanında, bu tür kök hücrelerin en önemli grubunu oluşturur. Sınırsız sayıda farklılaşma yeteneği olan hücreler olarak tanımlanırlar. Bu tür hücreler ancak fetüsün erken evresinde bulunurlar ve hemen her türlü vücut hücresine dönüşebilme yetenekleri vardır. Klonlama için önemli bir araç olarak görülen bu kök hücre türü, zigottan sonra fetüsün erken evresine kadar her türlü hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip olmalarının yanı sıra klonlama amaçları için de kullanılabilir (10).

b) Pluripotent Kök Hücreler: Totipotent hücelere göre daha sınırlı farklılaşma özellikleri vardır. Bununla birlikte organizmada birçok dokunun oluşması veya onarımı yeteneğine sahip hücreler olarak da tanımlanırlar. Embriyonik kök hücre pluripotent olarak tanımlanır. Memeli blastosit evresinde iç kümeden elde edilen bu hücreler birçok hücre tipine farklılaşabilirler (11). Bu özellikler, özellikle embriyonik kök hücrelerin hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasında, birçok hastalığın tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, bu pluripotent hücrelerin kullanımı, embriyonik kök hücreler açısından birçok etik probleme neden olmaktadır (12).

c) Multipotent Kök Hücreler: Tek bir yönde farklılaşabilen hücrelerdir. Örnek olarak beyinden elde edilen kök hücrenin yalnızca sinir hücresine dönüşmesi verilebilir. Son iki tür hücre erişkin insan bedeninden elde edilebilir. Özelleşmenin son adımlarından biri olarak görülen multipotent kök hücreler, farklılaşma açısından limitlidirler. Üç germ tabakasından birinde bulunan bu kök hücreler, sadece kendi germ tabakalarındaki hücelere farklılaşabilirken, diğer germ tabakalarındaki hücelere farklılaşamazlar (13).

Bunların dışında günümüzde, bazı literatürlerde bu üç ana sınıflandırmanın yanı sıra oligopotent ve unipotent gibi sınıflandırılmalar da kullanılmaktadır (14).



Şekil 2.1: Kök hücrelerin sınıflandırması (15)

Kök hücreler genel olarak 3 farklı grupta tanımlanır:

1- Embriyonik Kök Hücreler: Embriyonik kök hücreler 2-11 günlük blastositlerden elde edilen kök hücrelerdir. Genellikle insan kaynaklı elde edilen embriyonik kök hücreler fertilizasyon merkezlerinde bulunmaktadır (16). Totipotent özellikte olmakla beraber, 3 farklı germ tabakasındaki hücelere farklılaşabilirler. Embriyonik kök hücreler farklılaşmamış durumda kalarak yayılmaları ile ölümsüz olarak tanımlanırlar. Bu kök hücreler yüksek seviyede rejeneratif etkiye ve hasarlı doku ve organları iyileştirme gücüne sahiptir (17). Embriyonik kök hücrelerin totipotent olduğuna dair bazı yaklaşımlar olmasına karşın, büyümeleri ve farklılaşmaları ile ilgili birçok biyolojik soru da vardır. Embriyonik kök hücreleri en güvenli transplantasyonu sonucunda bile düzensiz hücre büyümesi ve teratoma oluşumu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (18). Çalışmalar, embriyonik kök hücrelerin güvenli transplantasyonu üzerine odaklansa bile, EKH'ler terapötik olarak kullanım alanında ancak araştırma kapsamında kalmaktadır. Klinik uygulamalara geçmeden önce embriyonik kök hücrelerin rejeneratif tıp alanında kullanılması için öncelikle bu hücreler hakkındaki soru işaretlerinin giderilmesi gerekmektedir. Federal hükümetlerin embriyonik kök hücreleri etik kullanımları açısından koydukları kurallara uygun açıdan gerçekleştirilen deneylerle bu sorunların üstesinden gelinmesi hedeflenmektedir (19).

2- Erişkin Kök Hücreler: Erişkin kök hücreler genellikle erişkin dokularda bulunmaktadır. Multipotent özellik göstermekle beraber, birden fazla hücre türüne farklılaşmalarına rağmen tüm hücre türlerine farklılaşamazlar (20). Erişkin kök hücreleri gelişmiş organizmalarda bulunmakla beraber iki özellik göstermekle tanımlanırlar: Birincisi, bölündükleri kendilerine benzer iki hücre oluşturmaları veya bölündüklerinde kendilerine benzer ve farklılaşmış hücreler oluşturmalarıdır. Multipotent olarak görülen bu özellikleriyle beraber genellikle bulundukları dokunun orijini dışına çıkmazlar. Bu erişkin kök hücreleri mezenşimal kök hücreler, yağ-doku kökenli kök hücreler, endotel kök hücreleri, diş pulpa kök hücreleri vb. olarak da tanımlanırlar (21). Embriyonik kök hücreler memeli blastosit evresindeki embriyolarından köken alırken, erişkin kök hücreler dokuya spesifik hücrelerden orijinlenir ve kökenlerine dönüşmeye eğilimlidirler (22).

3- İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler: Başarılı olarak insan somatik hücrelere geri-programlanmış olan kök hücrelerdir. Hasta ve hastalık hedefli kök hücreler olarak görülmektedirler. Bu kök hücreler dört farklı transkripsiyon faktörünün genetik aktarımıyla oluşturulmuş ve germ tabakalarının transmisyonunu sağladıkları gösterilmiştir. Bu dört farklı transkripsiyon faktörü ise *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, ve *c-Myc* olarak tanımlanmıştır (12). Bu faktörlerin genetik aktarımından sonra hücrelerin embriyonik kök hücre benzeri davranış gösterdiği kanıtlanmış ve bu çalışma ile 2012 yılında Nobel ödülü kazanılmıştır (23)

2.2. Kanser Kök Hücreleri

2.2.1. Kanser Kök Hücre Teorisi

Tümörlerin yoğun hücre tabakalarından izole edilen hücrelerin karakterizasyonu sonucunda elde edilen veriler, tümörlerin uzun süreli olarak varlıklarını devam ettirebilmeleri nedeni olarak görülen hücrelerin kanser kök hücreleri veya kanser başlatan hücreler olduklarını göstermektedir (24). Günümüzde kanserin tedavisinde önemli bir biyolojik araç olarak görülen bu kanser kök hücre modeli oldukça eski bir teori olmasına rağmen 1970'lerin başında önem kazanmaya başlamıştır. İmmünofloresan, akış sitometrisi gibi gelişen teknik araçlar sayesinde kanser üzerine

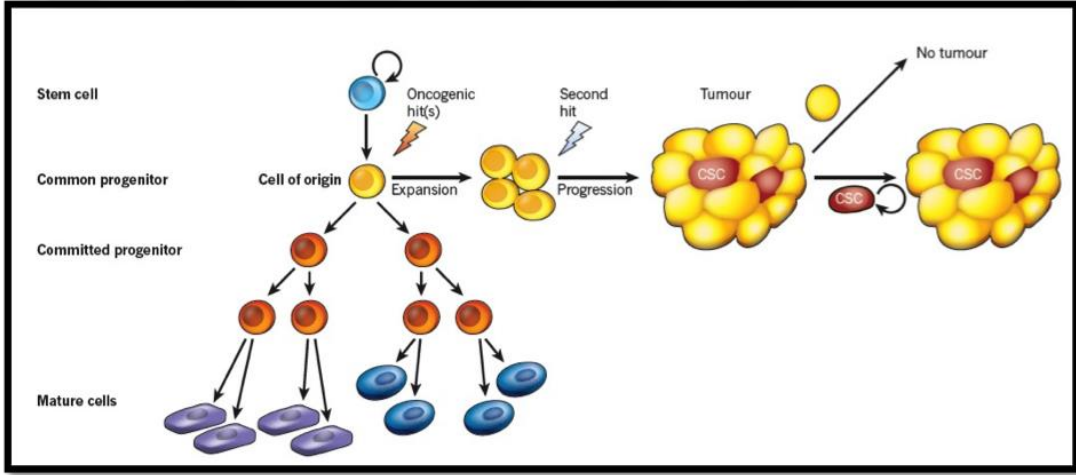
yapılan araştırmalar lösemi gibi hemapoetik sistemlerde ve katı tümörlerde kanser kök hücre teorilerinin araştırılmasına neden olmuştur (25).

Germ hücreleri ve kök hücre konseptlerinin yaklaşık 150 yıl önce ortaya çıkmalarına rağmen, kök hücre ve avantajlarının kanser üzerinde kanser kök hücrelerini hedefleyerek incelenmesi yeni bir araştırma konusudur. Bu kök hücre konseptinin kanser kök hücreleri üzerine uygulanması iki önemli hipoteze dayanmaktadır. Bunlardan birincisi; tümörlerin kök hücrelerden veya kök hücrelerin yenilenmesi sırasında düzensiz olarak türeyen akranlarından köken aldığı ve ikincisi ise buna dayanarak tümörlerin kök hücre özellikleri içeren bir alt tabakalarının olduğu hipotezleridir (26).

Kanser kök hücresi (KKH) teorisine göre, KKH' lerinin sadece spesifik bir alt tabakası kanser büyümesini desteklemektedir. KKH karakterini tanımlayan dört adet ana karakteristik vardır; (a) immün yetmezliği olan fareye enjekte edildiğinde, kanser kök hücrelerinin sadece küçük bir kısmı tümörojenik potansiyel gösterebilir; (b) kanser kök hücreleri diğer kanser hücrelerinden hücre yüzey belirteçleri ile ayrılabilir; (c) KKH' lerinden kaynaklanan tümörler orijinal tümörler gibi tümörojenik ve tümörojenik olmayan hücrelere sahiptirler; ve (d) KKH alt popölasyonu seri olarak bir çok jenerasyona kendini yenileme özelliği ile beraber aktarılabilir (27). KKH'lerinin devamlı olarak tümör büyümesini tekrarlama özellikleri sadece deneysel olarak ifade edilebilir. Bu özellikleri nedeniyle de literatürde genel olarak kanser başlatan hücreler veya tümörojenik hücreler olarak da tanımlanmaktadır (28).

Buna rağmen güncel çalışmalar tümör oluşumunu destekleyen kök hücrelerin varlığını göstermektedir. Tümör hücrelerinin hepsi bu tümör oluşumunu desteklemez iken, kök hücrelerin varlığı gösterildiğinde, devamlı olarak seyreden bir tümör oluşumu gözlenmektedir (şekil 2) (29). Kanser kök hücreleri ilk olarak lösemide tanımlanmış olmasına rağmen, solid tümörlerde tanımlanmaya devam edilmektedir. Bununla beraber, kanser kök hücrelerinin, kanser başlatan hücrelerle aynı hücreler olmadığı tümör gelişimi sırasında gösterilmiştir (şekil 2). İç ve dış faktörler, özel niş olarak tanımlanan bu mikro çevreler, kanser kök hücrelerinin farklılaşmasını desteklemektedirler (30).

Paralel çalışmalar da tümör oluşumunun ve metastazın kanser kök hücre karakteri ve fenotipi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu gözlemler ve çalışmalar, kanser kök hücrelerini kanser tedavisinde en önemli hedefler haline getirmektedir. Bu ilişkiye rağmen kanser kök hücreleri genellikle kemoterapi ve radyoterapiye dayanıklı olmalarıyla da tanımlanmaktadırlar (31). Kanser kök hücrelerinin oluşumunun bazı özel nişler tarafından desteklendiği, bu nişlerin ise özel hücre tiplerinden ve komşu hücrelerle olan ilişkilerinden kaynaklanan mikro çevreler olduğu gösterilmektedir (32). Sonuçta, bu mikro çevrelerin (niş) terapi rezistansı üzerine önemli bir rolü olduğu tanımlandığından ve kanser kök hücre karakterinin devamlılığını sağladığından dolayı kanser kök hücre karakterinin anlaşılabilmesi için kritik bir role sahiptirler.



Şekil 2.2: Kanser kök hücre evrimi

Kök hücreler üzerine yapılan çalışmalar ve farklılaşma programları, kök hücreler ve onların farklı türleri arasındaki ilişkinin aynı zamanda EMT olarak tanımlanan epiteliyal-mezenşimal translasyona dayandığını da göstermektedir (33). Ancak, EMT'nin genellikle hipoksik ortamlarda türevlendiği göze alınırsa, bu hipotez de kanser kök hücrelerinin kontrolsüz olarak çoğalan kök ve progenitör hücrelerden kökenlendiği hipotezinden daha çok, genel olarak kanser kök hücrelerinin dominant büyüme hormonları içeren niş ortamlarında kökenlendiği hipotezini öne çıkarmaktadır (34).

Kanser kök hücrelerine karşı büyüyen bu ilgiye rağmen, deneysel çalışmalar henüz kanser hastalarının iyileşme oranlarında bir artış sağlamamıştır. Bu durum da kanser kök hücrelerinin deneysel olarak anlamlı olmasına rağmen, gerçekte biyolojik

yapılarının hala tam anlaşılmadığını ortaya koymaktadır. Kanser kök hücrelerinin günümüzde önem kazanan bir konu olmasına rağmen, az sayıdaki kanser hastası üzerinde çalışılmış olması ve sadece belirli kanser türlerinde çalışılmaya devam edilmesi, kanser kök hücre modelinin hala tüm kanser türleri için geçerli bir model olmadığı düşüncesine neden olmaktadır (25, 26).

2.2.2. Kanser Kök Hücre Belirteçleri

Her hücre tipi, örneğin-karaciğer hücresi, kendisini diğer hücrelerden farklı kılan bir hücre yüzey reseptörleri kombinasyonuna sahiptir. Bu özellikler kullanılarak, kök hücre yüzey reseptörleri saptanmış ve bazı kimyasal ajanlarla beraber hücreleri işaretlemek için kullanılmış, böylece ortaya kök hücre belirteçleri ortaya çıkmıştır (35). Gen ekspresyon belirteçleri ise kök hücre dünyasında hala araştırılan konulardandır. Özellikle bu belirteçleri tek bir kök hücre tipine ait olmaması, birçok kök hücre tipinde yer alması günümüzde kök hücre araştırmalarını zorlaştıran nedenler arasındadır. Ancak buna rağmen, var olan kök hücre belirteçleri kullanılarak günümüz araştırmaları gerçekleştirilmekte ve belirteçler üzerine çalışmalar devam etmektedir (36).

Günümüzde, birçok CD belirteci kök hücre belirteçleri olmakla beraber kanser kök hücrelerini tanımlamak için de kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda belirtilmiş olan tüm kanser kök hücre belirteçleri her kanser türünde bulunmamasına rağmen, tümörlerde az miktarda bulunan bazı hücrelerin tümör oluşumunu desteklediği ve literatürdeki birçok kök hücre belirtecini içerdikleri gösterilmiştir. Örneğin; CD133, CD24 ve CD44 belirteçleri kanser kök hücre belirteçleri olarak tanımlansa bile, prognostik değerleri hala tam olarak açıklanamamıştır (37). Prominin veya PROML1 olarak da bulunan CD133 kök hücre yüzen antijeni aynı anda beyin, kolon ve prostat kanserlerinde KKH belirteci olarak gösterilmiştir (38, 39). Bir hedef hücre adezyon molekülü olarak bilinen CD44 ise lenfosit, monosit ve granülositlerde hücre yüzey glikoproteini olmakla beraber meme, baş ve boyun kanser kök hücre belirteci olarak da tanımlanmıştır (40).

İnsan ve fare kök hücre belirteçleri: CD34, CD133, CD117, Sca-1, CD44, CD24, CD20, CD105 ve CD326 (EpCAM) kanser kök hücreleri üzerinde de bulunmuştur. Bu

belirteçleri içeren kanser kök hücrelerinin farklı hematolojik ve solid tümörlerde tümör büyümesini başlatmayı ve sürekliliğini sağladığı düşünülmektedir.

Kolon kanseri	ESA ⁺ CD44 ⁺
Kolon kanseri	ESA ⁺ CD166 ⁺
Kolon kanseri	CD133 ⁺
Meme kanseri	CD44 ⁺ CD24 ⁻
Dalak kanseri	CD44 ⁺ CD24 ⁺ ESA ⁺
Baş ve boyun kanseri	CD44 ⁺
Glioblastom	CD133 ⁺
Medülloblastom	CD133 ⁺
Melanom	CD20 ⁺
Over kanseri	CD44 ⁺
Akut miyeloid lösemi	CD34 ⁺ CD38 ⁻
Prostat kanseri	CD133 ⁺ CD44 ⁺
Multipl miyelom	CD138 ⁻

Şekil 2.3 : Kanser kök hücre belirteçlerine örnekler (41)

Aşağıda, kanser türlerinde bilinen belirteçlere ait bazı örnekler verilmiştir:

- 1- Meme Kanseri Kök Hücreleri: CD44⁺/CD24^{-düşük}, CD133⁺, ALDH^{yü.} belirteç kombinasyonlarının kanser kök hücrelerinin hücre büyümesi, koloni formasyonu, adezyon ve migrasyonunun yanı sıra metastazını ve tümör oluşumunu arttırdığı MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde gösterilmiştir (42)
- 2- Ovaryum Kanseri Kök Hücreleri: CD133⁺, ALDH^{yüksek}, CD44⁺, CD117⁺, CD24⁺ belirteçleri tanımlanmıştır. Ovaryum kanseri içerisinde bu kadar çok farklı belirteç profilinin olması yumurtalık kanserinin heterojen bir kanser olduğunu göstermektedir. Bu nedenle belirteçlerin yanı sıra köken ve potansiyel nedenlerin belirteçlerle ile bağdaştırılması klinik tedavi stratejilerinin gelişmesini sağlayabilir (43).

- 3- Beyin Tümörü Kanser Kök Hücreleri: Tanımlanan belirteç CD133⁺’dır. CD133 pozitif hücreler ve CD133 negatif hücreler aynı şartlar altında farklı kaplarda izole edilip, kültür edildiğinde CD133 pozitif tümör hücreleri tümör küreleri oluşturup hücre sayısı artarken, CD 133 negatif hücreler çoğalmamış ve tümör küreleri oluşturmamışlardır (43).

Kanser kök hücrelerinin tanımlanmasında kök hücre belirteçlerinin ve kanser türüne özgü doku tip hücre belirteçlerinin kullanılması bir avantaj olsa bile daha farklı kanser türlerinde yeni belirteç bulma çalışmalarının bazı zorlukları vardır. Biyopsi gibi zor çalışmalar, izole edilen hücrelerin kısa yaşam süreleri, izole edilen tümördeki az miktardaki kök hücre oranı gibi nedenler belirteçler üzerine yapılan çalışmaların yavaş ilerlemesine neden olmaktadır (40).

2.3. Kanser Metabolizması

Küresel kanser toplumu, Temmuz 2006 tarihinde ABD, Washington DC’de yapılan Dünya Kanser Kongresi’nde, Birinci Dünya Kanser Bildirgesi’ni yayınlarak dünya genelinde kanser krizini ele almak üzere bir acil eylem çağrısı etrafında birleşmiştir. Bu bildirme, 2020 itibarıyla küresel kanser krizini tersine çevirebilmek için atılmasına ihtiyaç duyulan adımları genel hatlarıyla vermekle beraber, kanserin dünya çapında önemli bir tehdit olduğuna da dikkat çekmektedir [8]. Dünya genelinde, 2008 yılında 12,7 milyon kanser hastası tespit edilmekle birlikte, bu sayının 2030 yılında 21 milyona çıkması beklenmektedir (44). Türkiye’de ise her yıl 200 bine yakın kişiye kanser teşhisi konulmakta ve bu rakamın 2030’da yarım milyona ulaşabileceği belirtilmektedir (45). Bunların haricinde, tüm dünyada ve Türkiye’de kanser tedavisi için ayrılan bütçe giderek büyümektedir. Günümüzde ise kanserin tedavisi için yapılan araştırmalarda kanser kök hücreleri büyük yer tutmaktadır. Son on yıl içerisinde yapılan deneyler, kanserlerin, kök hücre özelliği gösteren bir tür malign hücrelerden türevlendiğini göstermiştir (46). Her ne kadar, kanser kök hücreleri bir paradigma içerisinde olsa bile, gerek kök hücre özelliklerinden dolayı gerekse kanser tedavisi için yeni ve başarılı yaklaşımların geliştirilmesi için günümüzdeki çalışmalarda ön planda tutulmaktadır (47). Kanser kök hücrelerinin kanser başlatma özelliği ve tümör

oluşturma kapasitelerinin açıklanması, gelecekteki kanser tedavilerinin geliştirilmesi için dünya çapında önemli bir yer tutmaktadır.

2.3.1. Kanserde ROS Faktörleri

Kanser hücrelerinin anormal redoks sistemleri ve metabolizmalarına etkisi ilk olarak Warburg etkisi olarak tanımlanmıştır (48) ATP normal hücresel proseslerin devamı için gereklidir, tümör hücrelerine hızlı üremeyi sağlayacak derecede ATP gerekmektedir. Özellikle tümör hücrelerinin bu çoğalmayı sağlamak için, normalde stres koşulları altında çoğalmayı engelleyecek olan kontrol noktalarından kaçınması gerekirken, böyle koşullar anormal tümör mikro çevreleri olarak belirlenmiştir. Tümör hücreleri bu gereklilikleri sağlamak amacıyla kendi metabolik yollarını kullanırlar. En iyi karakterize olmuş metabolik fenotip Warburg etkisi olarak bilinmektedir. Bu yolak normal oksijen koşullarında bile, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP sentezinden kaçınmayı sağlar (49). Bunun bir sonucu olarak da, normal hücrelerin aksine, birçok hücre enerji gereksinimini aerobik glikolizden sağlamaya başlar. Glikozun laktik asite çevrilmesi, mitokondri aracılığıyla oksidatif fosforilasyondan kaçınmaları ile olur (50). ATP üretimi de bu sayede glikoliz ile oksidatif fosforilasyondan daha hızlı bir biçimde gerçekleşir. Warburg etkisi olarak bilinen bu tanımla da tümör hücreleri kendilerine gereken yüksek enerji, redox ve biyosentez ihtiyaçlarını karşılarlar (51).

Kanser hücrelerinin pek çok türünde, normal kanser olmayan türleri ile mukayese edildiğinde ROS seviyelerinde bir artış olduğu rapor edilmiştir. Redoks durumundaki bu değişiklikler Darwin etkisi gibi kanser ilerlemesini de hızlandırabilir. Bir sinyal dönüştürücü olarak ROS'u kullanan bu hücreler proliferatif, invaziv ve metastatik özellikler de kazanabilirler. Aynı şekilde ROS seviyesinin artması ile tümör ilişkisi de birçok çalışmada gösterilmektedir. Kanser kök hücreleri kemo- ve radyo-direnç göstermeleri açısından diğer kanser türlerinden ayrılırlar (52). ROS üretiminde azalmanın eşlik ettiği oksijen yetersizliği aslında “klasik” bir patofizyolojik radyo direnç faktörüdür.

Warburg önerisi günümüzde daha çok kanser ve oksijen seviyesi arasındaki ilişki ile bağdaştırılmaktadır. Oksijen seviyesinin kanser metabolizması üzerine yaptığı etki, metabolik yollar üzerine yapılan çalışmalarla aydınlatılmaktadır (53).

2.3.2. Kemik Kanseri

Kemik kanseri olarak da bilinen osteosarkoma, en yaygın kanser türüdür. Sağlıklı kemikte bulunan osteoblastlar gibi, bu osteosarkoma kanser hücreleri de ekstrasellüler matriks oluşturabilirler. Ancak kanser hücreleri tarafından oluşturulan bu matriks, sağlıklı kemiklerdeki kadar güçlü değildir. Genellikle osteosarkoma oluşumu çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülür. Ergenlik dönemi osteosarkomanın en çok görüldüğü zaman dilimi olmasına rağmen, her yaşta çıkma riski bulunmaktadır. Çocuklarda ve genç yetişkinlerde, osteosarkoma genellikle kemiğin hızlı büyüyen kısımlarında ortaya çıkar. Bu bölgeler genellikle uzun kemiklerin bitiş noktalarıdır. Çocuklukla tümörler diz çevresinde, distal femurda, proksimal tibia da görülür. En yaygın olanına proksimal humerusta rastlanır. Buna rağmen, osteosarkomanın kemiğin herhangi bir kısmında oluşma olasılığı vardır (54). Malign kemik kanserlerinin bazı türlerine örnek olarak; osteosarkoma, kondrosarkoma, Ewing sarkoma, spindle hücre sarkoma ve birçok nadir türü verilebilir. Ancak osteosarkoma, kondrosarkoma ve Ewing sarkoma tanımlanan kemik kanserlerinin %75'ini oluşturmaktadırlar. Burada önemli olan tümörlerin bu çeşitliliğinin köken aldıkları hücreden gelmesidir (55).

Kanser hastalarının 1/3'ü hastalıkları boyunca gelişmiş metastaz geçirmektedirler. Bununla beraber metastaz oranına bakıldığında kemik, akciğer ve karaciğer metastazından sonra üçüncü sırada gelmektedir. Kemik metastazı genellikle meme, prostat ve akciğer kanserinde ikincil kemik metastazı olarak tanımlanır. Meme kanseri sonucu yaşamını yitiren hastaların %80'inde kemik metastazı bulunmaktadır (56).

Osteosarkomanın tedavisinde tercih edilen yöntemler cerrahi işlem, kemoterapi ve radyoterapi olarak tanımlanmıştır. Kemoterapötik müdahalede osteosarkoma

hastalarına genelde neoadjuvan ve adjuvan tedavisi uygulanmaktadır (57). Bununla beraber osteosarkoma genellikle radyoterapiye dayanıklıdır. Sebepleri hala araştırılmakla beraber, kanser kök hücrelerinin neden olduğu bir kemo- ve radyo- direnç etkisinin varlığı da düşünülmektedir (58).

2.4. Hipoksi

Hücrelerin gelişim ve büyümesinde, moleküler oksijen önemli bir rol oynamaktadır. Memeliler fizyolojik çevresindeki oksijen homeostasisini arttırmak için moleküler oksijenin yakalama, bağlanma, taşıma ve iletilmesini içeren doku seviyesinde bir evrim göstermişlerdir. Hipoksi konusunda yapılan kritik çalışmalardan biri de düşük oksijen şartlarını algılamak ve cevap vermektir. Çünkü oksijen algılaması ile ilgili mekanizmalar ve oksijenin farklı model sistemlerindeki etkileri hızlıca gelişirken bu mekanizmalar hakkındaki algılar da önem kazanmaktadır (59).

Karbondiyoksit (küresel ısınmaya rağmen) havada %0,0314 oranında mevcuttur. Geleneksel olarak doku kültürlerinde karbon dioksit %5-7 oranında bulunur ve tampon çözelti olarak kullanılır, ayrıca “*in vivo*” seviyelerini yansıtır. Temiz (arteryel) kan 40mmHg veya %5,3 oranında CO₂ içerir. Oda koşullarında bulunan havanın %21’i oksijendir ve oda koşullarında bulunan hava içeren geleneksel inkübatörler %5’lik tampon CO₂ ile desteklenir. Böylece oda koşullarında oksijen yüzdesi %20’ye düşer. (%75 N₂). Buna rağmen doku seviyesine *in vivo* oksijen konsantrasyonları düşüktür. Temiz kanda bulunan oksijen oranı %12 ve bölgesel ve yerel varyasyonlarla birlikte ortalama doku oksijen seviyesi %3’tür. Bu ortalamalar yetişkin birey doku ve organları için belirlenmiştir. Embriyolardaki (kök hücrelerin yetişkin dokularına bağlı olarak zenginleştirildikleri ortam) ortalama oksijen gerilimi yetişkinlere kıyasla daha düşüktür. Birçok çalışma embriyolardaki düşük oksijen seviyesini hipoksik olarak gösterse de, düşük oksijen seviyeleri aslında yeri ve zamanına bağlı olarak normoksiktir (60).

Oksijen hücre fonksiyonu ve *in vivo* yara tamiri için güçlü bir düzenleyicidir. Oksijen eksikliği (hipoksi) potansiyel olarak ölümcül bir ortam yaratabilir ve hücresel solunumu ve büyümeyi sınırlayabilir. Buna alternatif olarak da belirli hücre dışı matriks

elemanlarının üretimini ve hipoksi-indüklenebilir faktör-1(HIF-1) yolağı aracılığıyla anjiyogenezi artırabilir (61). Hipoksi genellikle, oksijen seviyesi %5' in altına düştüğü zaman kompleks hücresel sistem ve sistemik adaptasyon aracılığı ile hipoksi indüklenebilir faktörlerin transkripsiyonuna (HIF) neden olur. İlk olarak HIF-1 α tanımlanmıştır ve az oksijen seviyesinde eritropotein ekspresyonun regülatörü olarak görev alır. HIF-2 α ve HIF-3 α da daha sonradan tanımlanmış ve yüzden fazla HIF hedef geni belirlenmiştir (62).

HIF genleri α ve β alt heterodimerlerinden oluşmuştur. Memeliler HIF α 'nın üç farklı izoformunu içerirler. Bunlardan HIF1 α ve HIF2 α (EPAS1 olarak da bilinir) en belirgin olarak karakterize edilmiş olanlarıdır. HIF3 α (IPAS) ise çeşitli bağlantılarda bulunmakla beraber bazı durumlarda HIF1 α and HIF2 α aktivitesini inhibe edebilir. HIF1 α nerdeyse tüm hücre tiplerinde sentezlenirken, HIF2 α ve HIF3 α ise belirli dokularda eksprese edilmektedir (63). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin fazladan yaşadığı kayıp HIF-1 α stabilizasyonu ile durdurulur. ROS mitokondriyel kompleks I, II, III' den oluşmasına rağmen RNAi ve inhibitör çalışmalarına göre yalnızca tip III hipoksi sinyalizasyonu için uygundur. HIF-1 α yalnızca prolil-hidroksilaz enzimleri tarafından hidroksillenmediğinde stabilize edilir. Ama ROS yapılarının enzimleri nasıl engellediğine dair belirsizlikler bulunmaktadır. PHD enzimler bu hareket için oksijene gereksinim duyarlar. Bir dönem oksijen, ana hipoksi algılayıcısı olarak kabul edilmiştir ancak çok düşük oksijen seviyelerinde dahi hidroksilasyon gerçekleştirilmiştir. Aksine ROS yöntemi, hücrelere şartlar çok kötüleşmeden önce yeni oksijen sağlayan damarlar inşa etme şansı tanır (64).

Hipoksinin ve HIF genlerinin rollerinin daha iyi anlaşılması ortak sorunları önlemek ve mühendislik ürünü dokularda hipoksinin potansiyel yararlarından faydalanmak amacıyla yardımcı olacaktır.

2.4.1. Hipoksi ve Kanser İlişkisi

Klinik araştırmalara göre son 20 yılda hipoksik doku alanlarının (O_2 gerilimi olan bölgeler < 2.5 mmHg) tekrarlanma sıklığı lokal ileri evre solid pato-fizyom

tümörünün ilgili faktörünün patofizyolojik özelliklerine dayanmaktadır. Meme kanseri, uterin serviks, vulva, baş & boyun, prostat, rektum, pankreas, akciğer, beyin tümörü, yumuşak doku sarkoması, non-Hodgkin lenfoma, malignant melanoma, metastatik karaciğer tümörü ve renal hücre kanseri gibi kötü huylu tümörlerde buna benzer durumlar sıklıkla görülmüştür. Yapılan çalışmalar %50-60 oranında bölgesel olarak ilerleme kaydetmiş tümörler, tümör kütlelerinin içinde heterojen olarak dağılmış hipoksik ve/veya anoksik davranış sergilediklerini göstermektedir (2). Solid tümörler çok düşük oksijen konsantrasyonlarında (hipoksi) bazı bölgeler içerirler ve bu bölgeler sıklıkla nekroz bölgelerini çevreler. Bu hipoksik bölgelerdeki hücreler radyoterapi ve kemoterapiye dirençlidirler. Buna rağmen hipoksi ve nekrozun varlığı hipoksi, hipoksi-spesifik gen terapisi, uyarılabilir hedeflenmiş hipoksi faktör 1 transkripsiyon faktörü ve rekombinant anaerobik bakteri içeren seçilmiş tümör tedavisine olanak sağlar. Bu stratejiler günümüzde kanser tedavisine engel olan koşulları ortadan kaldırmak için önemli bir avantaj yaratmaktadır (65).

Hipoksi, kanser hastaları üzerinde yapılan çalışmalarla beraber çoğu tümörün ortak özelliği olarak tanımlanabilir. Gen instabilizasyonu, bozulmuş metabolizma, hücre ölümüne olan direnç, metastazis, yayılabilirlik, damarlanma, anjiyogenezis, radyo rezistans, kemo rezistans gibi özelliklere sahip olması sebebiyle olumsuz bir işaret olarak görülen bir faktördür. Tümör ilerleyişi ve terapiye karşı olan direnciyle bilinen hipoksi, buna rağmen onkoloji içerisinde derinlemesine araştırılmış en önemli konulardan biridir. Bu konuda oldukça fazla bilgi ve araştırma olmasına rağmen sömürücü düzeyde çalışan tümör hipoksisinin uzun süreli olarak direnmesiyle ilgili iki ana yaklaşım incelenmektedir: Bunlar biyoredüktif ön ilaçlar ve hipoksi hücre kurtuluşuna dayanan moleküler hedefli inhibitörlerdir. Bu çakışan mevcut stratejilere göre belli başlı görev ve fırsatlar sağlanmakta ve hipoksi hedefli olan ve hasta tabakaları için yeni geliştirilen teşhis araçları hakkında tartışmalar sürdürülmektedir (66).

Hipoksinin kanser hücrelerinin üzerinde birçok farklı etkisi olmasına rağmen en önemli özelliği, kanserin ilerlemesine olan etkisidir (67). Örneğin; hipoksi tümör hücrelerinin metabolizmasında değişiklik yaparken kanser hücrelerinin dayanıklılığını,

invazyonunu ve metastazını arttırabilir. Diğer etkiler ise hipoksi tarafından desteklenen epitelial-mezenşimal değişim (EMT) adı verilen fenotip değişikliklerine bağlıdır (68). Ayrıca, oksijen homeostazisini destekleyen moleküler yolların anlaşılması ile kanserin patolojisi ve tümör oluşumu aydınlatılabilir. Solid tümör büyümesi, oksijen ve besin ihtiyacını sağlayan limitli damar oluşumuna bağlıdır. Tümör hipoksisi genellikle kan damarlarında 100–200 µm uzaklıktadır ve bu bölgedeki oksijen ve besin eksikliğine adapte olamayan hücreler genellikle apoptoza uğrarlar veya nekroza giderler. Ancak buna rağmen, hipoksi bu hücrelere lokal adaptasyon alanı sağlayarak kemoresistansı olan tümör fenotipi oluşturarak tümör büyümesini destekler (69).

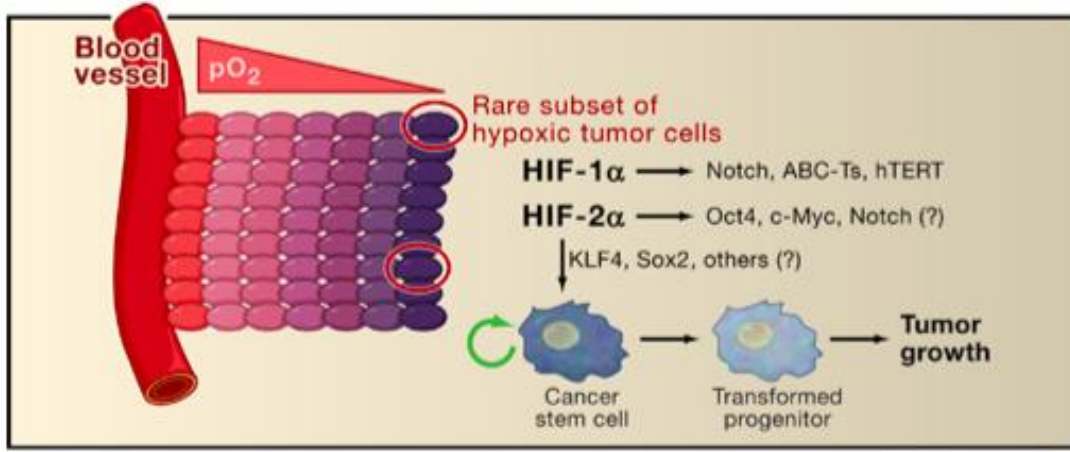
HIF-1; hücre kültürü ve hayvan modelleri ile yapılan mekanik çalışmalar ile belirlenen protein gen çözümlemesi yapılmış ve birçok proste önemli rol oynayan bir genidir. Artan miktarda hasta ölümü ile sonuçlanan yaygın kanserler HIF-1'in diğer genlere nazaran daha fazla bahsedilmesine sebebiyet vermiştir. Benzer çalışmalar HIF-1 ve HIF-1 tabanlı gen ürünleri konusunda tedavi hedefi olacak düzeyde yapılan çalışmaları arttırmıştır (69). Hipoksi indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) kanser biyolojisinde, anjiyogeneze, hücre dayanıklılığında, glikoz metabolizması ve invazyonda yer alan genlerin transkripsiyonunu aktive eder. İntratümöral hipoksi ve genetik değişimleri HIF-1 α overekspresyonuna yani birçok kanser türünde hasta ölümlerine neden olan bir durumu tetikler. Ön klinik çalışmalarda, HIF-1 aktivitesinin inhibisyonu tümör oluşumunda değişikliklere neden olmuştur. Bu çalışmalar HIF-1 geninin inhibitörleri üzerine yoğunlaşmakla beraber, bu genin inhibitörlerini anti-kanser terapötik ajanlar olarak kullanmayı hedeflemektedir (67).

2.4.2. Hipoksi ve Kanser Kök Hücre İlişkisi

Bugüne kadar gerçekleştirilmiş birçok çalışma solid tümörlerin içerisinde kanser kök hücrelerinin varlığını göstermiştir. Bu hücrelerin varlığı kesin olarak teşhis edilmemiş olsa da geçmişten gelen çalışmalar KKH'lerin fazla miktarda plastik ve EMT ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Hastalarda EMT ve kanser kök hücrelerinin varlığı radyoterapiye olan direncin artışı ile doğru orantılı olarak gözlemlenmiştir. Tedavi süreci için olumsuz bir işaret olan hipoksi EMT'yi ve tümör mikro çevrelerinde

hücrelerin moleküler düzeyde kurtulma ve zenginleşmesini sağlayan güçlü bir tetikleyicidir. Hipoksi aynı zamanda işaretli tümör hücrelerinin kök hücre benzeri bakımı için EMT ve kanser kök hücresi arasındaki bağlantıyı sağlayabilir. Kanser kök hücrelerinin biyolojisini anlamak, EMT fenotip ve onun implikasyonları içerisinde ileri düzeydeki terapi stratejilerinin gelişimi için yepyeni yaklaşımlar sağlayabilir (1).

Yerel oksijen konsantrasyonları, kök hücrenin kendini yenilemesi ve farklılaştırmasını direk olarak etkileyebilir (70). Kanser kök hücrelerine de çoğalmaları için ortam sunan hipoksi, bu hücrelerin kolon oluşturma kapasitesini artırır. Hipoksik fenotip geri döndürülebilir bir işlemdir çünkü hücreler normoksi içerisinde yeniden yetiştiğinde hipoksi-yoğunluğu ile oluşmuş koloniler farklı yapılar ortaya çıkarabilme yetisine sahiptir (71).



Şekil 2.4: HIF aktivitesinin kanser kök hücrelere etkisi (70)

Hipoksinin kanser kök hücrelerindeki etkileri aslen birincil olarak yönlendirilmiş HIF' ler, kısmi olarak da HIF2 α tarafından sağlanır. HIF2 α gliomalar ve nöroblastomalar içerisindeki kanser kök hücrelerinde sıklıkla bahsedilir ve HIF2 α 'nın yokluğu kanser kök hücrelerindeki çoğalma ve kendini yenileme işlemlerinde önemli bir azalma sağlar. Bu buluşlar yardımıyla söylenebilir, oksijen gerilimi ve mikro çevrenin kanser gelişimini

önemli ölçüde etkilediği söylenebilir. Hipoksik nişlere hedeflenmiş bir sağıltım yöntemi, kanser kök hücresi popülasyonunu azaltıp tedavinin verimini arttırabilir (72).

HIF-2 α yardımıyla c-Myc aktivitesi, çoğalma ve kendini yenileme gen ifade programının aktivasyonu için Oct-4 ile birlikte hareket etmeyi destekler (73). Günümüzde, mümkün olmasına rağmen literatürde KLF4 veya SOX2'nin direkt veya indirekt olarak HIF'i hedefleyen ve kullanılmasını tavsiye eden herhangi bir yayın bulunmamaktadır. c-Myc transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki HIF- 1 α ve HIF-2 α 'nın karşıt etkileri, hipoksik c-Myc regülasyonu belirli kanser hücrelerinde HIF- 1 α ve HIF-2 α ile ilgili bağıntılı bir ekspresyona dayandırılabilir (74).

Kök hücrelerin ve multipotent progenitörlerinin bölünme, farklılaşma ve işlevselleşmesi mikro çevrede bulunan kompleks işaretler ve oksijen varlığının yardımıyla sağlanır. Genetik *knock-in* stratejisi kullanılarak yapılan bir çalışmada transkripsiyon faktörü HIF-1 α ve HIF-2 α genleri kullanılmış ve kök hücreler için HIF2alfa spesifik genleri aracılığı ile OCT-4 artışı görülmüştür. Yalnızca HIF-2 α (HIF-1 α olmamak kaydıyla) Oct-4 destekleyicisi olarak görev yapar ve Oct-4 ve transkripsiyonel aktivitesini indükler. HIF-2 α yardımıyla Oct-4 transkripsiyonu değişmeyen ve malignan haldeki hipoksik tümör hücre sayısını artırır. Örneğin, Oct-4 lokusu aynılaşmaya yüz tutmuş dönüşüm hücrelerine veya kanser kök hücrelerine yeniden adaptasyon şansı tanıyabilir ve bu sayede HIF-2 α tarafından oluşturulan kolay etkilenir bir yapı yaratır. Oct-4'ün hipoksi indüksiyonu farklılaşmamış hücre popülasyonunun genişlemesine, mezodermal kimliğinin tanınırlığını arttırmasına neden olurken son fazdaki farklılaşmış hücrelerin aynılaşmasını da tetikleyebilir (75).

Kanser kök hücrelerini yok etmek kanser tedavisinde tanınırlığı artan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. HIF yolları ise daha da önemli noktada; terapötik tedavi yöntemleri olarak dikkat çekmektedir (76). HIF aktivitesinin azaltılması ile kanser kök hücreleri farklılaşmaya başlayabilir bununla bağıntılı olarak kemo- ve radyo terapi ile yeniden tümörlerin çoğalma yetilerinin engellenmesi gereklidir. Kesin olarak tanımlanmış tümörlerdeki HIF-1 α HIF-2 α Notch, Oct4, c-Myc ve diğer bu işlevli

bileşenlerin fonksiyonlarının engellenmesi gereklidir (70). Kansere kök hücrelerinin varlığı, birçok kanser türü için tanımlanmış normal kök hücrelerinin redoks paternini sergilemektedir. Terapiler, kanser kök hücrelerine özelleşmiş tedavileri hedef alırken onları normal kök hücrelerden ayırmak için redoks kuralları ve ROS'a verilen cevapları göz önünde bulundurmak önem taşımaktadır (77).

2.4.3. Hipoksi ve Kemik Kansere Kök Hücreleri

Gen ifadelerinin baskılanması, Western blot, lüsisferaz analizi ve ELISA ile osteosarkoma modelleri yardımıyla hipoksinin hem HIF-1 α hem de HIF-2 α ifade ve fonksiyonlarını desteklediği görülmüştür. İndüklenmiş hipoksi apoptozisi HIF-1 α tarafından yönlendirilir. Araştırmalar, hipoksi bağımlı genler HIF-1 α ve osteosarkoma tümörü arasında *in vivo* bir ilişkinin olduğunu ve bu genlerin genelde nekroz bölgelerinde bulunduğunu göstermiştir (78).

İlginç bir şekilde, bazı durumlarda hipoksik koşullar altında, Glut-1 ve HRE bölgesine bağlanmış VEGF'lerin ekspresyonu HIF'ler tarafından azaltılmaktadır. Öte yandan %45'in altındaki çoğalma seviyesinde, HIF transkripsiyonal cevabı alınmadığı belirlenmiştir. Bu moleküler mekanizmaların ilişkileri hala araştırma konuları arasındadır (79).

Araştırmalar göstermektedir ki, analizlenmiş osteosarkoma kanser hücrelerinin içinde %69,64 oranında HIF-1 α 'nın over ekspresyonu, tümör ilerleyiş hızı (tümör boyutu, lenf nod metastazı, histolojik farklılaşması, klinik seviyesi ve dizilmiş hücreli damarların varlığı) ve daha düşük seviyede kurtulma olanağı arasında pozitif bir bağıntı vardır (80). HIF-1 α ve tümör boyutu, nüksetmeler ve mesafeli metastazlar arasında da pozitif bir korelasyon söz konusudur (81).

Hipoksi sinyal yolları kök hücre devamlılığı için bir çok önemli yolağı aktive eder ve ilginç bir şekilde hipoksi beyindeki kanser kök hücre sayısını arttırmaktadır (4). Bununla beraber hipoksi, osteosarkoma kanser kök hücrelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (82).

Bir çok hücre tipi üzerinde yapılan çalışmalar HIF-1 α 'ı temel olarak hipoksi düzeninde ve HIF-2 α 'yı ise daha çok hücreye göre özel olarak tanımlamaktadır. Bu transkripsiyonel aktivasyon ise hipoksiden farklı olarak mikro çevre şartlarından da etkilenir. Tüm izoformlar benzer bir çekirdek bağlantı motif yapıya sahip olmasına rağmen HIF-1 α 'nın tek başına ya da HIF1 α ve HIF2 α 'nın bir kombinasyonu olarak oluşmuş HIF düzenindeki indüklenmiş hipoksi genleri çoğunluktadır (83). %2-5 oksijen seviyesinde çalışan kanser kök hücresi popülasyonunda en çok HIF-2 α bulunmuştur. HIF-2 α genellikle geniş aralıklı oksijen seviyelerinde gösterilir. Bu da aktif hale gelmiş *in vivo* ve *in vitro* düzeyindeki hipoksi stimülasyonu olmasa bile kanser kök hücrelerinin gelişimine HIF-2 α tarafından katkı sağlanabildiğini destekler niteliktedir. (84)

CD133, kanser ve normal kök hücreler için bir yüzey belirteçidir. Hücre kültürü ve kantitatif PCR teknikleriyle, CD133 ekspresyonu osteosarkoma ve SaOs-2 hücrelerinde analiz edilmiştir (85). HIF2 α ise, CD133 pozitif hücrelerin alt popülasyonlarını tanımlayabilir. HIF2 α proteinini içeren hücrelerin büyük çoğunluğu CD133 eksprese edebilirken, HIF2 α ve CD133 aktiviteleri her zaman tamamen uyuşmaz. Yani HIF2 α pozitif hücrelerin hepsi CD133 pozitif değilken, CD133 pozitif hücrelerin hepsi de HIF2 α pozitif değildir. Bu yüzden kanser kök hücrelerinde yani CD133 pozitif olan osteosarkoma kanser kök hücrelerinde HIF2 α 'yı hedeflemek, tüm CD133 hücrelerin hedefleneceği anlamına gelmemektedir (84).

2.5. Doku İskeleleri ve Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği *de novo* ile doku ve organ yaratma potansiyeli olan bir tekniktir. İçeriğinde *in vitro* hücre ekimi ve hücrelerinin birbirine bir doku iskelesi üzerinde etkileşimi mevcuttur. Bu hücreler daha sonra çok hücreli matriks bileşenli bir doku yaratma gerekliliği ile çoğalır, göç eder veya farklılaşır (86). Doku mühendisliğinin yapı taşlarından biri de fonksiyonel hücrelerin doku oluşturmalarını sağlayan 3 boyutlu (3B) doku iskelesidir. Son zamanlarda serbest şekil üretim olarak bilinen şekilsiz üretim tekniklikleri veya hızlı prototipleme, kompleks doku iskelesi

oluşturmak için başarılı biçimlerde kullanılmıştır. Benzer olarak doku fabrikasyonu esnasında hücrelerin eş zamanlı olarak eklenmesi, özgün robotik birleşme ve otomatik 3B hücre enkapsülasyon teknikleri geliştirilmektedir. Tüm bu teknolojilerin sonucu olarak doku mühendisliği ile üretilmiş yapılar belirli uzaysal bir hücre dağılımı ve gelişimi içerirler (87).

Yeni jenerasyon sentetik biyomateriyaller 3 boyutlu mikro çevrelerin doğal ekstraselüler matrikslerin karakteristik dizilişlerini taklit etmek ve ekstraselüler bağlantılı gelişim faktörlerini, hem terapötik uygulamalar hem de biyolojik çalışmalarda kullanmak üzere geliştirilmektedir (88).

Doku mühendisliği uygulamaları için geliştirilen biyomateriyaller son zamanlarda spesifik hücre cevaplarını seçme yetisine sahip biyomimetik materyaller ve materyalin tasarım parametrelerini değiştirerek manipüle edebilen yeni doku formasyonları üzerine yoğunlaşmıştır. Hücreler tarafından, materyallerin biyomoleküler tanınması; biyomateriyallerin, biyoaktif moleküllerin fiziksel veya kimyasal yöntemlerle değiştirilmesi, yüzey veya şişme modifikasyonları ile elde edilir. Bu biyoaktif moleküller genellikle uzun zincirli ekstraselüler matrikslerden oluşan proteinler, ayrıca ECM proteinleri tarafından oluşturulan ve hücre reseptörleri ile iletişime geçebilen kısa peptit dizileridir. Biyomimerik malzemeler genellikle dokulardaki ekstraselüler matriks (ECM)'leri taklit etmektedirler (89).

2.5.1. Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Doku ve organlar 3 boyutludur. Buna rağmen onların diziliş, fonksiyon ve patolojilerini anlamak için her zaman 2 boyutlu hücre yapısı üzerinde veya hayvan model sistemleri ile çalışılmıştır. Standart hücre kültürü üzerine olan çalışmalar bir çok önemli kavramsal avantajlar ortaya çıkarmıştır. Bütün bunlara rağmen, 2 boyutlu doku kültürü substratları üzerinde yetişen hücrelerde gözle görülür morfolojik değişiklikler sergilenebilir; hücre-hücre, hücre-matris ilişkileri ve 3 boyutlu fizyolojik çevrelerde gelişim gösteren yapılardan farklılıklar gösterilebilir (90, 91).

Mikro çevre koşulları; tümörigenez ve *in vitro*, *in vivo* tümör modelleri ile kanser hücrelerini bu koşullara dayandıran çalışmalara izin veren biyomimetik kültür sistemlerini hedefler. Tümörün *in vivo* mikro çevre karakteristiğini yeniden yaratan polimerik doku iskelesi içinde karsinoma hücreleri kullanılarak 3 boyutlu insan tümör modelleri üretilmiştir (92). 3 boyutlu kültürler, kanser hücre sinyallerini başkalaştırır. Buna rağmen tümör vaskülarizasyonu üzerine yapılan değişikliklerin önemi ve bunun altında yatan mekanizmalar belirsiz kalmaktadır (93).

Kök hücreler kullanılarak inşa edilen 3 boyutlu fonksiyonel dokuların yaratılması, kök hücrelerin doğuştan gelen farklılaşma, çoğalma yeteneğine dayanan 3 boyutlu doku iskeleleri çevresel belirtilere cevap verir. Bu sebeple bu prosesler yoğunlukla *in vitro* kültür şartları ve kök hücre devamlılığı veya farklılaşması için doku iskelesi özelliklerinden etkilenir. Lokalize fizyolojik mikro çevre arz ve talebin karşılıklı etkisiyle karara bağlanır. 2 boyutlu kültürler nazaran 3 boyutlu yapıların hücrelerine sağlanan oksijen daha karmaşıktır. Çünkü oksijen iletimi, doku iskelesini oluşturan materyallerden ve ekstraselüler hücrelerden ve aynı zamanda difüzyon, konveksiyon gibi taşınma mekanizmalarından etkilenir (92).

2.5.1. Bakteriyel Selüloz Doku İskelesi

Selüloz, hidrofilitesi, kiralitesi, biyo-bozunabilirliği, geniş kimyasal düzenlenebilirlik kapasitesi ve farklı yarı-kristalize fiber morfolojisi olan neredeyse tükenmez, sürdürülebilir doğal polimerik bir hammaddedir. Bakteriyel selüloz veya güçlü entegre olmayan ahşap selüloz gibi selülozik maddeler nano boyutlu fiberlerden oluşuyor ve nanofiber yapılar bu ürünün özelliklerini belirliyor ise bu yapılara da “nanoselüloz” adı verilir (94).

Gluconacetobacter xylinus (= *Acetobacter xylinum*) şeklinde oluşmuş olan bakteriyel selüloz (BC) alışlagelmişin dışında malzeme özellikleri ve bozunabilirliği sayesinde özgün bir doku iskelesi malzemesi olarak keşfedilmiştir (95). Bakteriyel selüloz *Acetobacter xylinum-bacteria* tarafından kümelenmemiş uzun nanofibrillere sahip hücre dışı salgılanmış bir polisakarit yapıdır. Bakteriyel selüloz yüksek mekanik

dayanıklılık, yüksek su içeriği, yüksek kristallik ve çok iyi derecede saf nanofibril ağ yapısı gibi önemli özellikler sergilemektedir. *Acetobacter xylinum* bakteriyel selülozun dışında bulunan ve yoğun yüzey alanı ve diğer tarafında jelatin tabakası olan bir pelikül inşa eder. Bu bakteriyel selüloz mikro damar endoprotezi veya geçici deri modeli olarak kullanılmaktadır. Bu malzeme aynı zamanda kıkırdak üzerine yapılan doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak incelenmesine rağmen bakteriyel selüloz doku mühendisliğinde geniş alanda yer almamaktadır (96).

Bakteriyel selülozla ilgili geçmişte ortaya çıkan bir endişe de birbirine geçmiş yapısının yoğunluğu sebebiyle hücrelerin malzemenin içerisine girişinde yaşaması muhtemel zorlanma olarak öne çıkmıştır. Biyomedikal uygulamalar sebebiyle hücre gelişimi için doku iskelesi oluşturmak bakteriyel selüloz araştırmalarında önemli bir rol oynadığından (örnek: kemik grefti, deri grefti, yapay kıkırdak vb.) , bakteriyel selülozun artan porozitesi yoğun bir araştırma alanı haline gelmiştir. Hücrelerin tamamen entegrasyonunu gerektiren her uygulama bakteriyel selülozun yapı matriksinden geçmekte ve hücrel bir geçirgenlik gerektirmektedir (97). Ancak buna rağmen, bakteriyel selüloz doku mühendisliğinde istenilen özellikleri kazandırılabilen, çok yönlü bir biyomateriyaldir. Bu özellikler kültür şartlarının değiştirilmesi ve farklı birleşenlerin eklenmesi ile gerçekleştirilebilir. Kontrollü poroziteye sahip 3 boyutlu bakteriyel selüloz doku iskelesi ağı fermentasyon ve sonrası teknikler ile hazırlanabilir. Gözenekli bakteriyel selüloz, farklı doku ve organları oluşturması amaçlanan hücrelerle potansiyel doku iskelesi malzemesi olarak kullanılmaya uygun hale getirilebilir (98).

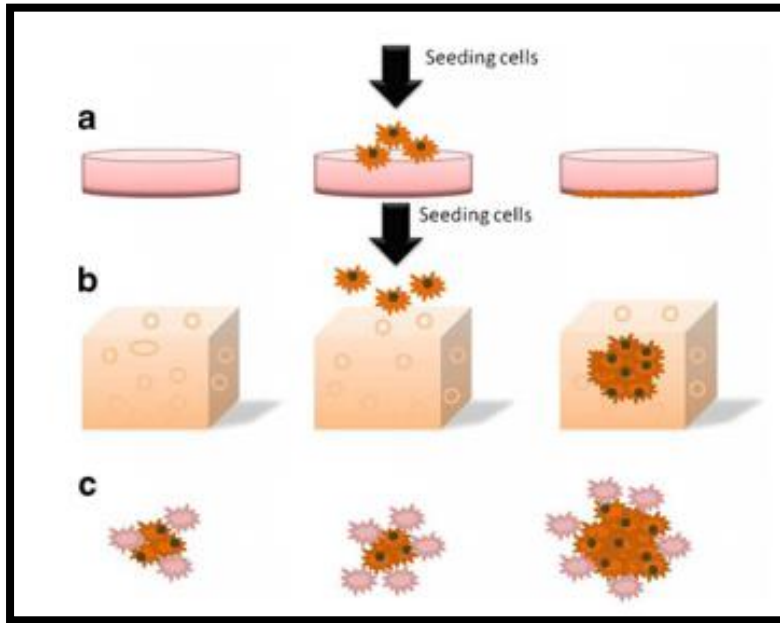
Uygun hücre-doku iskelesi ilişkilerini gösteren geçmiş çalışmalar, gözenekli bir ağ potansiyeli ile bakteriyel selülozu *in vitro* kanser modeli için cazip bir doku iskelesi olarak uygun kılmaktadır (99).

2.6. Üç Boyutlu Kanser Tümör Modellerinin Önemi

Doku ve organlar 3 boyutlu (3B) yapıdadırlar. Ancak genellikle kanser üzerine yapılan çalışmalar onların morfolojilerini ve biyolojilerini araştırmak üzerine 2 boyutlu (2B) olarak çalışılmaktadırlar (100). *In vivo koşulları taklit edebilen in vitro koşullar*

ise biyomedikal uygulamaları için hayvan deneylerini ve tartışmaları engelleyebilmek açısından büyük avantajlara sahiptirler. 3B *in vitro* kültürler fizyolojik mikro çevreyi oluşturmaları açısından ve *in vivo* tepkileri uyumlu bir şekilde sergileyebilmeleri açısından kabul görmektedirler (101). Kanser araştırmalarında, 3 boyutlu, çok hücreli tümör küreleri en çok çalışılan kanser modelleri olarak yer almakla beraber, *in vivo* tümörlerle aynı heterojen mikro çevreyi sergilemektedirler (102). Bu 3B *in vitro* modeller, *in vivo* kompleks uygulamalara alternatif olarak görülmekle beraber, 2B kültürlerin uygulamalarda sınırları vardır. 3B biyomimetik kanser model uygulamaları sadece bunlarla sınırlı olmamak üzere bazı avantajlara sahiptir (103):

- (i) Uygun matriks bileşenlerini, 3B olarak *in vivo* ortamdaki ile benzer sunar;
- (ii) Kanser, endotelyal ve diğer benzer hücrelerini uzaysal olarak uygun ko-kültüre olarak sağlar;
- (iii) Doğal tümörlerde bulunan hipoksik ortamın kontrolünü ve gözlenmesini sağlar;
- (iv) Hipoksiye karşı salgılanan anjiyogenik faktörlerin gözlemine sağlar.



Şekil 2.5: Tümör büyümesi (a) 2B kültür (b) 3B kültür (c) *in vivo*

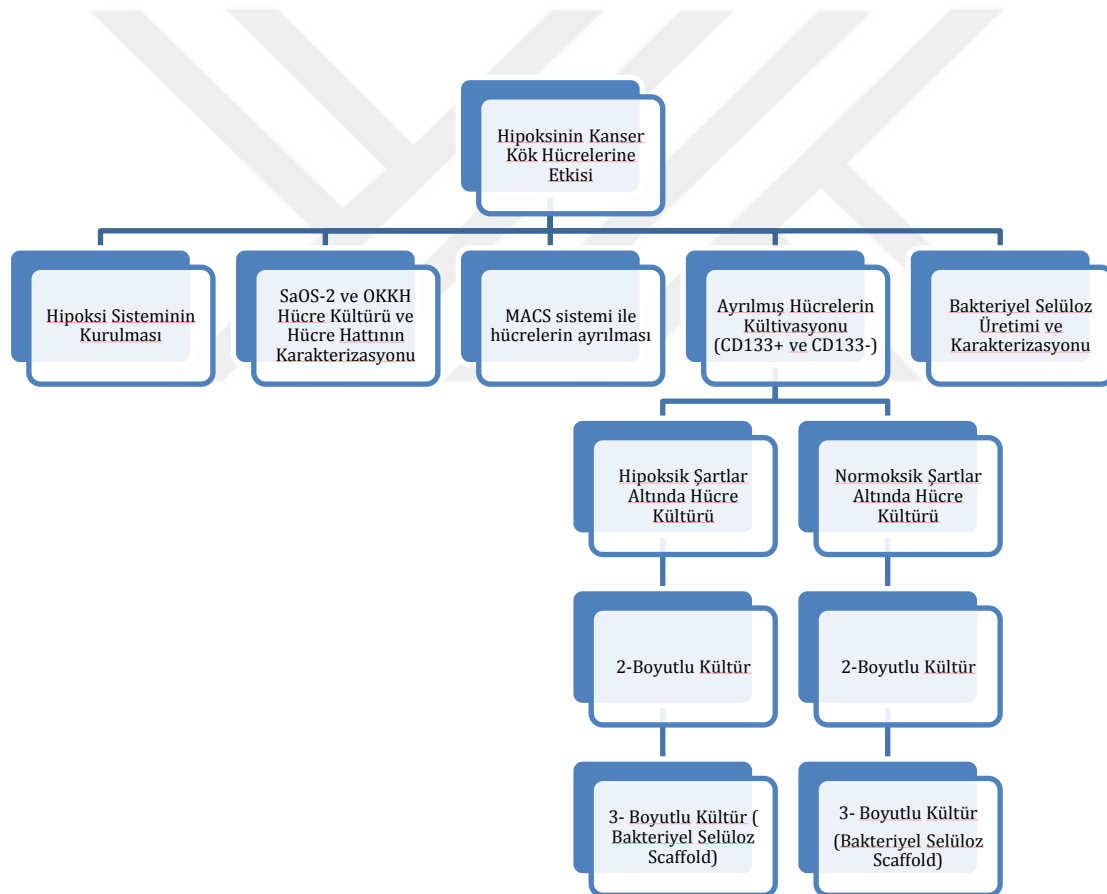
Doğal 3B çevrenin sağladığı kompleks uyarıyı 2B hücre sistemleri ile anlamaya çalışmak uygun değildir. Geleneksel 2B kültür sistemlerinde, yapışık hücreler genellikle birbirlerinin üzerinde adsorbe hücre bağlantı motiflerini tanımayı sağlayan yüzey reseptörlerini ifade ederler. Alışlagelmiş 3B çevrelerde ise, genellikle düzlemsel bir yüzeyin üstünde olmayan ve her bir doku çevresinin; fiziksel, mekanik, biyokimyasal karakteristiğini ayrı ilişkilendirir ve hücre dışı matriks üzerinden düzenlenir (104).

3 boyutlu *in vitro* ortak kültür sistemi kanser araştırmasına sağladığı birçok avantaj sayesinde icat edilmiştir. Sofistike 3 boyutlu kültür sistemleri kullanılarak üretilen modeller, tümör hücrelerinin mesafeli invaziv davranışını yansıtan, göğüs ve prostat karsinomalarının epitel hücre-stromal hücre ilişkilerini taklit eden ve iyi tanımlanmış 3B bir çevrede tümör ve stromal hücrelerin arasındaki bilinmeyen çoklu düzenli geri besleme mekanizmalarının sistematik araştırmasına izin vermektedir (105).

3B kültürler basit kanser araştırmaları için vazgeçilmez uygulamalardır. Bu uygulamaların bir sonraki adımı ise bu kültürleri büyük ilaç denemeleri için kullanmak ve akademi ile farmakoloji endüstrisi arasında bağlantı kurmaktır. 3B kültürler hayvan deneylerine alternatif bir çözüm olabileceği gibi, ekonomik açıdan da avantajlı oldukları için ilaç denemelerinde kanser modelleri olarak kullanılabilir (106). Buna ek olarak, 3B *in vitro* kültür modelleri, intratümör ilaç iletimi için olanak sağlamaktadır. Tümör silindroitleri kullanılarak hücresel kümeler arasında ekstraselüler difüzyon ve nano partiküllerden molekül salımı sistematik olarak incelenebilir (107).

3. GEREÇ- YÖNTEM

Tez çalışmasının hücre j~k~q̃ Ȧ~k~q̃ Ȧ~k~q̃ s̃l̃l̃ Â Dfd Ğndq̃hsdrh+
L~gdn~hrkij E'j~ksdrh+ Ahnl~gdn~hrkij AÖ~l̃~+ G`xu`m G~bqđ J~k~q̃ ud Cnj t
L~gdn~hrkij Grubu Laboratuvarı'nda, bakteriyel selüloz doku iskelesinin hazırlaması
kısımı ise Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji
Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: Çalışma planı

3.1. Hipoksi Sistemin Kurulması

Hipoksi sistemi üç adet ana bileşenden oluşmaktadır. Hipoksi cihazı (27310, Stem Cell Tech., ABD) satın alınmış ve gaz akışının kontrolünün sağlanması amacıyla akış ölçer (27311, Stem Cell Tech., ABD) ile beraber kullanılmıştır. Hipoksi cihazı kapalı bir sistem olmakla beraber, belirli bir basınç kapasitesi vardır. Cihazın maximum basınç kapasitesi 2 psi civarındadır.

Deneyde kullanılacak olan gaz tüpleri hipoksi cihazının üreticisinin talimatlarına göre belirli karışımlarda hazırlanmış ve sipariş verilmiştir. Karışımlar %1, %3, %5 O₂ seviyelerine göre hazırlanırken, CO₂ ve N₂ oranları hesaplanmıştır. Ancak oksijen tüplerinden de gelen akışın, gaz basıncının akış ölçer kapasitesinde olabilmesi ve 2 psi basınç sınırı geçmemesi için regülatör dizayn edilmiş ve 1-10 psi basınç aralığında gaz akışını kontrol eden regülatör alınmıştır.

Üreticinin talimatlarına göre hazırlanan gaz tüpü karışımları şu şekildedir:

- 1- %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂
- 2- %5 CO₂, %3 O₂, %92 N₂
- 3- %5 CO₂, %1 O₂, %94 N₂
- 4- %21 O₂ seviyesi için %5 CO₂ içeren inkübatör (Heraeus- Hera-Cell, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 3.2: Hipoksi cihazı, akış ölçer ve gaz tüpü

3.2. SaOS-2 ve OKKH Hücre Kültürü ve Hücre Hattının Karakterizasyonu

3.2.1 SaOS-2 Hücre Hattının Kültürü

3.2.1.1. SaOS-2 Hücre Hattının Stoklanması

Çalışma öncesi gereken hücre miktarı hesaplanarak, çalışmanın aynı hücre pasaj numarasında gerçekleştirilebilmesi için hücreler stoklanmıştır. Hücrelerin stoklanması için gerçekleştirilen protokol şu şekildedir:

- 1- İlk olarak, hücrelerin stoklanması için gerekli hücre miktarı hesaplanarak, çalışmanın aynı hücre pasaj numarasında gerçekleştirilebilmesi için hücreler stoklanmıştır. Hücrelerin stoklanması için gerçekleştirilen protokol şu şekildedir:

(DMEM) HG (41966-029, Gibco, ABD) bir gece 37°C' de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde bekletildi.

- 2- Hücre kültür kabını dolduran, hücrenin kendisine ait orijinal besi ortamı 50 ml'lik steril santrifüj tüpüne alındı ve hücre stoklanmasında kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.
- 3- Hücre kültürünün besi ortamı 2-3 günde bir hücrelerin canlılığının devamını sağlamak amacı ile orijinal besi ortamı ile değiştirildi.
- 4- Kültür kabı yüzeyi %80-90 doluluğa ulaştığında ise hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
- 5- Hücrelerin yüzeyi serum etkisini azaltmak amacı ile daha önceden 37°C'de önceden ısıtılan Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandı.
- 6- Hücrelerin yüzeyden kalması için hücrelerin üzerine tripsin (% 0,25)-EDTA (2,5 g/L tripsin, 0,5 mM EDTA) solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 5-8 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
- 7- Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler santrifüj tüpüne toplandı.
- 8- Hücreler 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
- 9- Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
- 10- Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
- 11- Hücre süspansiyonu 1:2 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.
- 12- Hücre kültürünün besi ortamı 2 günde bir taze besi ortamı ile değiştirildi.
- 13- Hücreler yeterli sayıya ulaşıncı -196°C sıvı azot tankında stoklandı.

3.2.1.2. SaOS-2 hücrelerinin dondurulması

SaOS-2 hücrelerinin stoklanabilmesi amacıyla uygulanan hücre dondurma protokolü aşağıda belirtilmiştir.

- 1- Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
- 2- Hücrelerin yüzeyi 37°C'de önceden ısıtılan Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandı.

- 3- Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,25)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
- 4- Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplandı.
- 5- Hücreler 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
- 6- Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
- 7- Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
- 8- Hücreler buz üzerinde dondurma ortamı (%90 FBS + %10 DMSO ile homojenize edildikten sonra, 1:3 oranında kriyotüplere aktarıldı.
- 9- Kriyotüpler -86°C'de köpük kutu içerisine kaldırıldı.
- 10- -86°C derin dondurucuda bir gece bekletilen kriyotüpler, - 196°C'deki sıvı azot içeren tanka kaldırıldı.

3.2.1.3. SaOS-2 hücrelerinin pasajlanması

- 1- SaOS-2 hücrelerinin hücrelerinin yeterince çoğaltılabilmesi için uygulanan pasajlama protokolü aşağıda belirtilmiştir.
- 2- G⁺ besiyeri ortamı çekildi.
- 3- Hücrelerin yüzeyi 37°C'de önceden ısıtılan Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandı.
- 4- Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,25)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C'deki inkübatörde bekletildi.
- 5- Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler santrifüj tüpüne toplandı.
- 6- Hücreler 1000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi.
- 7- Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
- 8- Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
- 9- Hücre süspansiyonu 1:2 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.
- 10- Hücre kültürünün besi ortamı 2 günde bir taze besi ortamı ile değiştirildi.
- 11- Yeterli sayıya ve uygun pasaj numarasına gelen hücreler deneylerde kullanıldı.

3.2.2. SaOS-2 Hücre Hattının Karakterizasyonu

3.2.2.1. SaOS-2 Hücre Hattının Büyüme Kinetiği

Hücrelerin kinetik değişkenlerinin belirlenebilmesi amacıyla; SaOS-2 hücre hattı için 20 gün boyunca 24 saat aralıklarla ölçüm alındı. Her ölçümde bir hücre grubu 3 kültür kabı gözünde üreyen hücrelere MTT analizi uygulandı. MTT analizi aşağıda belirtilen basamaklar takip edilerek uygulandı:

- 1- Analizi yapılacak hücrelerin besi ortamı boşaltıldı.
- 2- Hücrelerin üzerine %10 MTT içeren serumsuz besi ortamı eklenerek 3 saat karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- 3- İnkübasyon sonunda MTT içeren ortam boşaltıldı ve formazan kristallerinin çözünebilmesi için DMSO eklendi.
- 4- 570 ve 690 nm dalga boylarında spektral okuma gerçekleştirildi. MTT testi sonucuna göre ekilen hücre sayısının zamana karşı grafiği çizilerek büyüme eğrisi oluşturuldu.

3.2.2.2. SaOS-2 Hücre Hattının Kalibrasyon Eğrisinin Çıkartılması

Hücrelerin büyüme kinetikleri yukardaki prosedür kullanılarak, 20 gün boyunca MTT analizi ile belirlenmiştir. MTT analizinde absorbansa karşılık gelen hücre sayısını belirleyebilmek için hücrelerin kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Uygulanan protokol aşağıda belirtilmiştir.

- 1- Hücreler 96 gözlü pleyte farklı konsantrasyonlarda (10^3 ; 5×10^3 ; 10^4 ; 5×10^4 ; 10^5 5×10^5 ; 10^6 ; 5×10^6 ve 10^7 hücre/göz), 5 tekrarlı olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
- 2- Kültür kabı yüzeyine hücre tutunmasını takiben (3 saat sonra) MTT [3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu, M5655, Sigma, ABD] testi uygulandı.
- 3- L SS hücreleri 24 saatlik inkübasyon ortamı çekildi.
- 4- Hücrelerin üzerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) içeren besi ortamı eklendi.
- 5- Hücreler karanlıkta 37°C'de, %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edildi.
- 6- 3 saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortam çekildi.

- 7- Hücrelerin üzerine DMSO (8.02912.2500, Merck, Almanya) eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.
- 8- Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm' de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözünmesi sağlandı.
- 9- UV spektrofotometrede (MDS Molecular Devices, Versa Max, ABD) 570-690 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

3.2.2.3. SaOS-2 Hücre Hattının Tutunma Testi

İki boyutlu kültürde hücrelerin kültür kabı yüzeylerine tutunma sürelerinin belirlenmesi amacıyla tutunma testleri gerçekleştirilmiştir.

- 1- Tutunma testi için hücreler 6 gözlü pleyte 10⁶ g⁶ b⁶ f⁶ Ö⁶ nk⁶ b⁶ j⁶ şekilde 3 tekrarlı olarak ekildi.
- 2- G⁶ d⁶ q⁶ b⁶ ç⁶ n⁶ l⁶ m⁶ d⁶ r⁶ h⁶ n⁶ ç⁶ l⁶ 1⁶ ml eklendi ve 37°C'de, %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde bekletildi.
- 3- Hücreler tutunana kadar 15 dakikada bir pleytlerin 3 gözündeki besi ortamından homojen örnekler alınarak Neubauer hemositometresinde tripan mavisi kullanılarak sayıldı.
- 4- Sayım yapılan besi ortamında hücre kalmayınca kadar sayıma devam edildi.

3.2.3. OKKH Hücre Hattının Kültürü

113M243 No'lu Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü TÜBİTAK projesi kapsamında satın alınmış olan insan kaynaklı osteosarkoma kanser kök hücrelerinin (OKKH) (Celprogen, CA) kültürü yapılmıştır. Çalışma süresince bu hücreler pasaj 4-7 aralığında kullanılmış olup bu hücrelerin çözdürülmesi ve stoklanması (%2,5 FBS ve 10 µg/ml gentamisin içeren *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) HG (41966-029, Gibco, ABD) besi ortamında gerçekleştirilmiştir.

3.3. MACS Sistemi ile Hücre Ayrımı

SaOS-2 osteosarkoma kanser hücrelerinden, CD133+ hücrelerin yani kanser kök hücrelerinin ayrımı için kullanılan ayırım sisteminin protokolü şu şekildedir:

- 1- Çalışma öncesinde, MACS ayırımı sırasında kullanılacak tampon çözelti hazırlanır. Tampon çözeltinin hazırlanması için; PBS içerisinde %0,5 (w/v) olacak şekilde yeterli miktar BSA tartılır (50 ml PBS için 0,25 g BSA). Toz BSA PBS içerisinde çözündürülür. Solüsyon 0.22µm çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. Solüsyon içerisinde 2 mM olacak şekilde, EDTA solüsyona eklenir. (50 ml PBS için %1 w/v'lik EDTA solüsyonundan 2,9 ml) Solüsyon pH'sı 7.2 olmalıdır.

MACS sistemi manyetik işaretleme sistemine dayandığı ve hücrelerimiz CD133+ yüzey antijeni taşıdığı için, manyetik işaretleme ile pozitif ayırım yapılmıştır. Çalışma süresince manyetik işaretleme ile pozitif ayırım basamakları buz üzerinde uygulanmıştır.

- 2- Hücreler yeterli sayıya çoğaltıldıktan sonra tripsinizasyon ile süspanse hale getirildi ve hücre sayımı yapıldı. İstenen miktar buffer ile süspanse edilerek santrifüj yapılır. (300 g 10 dk=1220 rpm 10 dk)
- 3- 2×10^8 hücreye kadar MS kolonu ile (miniMACS separator) ayırım yapılmış ancak bu sayının üzerinde ise LS kolonu ile (midiMACS separator) ile ayırım gerçekleştirilmiştir.
- 4- Süpernatant döküldükten sonra, 10^8 hücreye kadar 300 µL buffer eklenerek homojenize edildi (Hücre sayısı 10^8 'i geçtiğinde, doğru orantılı olarak kullanılan buffer ve diğer solüsyonların miktarı artmıştır. Örn: 2×10^8 600 µL of buffer gibi.)
- 5- 10^8 hücreye kadar 100 µL FcR Blocking Reagent eklenerek homojenizasyon yapıldı.
- 6- 10^8 hücreye kadar 100 µL CD133 MicroBeads solüsyonu eklendi, homojenizasyon yapıldı.
- 7- 30 dk +4°C'de bekletildi.

- 8- + 4°C 'den alınan hücre süspansiyonuna 2 ml buffer solüsyonu (10^8 için) eklendi ve 300 g 10 dk (1220 rpm 10 dk) santrifüj yapıldı. Santrifüjün bitimine yakın kolon hazırlığı tamamlandı.

Kolon hazırlanması amacıyla, ayırım yapılması planlanan hücre sayısına göre, MiniMACS yada MidiMACS seçimine göre separatör standa yerleştirildi. Uygun kolon tipi kolonun üzerindeki çıkıntılar dışa bacak şekilde separatörün içine doğru itildi. Yerleştikten emin olunduktan sonra kolonun altına santrifüj tüpü (15 ml) yerleştirildi. Kolonun çeperlerinden yavaşça köpük oluşturmayaacak şekilde 500µl buffer geçirildi. Bu miktarın damlaması bittiğinde hücre süspansiyonu geçirme işlemine başlandı. Kolon yıkandıktan sonra kolon altındaki santrifüj tüpü değiştirilmiştir.

- 1- Süpernatant döküldükten sonra, hücreler 500 µL (10^8 hücre için) buffer ile köpük oluşturmamaya dikkat edilerek süspanse hale getirildi.
- 2- Hücre süspansiyonu tek seferde hücrelerin kolonun tam merkezinden geçebileceği şekilde bir seferde boşaltıldı.
- 3- Damla bitene kadar beklendikten sonra, kolonda tutunmayan hücrelerin kolondan uzaklaştırılması için 3×500 µL buffer yine kolon çeperlerinden akıtılarak geçirildi. Alt tüpte negatif hücreler toplanmıştır.
- 4- 1 ml buffer kolona çeperden eklendi. Kolon separatörden ayrıldı ve yeni bir santrifüj tüpü içerisine steril piston yardımıyla boşaltıldı.
- 5- Ayrılmış olan bu hücreler pozitif hücreler olarak tanımlandı.

3.4. Bakteriyel Selüloz Doku İskelelerinin Hazırlanması

002L 132 Mnk Dfd Cnhdq hdrh Alxnl ~ gdnrlrkj AÖK1 ~ SCEAHTAK projesi kapsamında üretilen ve E. Ü. Biyomühendislik Bölümü'nde karakterizasyonu bir yüksek lisans tezi kapsamında yapılan bakteriyel selüloz doku iskeleleri kullanılmıştır. Üretilen ve karakterizasyonu yapılan bakteriyel selüloz doku iskelelerinin yıkanması ve sterilizasyonu amacıyla gerçekleştirilen protokol şu şekildedir:

- 1- Inkübasyon süresinin sonunda üretilen BS'ler distile suda yıkandıktan sonra 0,1 M NaOH içerisinde 80°C'de bir gece bekletildi.
- 2- 80°C'den alınan BS'ler taze 0,1 M NaOH içerisinde 20 dakika kaynatıldı.

- 3- AR cihazı ile 1/ c`j l j` j`xm sÂ Âud at l rlem BS beyaz bir renk alana kadar tekrarlandı.
- 4- 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.

Steril hale getirilen bakteriyel selülozlar, gözenek çaplarının daha geniş olması ve SEM analizlerinin gerçekleştirilmesi amacı ile kullanım öncesi liyofilize edilerek kullanılmıştır. Yıkama sonrası gerçekleştirilen bu işlem için;

- 1- BS’ler yıkandıktan sonra -86°C’de donduruldu.
- 2- Üzerleri alüminyum folyo ile kaplanarak delikler açıldı.
- 3- BS’ler liyofilizatöre koyuldu ve bir gece boyunca liyofilize edildi.

3 boyutlu kültür için kullanılacak olan bu BS doku iskeleleri, liyofilizasyon sonucunda deneyler boyunca 96 gözlü pleyt bir göz büyüklüğünde kesilerek kullanılmış ve her kullanım öncesinde otoklavlanarak sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.5. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında Hücre Kültürü ve Analizler

3.5.1. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür ve Analizler

3.5.1.1. Hipoksik ve Normoksik Şartlar altında 2 Boyutlu Kültür MTT Analizi

MTT testi, hücre canlılık ve üreme oranı hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılan, kolorimetrik esasa dayanan bir testtir. Ana maddesi olan MTT’nin [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] formazana indirgenmesiyle sarıdan mora doğru renk değişikliği gözlenir. Bu renk değişikliği sadece canlı hücrelerde gözleendiği için spektrofotometre ile yapılan ölçüm hücre canlılık oranları hakkında bilgi verir. Bu çalışmada, MTT testi ile 96 gözlü plate üzerine ekilmiş hücrelerin metabolizması ve proliferasyonu değerlendirilmiştir. 8 farklı 96 gözlü pleyte, her biri üç tekrarlı olmak üzere göz başına 10^4 hücre ekilmiştir. CD133+, CD133- ve OKKH hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin 3 ve 7 günlük kültür süreleri sonunda MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. Pleytler 2’şerli olarak (3 ve 7. Gün) %1, %3, %5 ve %21 O₂ seviyelerinde, (%2,5 FBS ve 10 µg/ml gentamisin içeren *Dulbecco's Modified*

Eagle's Medium (DMEM) HG (41966-029, Gibco, ABD)) besi ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda;

1. Hücrelerin kullanılmış besiyerleri çekildi.
2. Her bir göze üzerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) içeren besiyeri eklendi.
3. Hücreler karanlıkta kalacak şekilde 37°C'de, %5 CO²'li inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edildi.
4. 3 saat sonunda MTT içeren ortam çekildi.
5. Yüzeyler üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.
6. Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm'de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözülmesi sağlandı.
7. UV spektrofotometrede (MDS Molecular Devices, Versa Max, USA) 570-690 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

3.5.1.2. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür İmmunohistokimyasal Boyama Analizleri

CD133+, CD133- ve OKKH hücreleri izolasyon belirteci olan CD133 varlığının belirlenmesi ve hipoksik şartların kök hücre karakterine etkisinin belirlenmesi amacıyla immunohistokimyasal boyama ile analiz edildi. Analizde, osteosarkoma kanser kök hücrelerinin belirteci olan anti-CD133, kök hücre karakterinin belirlenmesi amacı ile anti-Oct-4 ve anti-Sox-2, hipoksik şartlarda kanser kök hücrelerinden ekspresyonu beklenen anti-VEGF ile boyandı. Deney tasarımı şu şekildedir:

12-gözlü-çıkarılabilir-odacıklı-slide (81201, İbidi, Almanya) üzerine göz başına 10⁴ hücre olacak şekilde, her gen için tek tekrar olmak üzere CD133+, CD133- ve OKKH hücreleri ekildi. Hücreler 72 saat boyunca %1, %3, %5 ve %21 O₂ seviyelerinde, (%2,5 FBS ve 10 µg/ml gentamisin içeren *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) HG (41966-029, Gibco, ABD)) besi ortamında inkübe edilmiştir. 72 saat sonunda;

- 1- G⁺ b⁺ d⁺ d⁺ m⁺ y d⁺ d⁺ n⁺ d⁺ j h j t k k m⁺ A⁺ A⁺ besi ortamı çekildi ve hücreler Ca⁺², Mg⁺² içeren PBS ile üç kez yıkandı.
- 2- *3 i B⁺ c d a t k m m r n f t j O E @ t⁺ O y d k s r h ' \$ 3 (x⁺ y d x k d q⁺ y d d m d j k d m e h u d □ 2 / / q l⁺ c d j h t⁺ k j⁺ k x A⁺ A⁺ t⁺ k j⁺ k m q j + n c⁺ r A⁺ j k A⁺ında, 60 dakika fiksasyon

yapıldı.

- 3- Elj r` rxnm a` r` l ` f`ının ardından PFA çekildi ve yüzeyler tekrar Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren sodium azitli PBS eklenerek analiz başlangıcına kadar saklandı.
- 4- Analiz başlangıcında saklanan örneklerin üzerindeki sodyum azitli PBS çekilerek, üç defa PBS ile yıkandı. Yıkanan örnekler belirlenen primer antikorlarla 3 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 5- Çe` cde` OAR hıd xÂ` m mÖmıj kđ qahnsnıkdı hr, ikincil antikorlar ile 30 dk inkübe edildi.
- 6- PBS ile üç defa 5'er dakika yıkanan örnekler streptavidin hidrojen peroksidaz içinde 30 dk bekletildi.
- 7- Tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak iml t mıqd j shısdnımf Öq m đq f~ m r` flamak üzere 5 dakika diaminobenzidine (DAB) kromojeni uygulandı.
- 8- Kesitler Mayer's hematoksilen ile 1 dk boyandıktan sonra distile su ile yıkandı ve immunohistokimya kapatma çözeltisi (Merck Millipore-107961, Almanya) ıkd j ` o` sÂcÂs` mrnnıj Âık mikroskobu (Olympus BX-40, Japonya) ile incelendi.

3.5.1.3. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür Kantitatif PCR Analizi

MACS ayırım sonucu elde edilen CD133+ ve CD133- hücrelerinin ve kontrol hattı olarak kullanılan OKKH hücrelerinin belirteci olan CD133 varlığının belirlenmesi ve hipoksik ve normoksik şartların kök hücre karakterine etkisinin belirlenmesi amacıyla kantitatif PCR analizi yapıldı. Analizde, insan osteosarkoma kanser kök hücresinin belirteci olan CD133, kök hücre karakterinin belirlenmesi amacı ile Oct-4, Sox-2, NaNOG, hipoksik şartlarda HIF1-alfa ve HIF2-alfa genlerinin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için HIF1-alfa ve HIF2-alfa primerleri kullanıldı. Analizler, 24 gözlü pleytlerde göz başına 5×10^4 hücre ekilerek, hücrelerin %1, %3, %5, %21 oksijen seviyelerinde, (%2,5 FBS ve 10 µg/ml gentamisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) HG (41966-029, Gibco, ABD)) besi ortamında 72 saatlik inkübasyon sonucunda gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler tripsin ile kaldırılarak, tripsin uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml tripure reaktifı eklenerek -860C'de analiz başlangıcına kadar saklandı. Protokol şu şekildedir:

1. Tripure reaktifi ışığa maruz bırakılmamalı, 2-8°C ' de saklanmalıdır.
2. Tripure RNA' yı çevreleyerek korur böylece izolasyon işlemleri sırasında RNA' nın degrade olması önlenir.
3. Tüplere 200 ul Liziz tamponu ve 40 ul Proteinaz K eklendi. 37°C 'de 10 dakika inkübe edildi.
4. Hücreler SeptiFast Lys Beads tüplerin içine aktarıldı.
5. Tüplere 800 ul tripure eklendi ve tüpler MAGNA Lyser homojenizatörde 45 saniye 4500 rpm' de döndürüldü. Böylece tüpteki boncukların da yardımıyla hücreler homojen bir görünüm alarak parçalandı ve tripure reaktifi etkisiyle de pembe bir renk görünümünü aldı.
6. Homojenizatörden çıkarılan tüpler cihazla birlikte gelen soğutma bloğuna alındı ve 2 dakika bekletildi. Homojenizatörde o hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak için bu işleme başvuruldu.
7. 5 dakika oda ısısında bekletildi.
8. Tüplere 200 ul kloroform eklendi ve 5 dakika beklendi. Kloroform; homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlar. Böylece RNA, DNA ve protein elde edilir.
9. 2.000 rpm' de 4°C ' de 20 dakika santrifüj yapıldı.
10. Santrifüj sonunda 3 faz oluştu.
- ❖ 1.FAZ (sulu faz): RNA içerir. (renksizdir)
- ❖ 2.FAZ: DNA içerir. (beyaz renklidir)
- ❖ 3.FAZ (organik faz): Protein içerir. (kırmızı renktedir)
11. RNA izolasyonu için renksiz olan 1.faz yeni tüpe aktarıldı.
12. Yeni tüpe 500 ul izopropanol eklendi. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
13. Izopropanol RNA'yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanılır.
14. 12.000 rpm' de 4°C' de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
15. Oluşan çökelek üzerine 1 ml %75 EtOH eklendi. 7.500 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendi.
16. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı.
17. 57°C' de EtOH uçuruldu.
18. Kalan çökeleğe 50-100 ul RNase free su eklenerek pipetaj yapıldı.

İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları UV spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edildi, ideal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/ A280 absorbans oranının 1,8-2,0 olması beklenir.

cDNA sentezi için “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche; 04379012001, ABD) kullanıldı.

1. PCR tüpleri örnek sayısı kadar çıkartıldı ve soğutma kabına yerleştirildi. Her bir örnekten 8,4 µl alınarak PCR tüplerine eklendi ve üzerine her örnek için 2 µl random primer + 1 µl oligo dT primer eklendi. Toplam hacim 11,4 µl.
2. Tüpler termal çeviriciye yerleştirildi. 65°C’ de 10 dk RNA’lar denatüre edildi. Bu arada mastermiks hazırlandı. (Bu miktarlar örnek sayısı ile çarpılarak hazırlandı)
3. Bir reaksiyon için; reaksiyon tamponu 4 µl, RNase inhibitör 0,5 µl, deoksinukleotid miks 2 µl, DTT 1 µl, transkripsiyon enzimi 1,1 µl olacak şekilde toplam hacim 8,6 µl olarak mastermiks hazırlanır.
4. Her tüpe 8,6 µl hazırlanan karışımdan dağıtıldı, toplam hacim 20 µl olacak şekilde tüpler termal çeviriciye yerleştirildi ve aşağıdaki hazırlanmış program çalıştırıldı:
 - 55 °C ‘de 30 dk
 - 80 °C’de 60 dk
 - 4 °C’de bekleme

Kantitatif PCR aşamasında, primerler için optimizasyon ise şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- 1- Öncelikle primerlerle yanında gelen kullanım kılavuzlarında yazan 100µM için gerekli su miktarı eklenerek 100 µM’a (yani 100pmol/ µl’ye) sulandırıldı.

- 2- Sonra her parametre için aşağıda primerlerden 10 µM (yani 10pmol/ µl) ara stoklar oluşturularak çalışıldı.
- 3- Tek reaksiyon için; 5,7 µl nükleaz içermeyen su, 1 µl forward primer (10µM), 1 µl reverse primer (10µM), 0,3 µl taqman probe-UPL probe (10µM), 10 µl enzim ve dNTP karışımı hazırlandı (toplam 18 µl).
- 4- Reaksiyon tüpüne, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden eklendi ve reaksiyon sayısı kadar kondu, reaksiyon karışımı hazırlandı.
- 5- Her bir karışımdan 18 µL olacak şekilde Lightcycler multiwell 480 plate yüklenip üzerlerine 2 µL izole edilmiş olan cDNA'lar eklendi.
- 6- 30 saniye santrifüj yapıldı (Centrifuge 5430).
- 7- Lightcycler 480II cihazı ile çalışılmıştır.
- 8- Elde edilen sonuçlar target ve referans gen bölgeleri ile relatif kantitasyon yapıldı.

Deneyde kullanılan primerler şu şekildedir:

Tablo 3.1: Deneyde kullanılan kantitatif PCR primerleri

Gen	Sol Primer	Sağ Primer
Nanog	acaggtgaagacctggtcc	ttgctattcttcggccagtt
Sox2	atgggttcggtggtaagt	ctgatcatgtcccgagggt
Oct 3/4	cttcggatttcgccttctc	cttagccagggtccaggat
Cd133	tccacagaaattacatttg	cagcagagagcagatgacca
Hif1A	gaacctgatgctttaactttgct	tctgtgtcgttgcgtccaa
Hif2A	catctacaacctcgcaacc	caatctcactcaggacgtattga
Gapdh	agccacatcgctcagacac	Aatacgaccaaaccggtgact
Actb	cgacaggatgcagaaggag	aggaggagcaatgatcttgatct

3.5.1.4.Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür Alkalen Fosfataz Aktivitesi Analizi

ALP, alkali tampon içerisinde fosfat esterlerinin hidrolizini katalizler ve organik radikaller ile inorganik fosfat oluşturur. Kit fosfat substratı olarak *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) kullanır ve *p*NPP ALP ile defoforilize olduğunda sarı renk verir. Kit örnekteki 10-250 µU ALP miktarını ölçebilmektedir. 96 gözlü pleyt üzerine göz başına 5×10^4 hücre olacak şekilde, her hücre için üç tekrar olmak üzere CD133+, CD133- ve OKKH hücreleri ekildi. Hücreler 72 saat boyunca %1, %3, %5 ve %21 O₂ seviyelerinde, (%2,5 FBS ve 10 µg/ml gentamisin içeren *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) HG (41966-029, Gibco, ABD)) besi ortamında inkübe edilmiştir. 72 saat sonunda;

Hipoksik ve normoksik şartlar altında kanser kök hücrelerinin farklılaşma karakterini belirlemek ve kanser hücrelerine farklılaşma sonucu artması beklenen alkalen fosfataz aktivitesini ölçmek amacıyla yapılan ALP analizinin protokolü şu şekildedir.

Deney için (**Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) - Cat No: ab83369**) kullanılmıştır.

- 1- Kit -20°C'den çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlanmış ve kullanmadan önce vialler kısa bir süre santrifüj edilmiştir.
- 2- ***p*NPP solüsyonu hazırlanışı:** 1 tablet *p*NPP, 2,7 ml analiz tamponu içerisinde çözülerek 5mM çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
- 3- Hücre içi ALP'yi ölçmek için hücreler 96 gözlü pleyt yüzeyinden tripsinizasyon yöntemi ile kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler küçük endorf tüplerine alınarak tripsin uzaklaştırılmıştır.
- 4- Bütün endorfların üzerine 100 µl analiz tamponu koyularak, hücre içi ALP aktivitesinin hücre dışına çıkması amacıyla 13000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi.
- 5- Süpernatantlardan 20'şer µl alınarak 96 gözlü pleytlere koyuldu.
- 6- Tüm örneklerin üzerine 50'şer µl *p*NPP solüsyonu koyuldu ve iyice karışması sağlandı. Işıktan korunarak 60 dk 25°C'de inkübe edildi.

- 7- Tüm reaksiyonların durdurulması için 20 µl reaksiyon durdurma solüsyonu eklendi.
- 8- 405 nm’de mikropleyt okuyucuda ölçüm alındı.

3.5.2. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültür ve Analizler

3.5.2.1. Hipoksik ve Normoksik Şartlar altında 3 Boyutlu Kültür MTT Analizi

2 boyutlu örnekler için uygulanan MTT testi, 3 boyutlu kültür analizinde malzemenin hücre canlılık ve üreme oranı hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılmıştır. Bakteriyel selüloz doku iskelesinin, 2 boyutlu kültürlerle göre hücrelerin malzeme üzerindeki canlılığını ölçmek ve bu canlılık analizinin sonuçlarına göre diğer analizlerin sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilmesi amacıyla MTT testi uygulanmıştır. 2 boyutlu çalışmalarla benzer şekilde gerçekleştirilen bakteriyel selüloz üzerindeki hücrelerin MTT analizi şu şekildedir:

- 1- Hücrelerin ekimi öncesi, hücrelerin malzemeye tutunmasını hedeflemek amacıyla 96 gözlü pleytin polistiren yüzeyleri %2’lik agar ile kaplanmıştır.
- 2- Agar ile kaplanan gözler üzerine, 96 gözlü pleytin bir gözü boyutunda kesilen sterilize edilmiş bakteriyel selüloz doku iskelesi yerleştirilmiştir.
- 3- Hücre ekimi öncesinde doku iskelelerinin şartlandırılması amacıyla 24 saat boyunca %2,5 FBS içeren DMEM HG besi ortamı ile bekletilmiştir.
- 4- 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda besi ortamı çekilmiş ve CD133+, CD133- ve OKKH hücreleri göz başına 10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir.
- 5- Ekim sonrasında 96 gözlü pleytler %1 ve %21 O₂ seviyelerinde 3 ve 7 gün olarak inkübe edilmiş, 3 ve 7 gün sonrasında iskeleler temiz gözlere alınarak 2 boyutlu örneklerin analizlerinde tanımlanan MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.2. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültür İmmünohistokimyasal Analizleri

CD133+, CD133- ve OKKH hücrelerinin bakteriyel selüloz doku iskelesi

kalibrasyonundan gelen hata oranlarını negatife indirmek amacıyla aynı anda yapılmıştır.

3.5.2.4. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür Alkalen Fosfataz Aktivitesi Analizi

2 boyutlu kültür örnekleri için gerçekleştirilen ALP analizi aynı amaç doğrultusunda 3 boyutlu bakteriyel selüloz doku iskelesi örnekleri için de gerçekleştirilmiştir. Hücre ekimi için hazırlanan BS örnekleri üzerine göz başına 5×10^4 hücre olacak şekilde, her hücre için üç tekrar olmak üzere CD133+, CD133- ve OKKH hücreleri ekildi. Hücreler 72 saat boyunca %1 ve %21 O₂ seviyelerinde inkübe edilmiştir. 72 saat sonunda, 2 boyutlu kültürlerin ALP analizi ile aynı protokol gerçekleştirilmiştir. Tek farklılık, bakteriyel selüloz doku iskelelerinden hücrelerin kaldırılması yerine, doku iskelelerinin üzerine 100 µl analiz tamponu koyularak, hücre içi ALP aktivitesinin hücre dışına çıkması amacıyla 13000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenmesidir. Diğer basamaklar aynı şekilde gerçekleştirilerek 405 nm’de mikroplyt okuyucuda ölçüm alınmıştır.

3.5.2.5. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültürlerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntü Analizi

Bakteriyel selüloz doku iskelesi üzerinde kültive edilen CD133+, CD133- ve OKKH hücrelerinin morfolojik olarak incelenebilmesi ve BS doku iskelesinin por çaplarının 3 boyutlu kültürler için uygunluğunu belirlenebilmesi amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Sterilize edilen, şartlandırılan BS üzerine SEM analizi için 5×10^4 hücre ekilmiştir. %1 ve %21 O₂ seviyelerinde 72 saat inkübe edilen hücrelerin, inkübasyon süresi sonucunda SEM analizine hazırlanma protokolü şu şekildedir:

- 1- Uygulamalar 1. basamaktan 4. basamağa kadar +40C’de (buz üstünde), 5. basamaktan 11. basamağa kadar ise oda sıcaklığında yapıldı.
- 2- Örnekler 30 saniye serum fizyolojik ile yıkandı.
- 3- Serum fizyolojik ile yıkanan örnekler 30 dakika tampon A’ da [0,1 M

sodyumkakodilat (C-0250, Sigma, USA) içerisinde hazırlanan gluteraldehit (%5) (8.20603.1000, Merck, Almanya) çözeltisinde] bekletildi.

- 4- A' rka bir solüsyon ile yıkama yapılmadan örnekler tampon B'ye [1 M sodyumkakodilat içerisinde hazırlanan sukroz (%7) (1.07651.1000, Merck, Almanya) çözeltisinde] alınarak 30 dakika bekletildi.
- 5- A' rka bir solüsyon ile yıkama yapılmadan tampon C' ye [1 M sodyumkakodilat içinde % 2 ozmiyum tetroksit (19100, Electron Microscopy Sciences,)] alınarak 30 dakika bekletildi.
- 6- S' l onm B ` ramasından sonra örnekler 5 dakika distile suda yıkandı ve bu basamak 2 kez tekrarlandı.
- 7- Örnekler distile su ile yıkamadan sonra artan derecelerdeki alkol serilerinde 5'er dakika adj kshdqj rt rt yk rşâc Â RÂr Âk' ds' mk '0- / 872-14/ / + L dqj + @kl `nx` (rdqldqj \$ 24+ \$ 4/ + \$ 6/ + \$ 74+ \$ 84+ \$ 0/ / + \$ 0/ / ds' mk rşklnde hazırlandı.
- 8- Alkol serileri tamamlanınca örnekler heksametildisilazan (HMDS, 8.4324.250, Merck, Almanya) solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
- 9- Cyddqdm dmGL CR ‡dj hclj sdmrnmı +Öndj kldj t q l `k qÂçlmnc` r Â` j kÂında 30 dakika tutuldu.
- 10- Kuruma tamamlandıktan sonra SEM incelemesine kadar desikatör içerisinde bekletildi.
- 11- SEM inceleme öncesi, örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirildi ve 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobunda incelendi.

Sabitlenen doku iskeleleri üzerinde hücre morfolojileri görüntülendi. Hücrelerin SEM görüntülemesi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi SEM mikroskobu (FEI, Quanta 250FEG) ile yapıldı.

3.6. İstatiksel Analiz

- 1- Bütün deney gruplarından en az üçer örnek test edilmiştir. (n=3).
- 2- Deneyler en az iki tekrarlıdır.
- 3- R`xÂ`k cdfdqdmclj dldqd nş`kl ` cdf`erler ve standart sapmalar rapor edilmiştir.

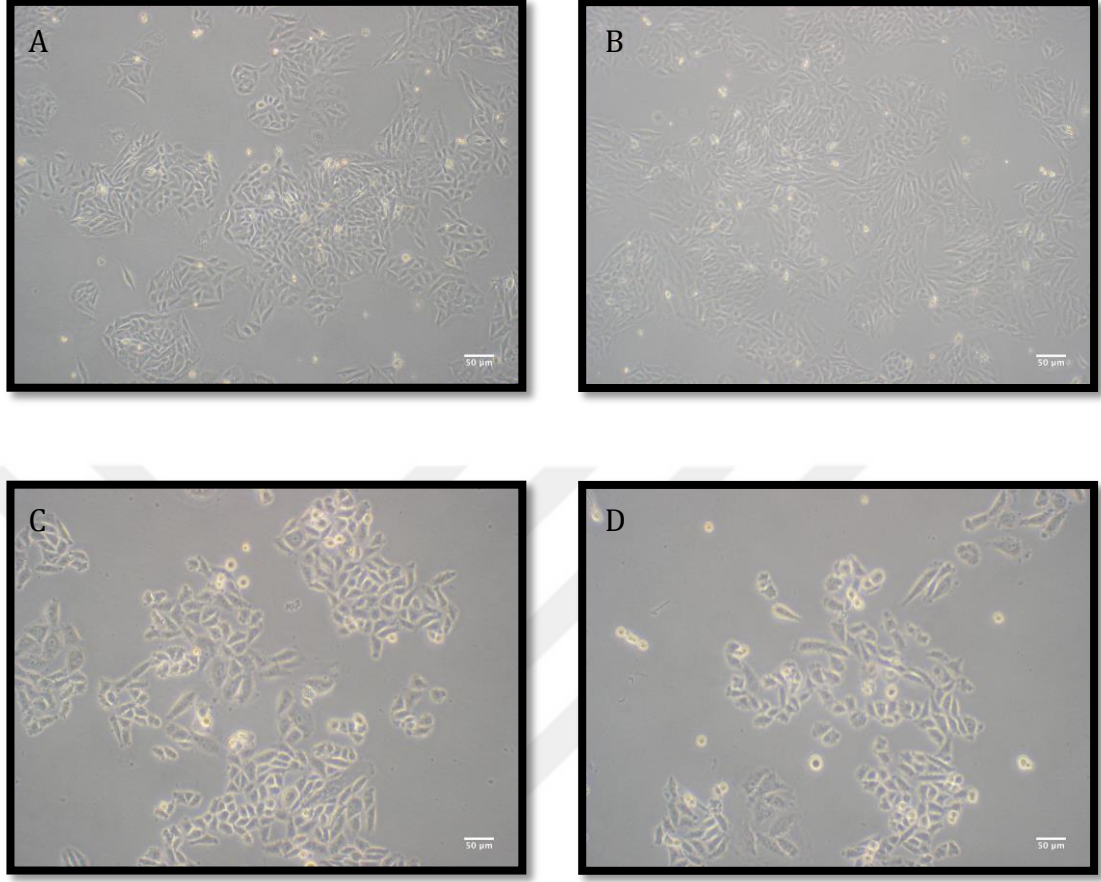
- 4- Cdnmx fqt ok qÂ`q`rÂ`j hls`srslj rdke`qj k q@MNU@'u`qx`mr`m klyh(xÖsdl h
Hd+ \$ 84 f~udm `q`kÂ`Â`cdfdqdnclqkl hZ+ fqt ok q`q`rÂ`hj lkh lkrkiler
Tukey's post-hoc yöntemiyle saptanmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Hücre Morfolojileri

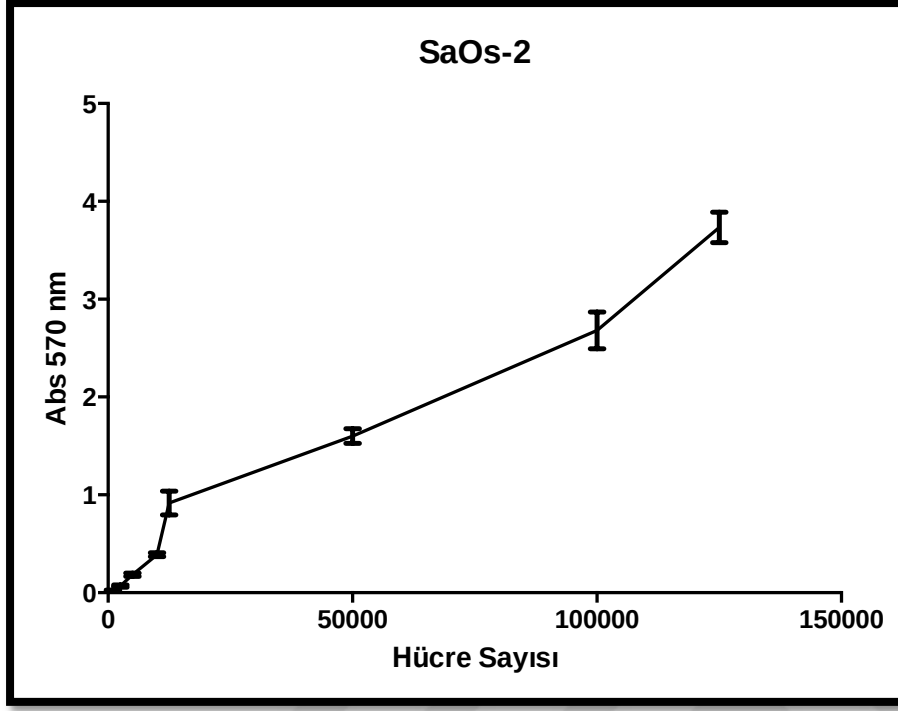
Stoktan çözdürülen SaOs-2 ve OKKH hücre morfolojilerinde SaOs-2 hücre morfolojilerinin osteoblastik hücre yapısı gösterdiği ve iğsi morfolojide olduğu gözlenirken, OKKH hücrelerinin de yine aynı şekilde iğsi morfolojide olduğu ama yer yer hegzagonal yapıda olduğu gözlemlendi. Pasaj 15-18 aralığında çalışılan SaOs-2 ve pasaj 4-7 aralığında çalışılan OKKH hücrelerinin morfolojileri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Hücrelerin ters faz ışık mikroskop görüntüleri. A ve B SaOs-2; C ve D OKKH. Ölçek çizgileri 50 μm 'ye denk gelmektedir.

4.2. SaOs-2 Hücre Hattının Kalibrasyon Eğrisi

SaOs-2 hücreleri için hazırlanan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2'de verilmiştir. Grafikteki absorbans değerlerine denk gelen hücre sayıları ise Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Hücre canlılığı yani MTT testi ile her hücre tipine göre farklılık gösteren ve karakterizasyonda önemli olan bu kalibrasyon eğrisi ile büyüme grafiği de çıkarılmıştır.



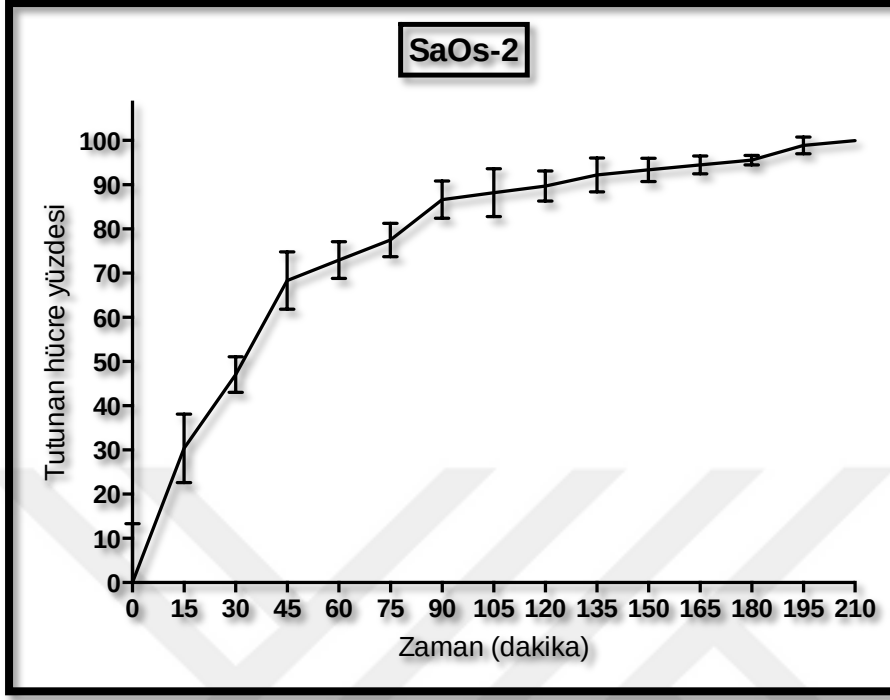
Şekil 4.2: SaOs-2'ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.1: SaOs-2 kalibrasyon eğrisinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları

Absorbans Değeri	Karşılık Gelen Hücre Sayısı
0,1844	1587
0,3876	8360
0,9166	25993
1,6016	48827
2,6803	84782
3,7342	119913

4.3. SaOs-2 Tutunma Testi

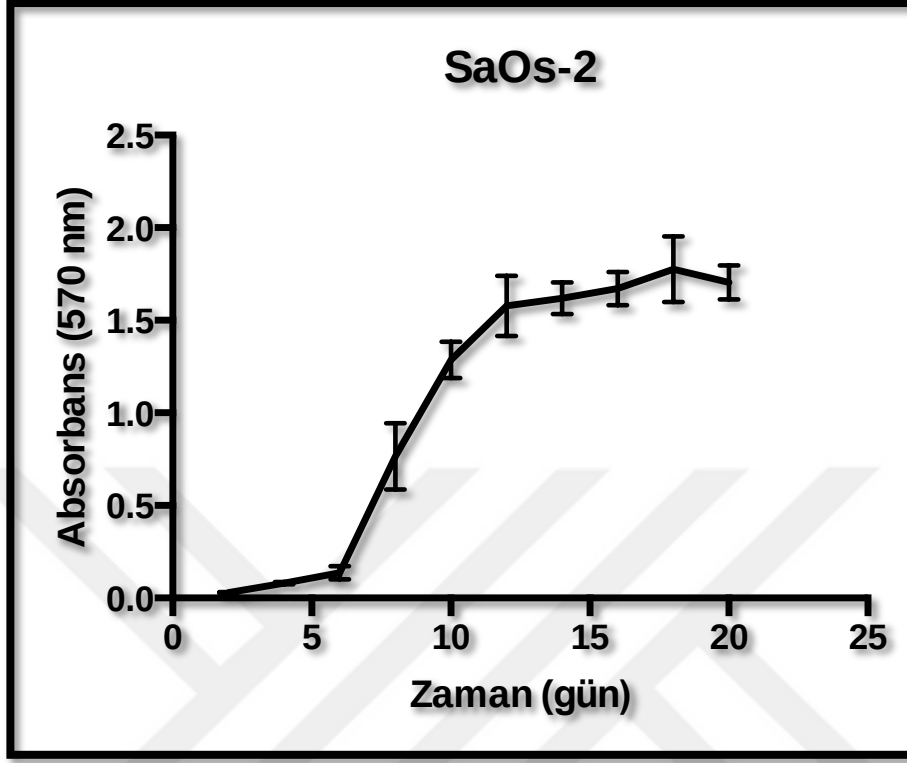
SaOs-2 hücreleri için hazırlanan tutunma kinetiği grafiği Şekil 4.3’de verilmiştir. Hücrelerin karakterizasyonu aşamasında yer alan bu test sonucu SaOs-2 hücrelerinin 210. dakikada tutunduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.3: SaOS-2 tutunma testi

4.4. SaOs-2 Büyüme Kinetiği

SaOs-2 hücreleri için hazırlanan büyüme kinetiği grafiği Şekil 4.4’de verilmiştir. Elde edilen grafiğe göre SaOs-2 hücrelerinin 11. güne kadar üreme evresinde, 19. güne kadar ise durgun dönemde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4: SaOs-2 hücrelerinin büyüme kinetikleri

4.5. MACS Sisteminin Optimizasyonu

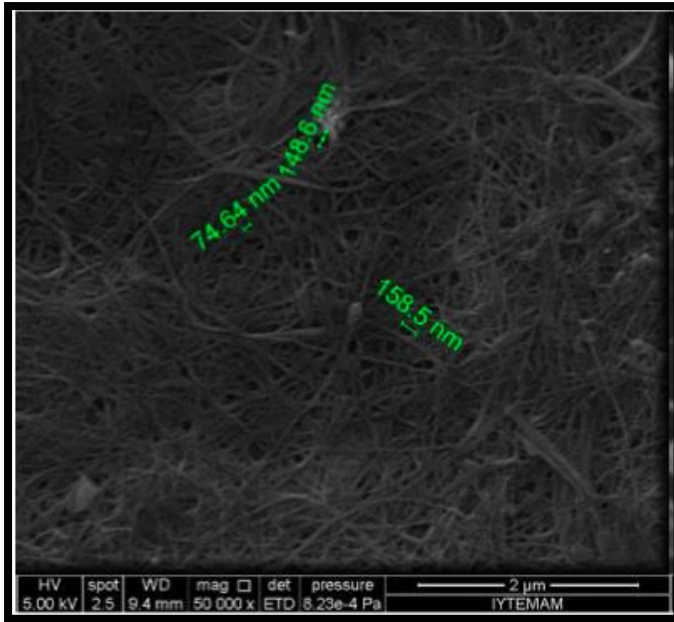
MACS ayırımı sonucu, çalışma için kullanılan hücrelerin ayırım oranları tablo 4.2’de gösterilmiştir. Pasaj 18 SaOs-2 hücreleri ile girilen bu ayırımlarda genelde %3 oranında KKH elde edilmiştir.

Tablo 4.2: MACS ayırım oranları

Ayırım	Kolon Tipi	Kolon Sayısı	Ayırım öncesi toplam hücre sayısı	İzole edilen CD133+ hücre sayısı	Kolondan yıkanan CD133- hücre sayısı	KKH oranı(%)
1	MidiMACS	1	$2,2 \times 10^8$	$6,67 \times 10^6$	$3,6 \times 10^7$	3
2	MiniMACS	1	$1,3 \times 10^8$	$4,25 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	3,2
3	MidiMACS	1	$2,51 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	0,83

4.6. Bakteriyei Selüloz Doku İskelesi SEM Görüntüleri

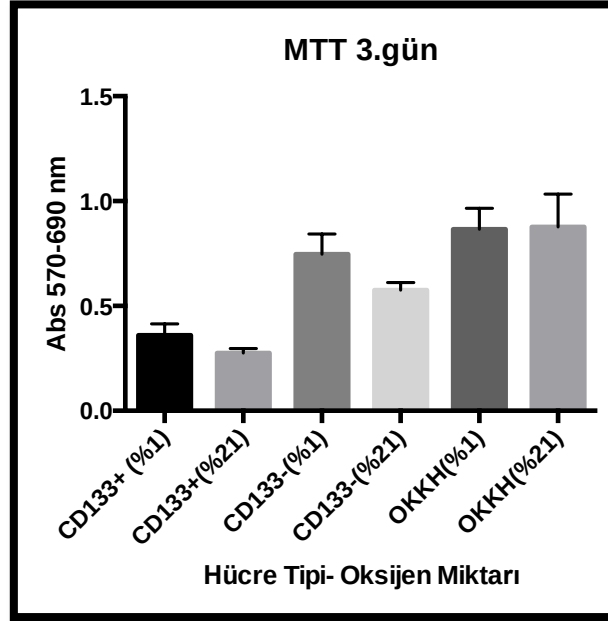
Bakteriyei selüloz doku iskelelerinin hücre ekimi öncesi, boş doku iskelesi görüntüsü Şekil 4.5’de gösterilmiştir. BS doku iskelesinin gözenek çapları kontrol BS’da 126,58 nm olarak belirlenmiştir.

**Şekil 4.5: BS doku iskelesinin gözenek çapları**

4.7. Hipoksik ve Normoksik Şartlar altında 2 Boyutlu Kültür MTT Analizi

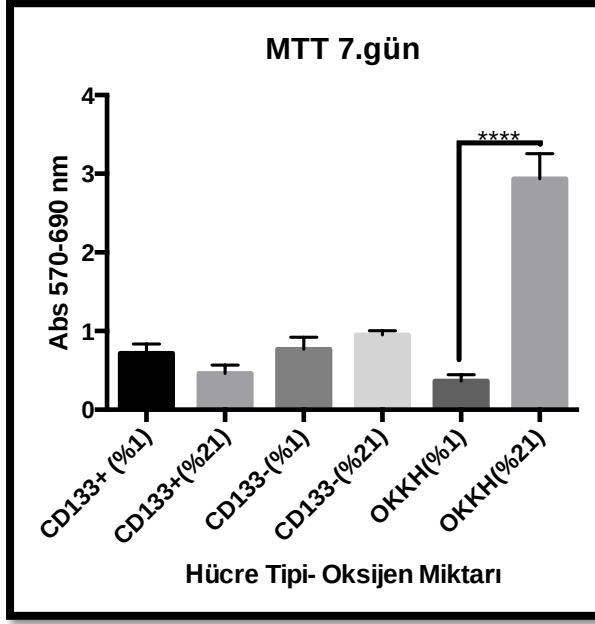
MTT analizi bu test içerisinde hücre canlılık seviyesine oksijen etkisinin araştırılması için yapılmıştır. 2 boyutlu olarak 96 gözlü pleyt kullanılarak hücre canlılıkları karşılaştırılmıştır. %1 ve %21 O₂ seviyelerinde hücrelerin 3. ve 7. kültür sürelerinde hücrelere MTT testi yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

Hücrelerin 3.gün MTT sonuçlarına baktığımızda oksijen seviyesinin hücrelerin canlılığını etkilemediği görülmüştür. Belirgin farklılıklar sadece hücre grupları arasında olmakla beraber OKKH hücrelerinin diğer hücrelerden çok daha fazla ürediğini ve canlılık gösterdiği görülmekle beraber, CD133+ hücrelerin her iki oksijen seviyesinde de canlılıklarının düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6: Hücrelerin 3. gün MTT analiz grafiği

MTT 7.gün sonuçlarına baktığımızda ise hücrelerin 3.güne göre hücre canlılığında genel bir artış görülmektedir. Ancak %21 oksijen seviyesinin özellikle OKKH hücre hattının canlılığını belirli bir şekilde arttırdığı görülmekle beraber, %1 oksijen seviyesinde aynı artış görülememiştir. Diğer hücre tiplerinde herhangi belirgin bir artış yaşanmamasına rağmen, elde edilen bu sonuçlar gereği diğer yapılacak olan analizlerde hücre kültürü süresinin 3 gün olarak belirlenmesine karar verilmiştir.

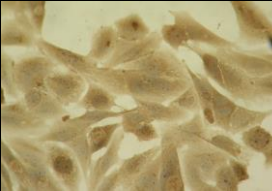
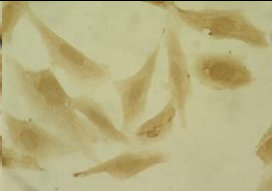
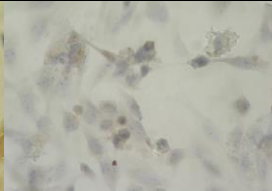
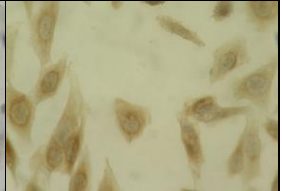
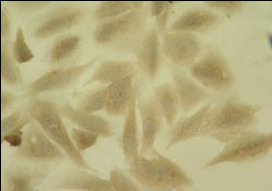
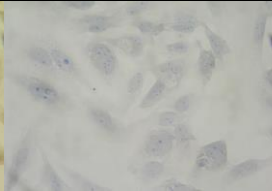
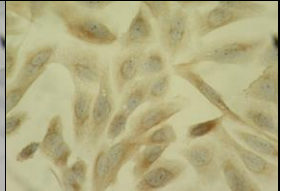
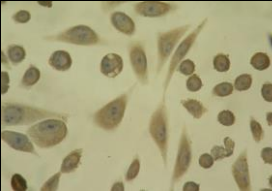
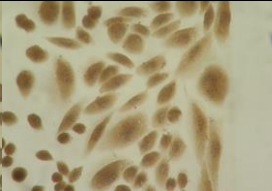
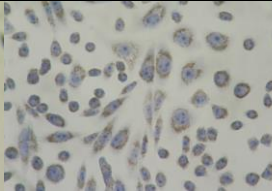
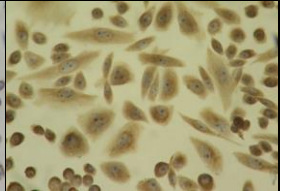


Şekil 4.7: Hücrelerin 7. gün MTT analiz grafiği

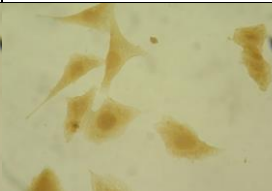
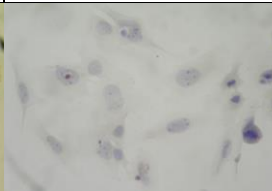
4.8. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür İmmünohistokimyasal Boyama Analizleri

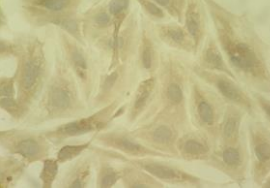
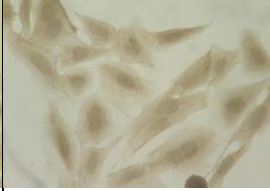
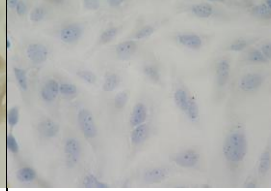
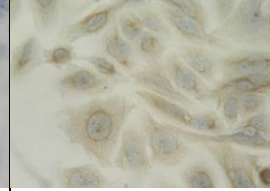
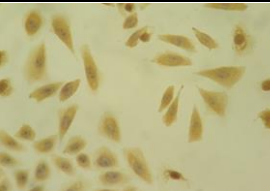
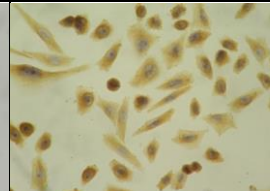
2 boyutlu olarak deney tasarımı yapılan CD133+, CD133- ve OKKH hücre hatları hipoksik ve normoksik şartlar altında 3 günlük inkübasyon süresinin sonunda immünohistokimyasal boyama ile analiz edildi. Analizde, anti-CD133, Oct-4 ve anti-Sox-2 ve anti-VEGF antikorları kullanıldı. %1 oksijen seviyesinde inkübe edilen hücrelerin boyama resimleri Tablo 4.3’de, %21 oksijen seviyesinde inkübe edilen hücrelerin resimleri ise Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.3: Hipoksik şartlar altında 2B olarak inkübe edilen hücre gruplarının immünohistokimyasal boyama resimleri

%1	CD133	Oct4	Sox2	VEGF
CD133+				
CD133-				
OKKH				

Tablo 4.4: Normoksik şartlar altında 2B olarak inkübe edilen hücre gruplarının immünohistokimyasal boyama resimleri

%21	CD133	Oct4	Sox2	VEGF
CD133+				

CD133-				
OKKH				

İmmünohistokimyasal analiz sonucunda , %1 oksijen seviyesinde inkübe edilen CD133+ grubunda CD133 ve OCT 4 immünoaktivitelerinin zayıf şiddette pozitif olduğu, VEGF immünoaktivitesinin ise zayıf yer yer bazı hücrelerde ise orta şiddette pozitif olduğu gözlenmiştir. SOX2 immünoaktivitesinin az hücrede zayıf şiddette pozitif olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3). %21 oksijen seviyesinde Cd133+ grupta CD133, OCT4 ve VEGF immünoaktivitelerinin zayıf boyanma gösterir iken, SOX2 immünoaktivitesinin negatif olduğu izlendi (Tablo 4.4).

CD133- grubun %1 ve %21 oksijenli ortamda inkübasyonu sonucunda %1'lik grupta CD133 ve OCT 4 immünoaktivitelerinin çok zayıf olduğu gözlenir iken, VEGF immünoaktivitesinin orta şiddette pozitif olduğu ve sitoplazmik boyanmanın olduğu izlendi. SOX2 immünoaktivitesi ise negatiftir (Tablo 4.3). %21'lik grupta ise CD133 ve SOX2 immünoaktivitelerinin negatif, OCT4 boyanmasının ise zayıf şiddette iken, VEGF immünoaktivitesinin zayıf fakat yer yer orta şiddette olduğu gözlemlendi (Tablo 5). OKHH grubunda ise %1 oksijenli ortamda CD133, OCT4, SOX2 ve VEGF boyanmalarının orta şiddette olduğu saptandı (Tablo 4.3). %21'lik grupta ise 4 antikora ait immünoaktivitelerin pozitif olduğu fakat %1'lik gruba nazaran daha az olduğu izlendi (Tablo 4.4).

2B %1 ve %21'lik gruplarda boyanmalar karşılaştırıldığında tüm gruplara CD133, OCT4 ve VEGF boyanmalarının %1'lik grupta %21'lik gruba nazaran daha

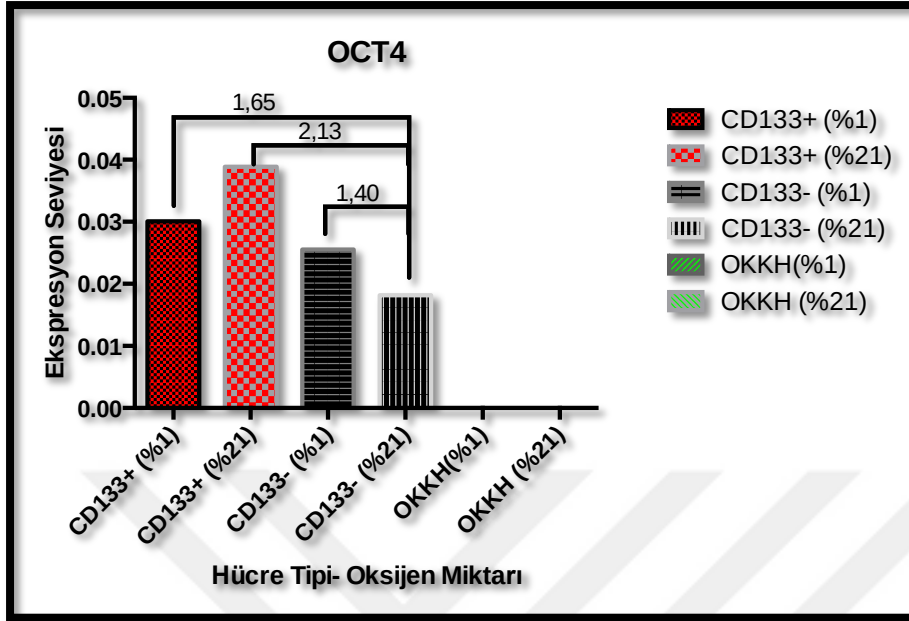
fazla olduğu gözlenir iken, SOX2 boyanmalarının sadece OKKH grubunda olduğu saptandı. CD133+, CD133- ve OKKH grupları arasında %1 ve %21’lik ortamlardaki CD133, OCT4, SOX2 ve VEGF boyamaları karşılaştırıldığında OKKH grubunda hem %1 hem de %21’lik ortamda daha fazla pozitiflik olduğu saptandı. Özellikle SOX2 immünoreaktivitesinin OKKH grubunda sadece pozitif olduğu izlendi.

4.9. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür Kantitatif PCR Analizi

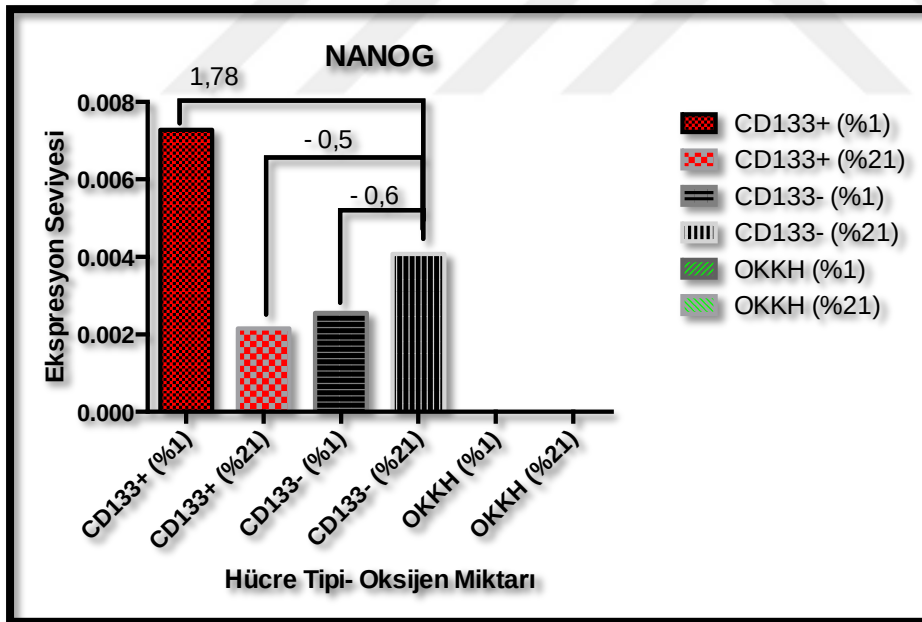
SaOs-2 hücre hattından MACS tekniğı ile izole edilen CD133+ ve CD133- hücrelere ve OKKH hücre hattına hipoksinin etkisinin incelenmesi ve oksijen seviyesinin kanser kök hücre karakterine etkisinin saptanması amacı ile kantitatif PCR analizi yapılmıştır. Pluripotensi genlerinden OCT4, Sox2 ve Nanog genleri kullanılırken, hipoksinin kanser kök hücrelerine etkisinin anlaşılabilmesi ve daha geniş bir çerçevede değerlendirilebilmesi amacı ile de HIF1alfa ve HIF2alfa gen ekspresyonları da kantitatif PCR tekniğı ile incelenmiştir.

OCT4 ekspresyonu Şekil 4.8’de, Nanog ekspresyonu Şekil 4.9’da, SOX2 ekspresyonu Şekil 4.10’da, hipoksi indüklenebilir faktör genlerinden HIF1alfa şekil 4.11’de, HIF2alfa ise Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

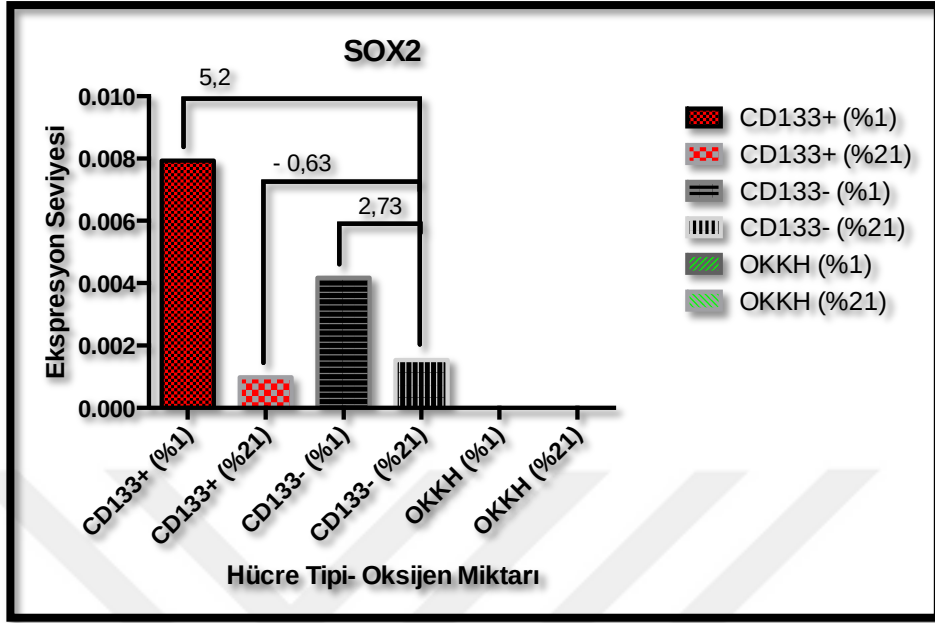
Kantitatif PCR sonuçlarına baktığımız zaman genel olarak CD133+ hücre grubunun hipoksik şartlarda kök hücre karakterini koruduğı gözlemlenirken, bazı pluripotensi genleri için aynı hücre gruplarında dalgalanmalar gözlemlenmektedir. HIF1alfa geni ise daha çok CD133- grupta eksprese edilirken, HIF2alfa geni ise CD133+ grupta eksprese edilmiştir. OKKH hücre grubunda ise kantitatif PCR sonuçları elde edilememiştir.



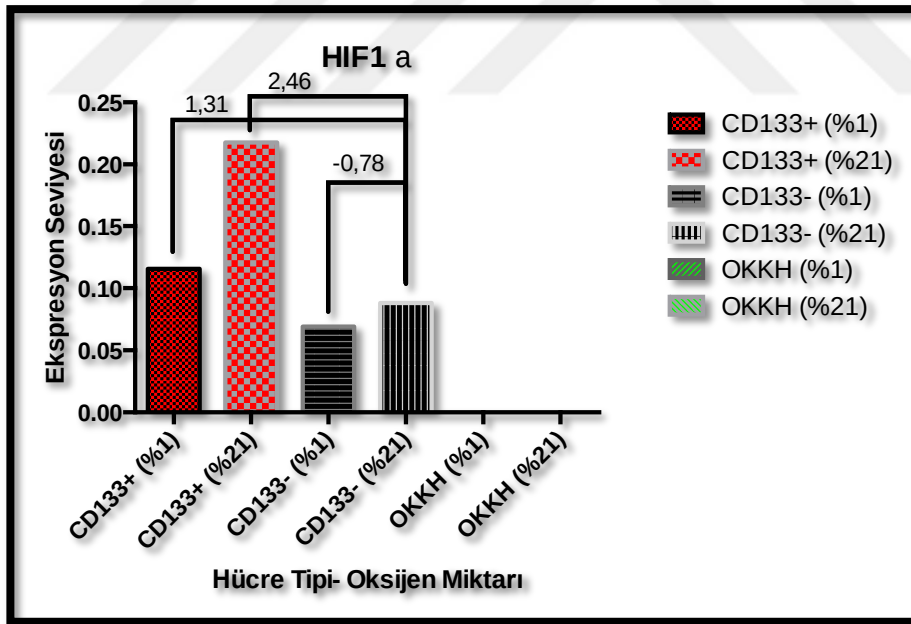
Şekil 4.8: 2B kantitatif PCR OCT4 ekspresyonu



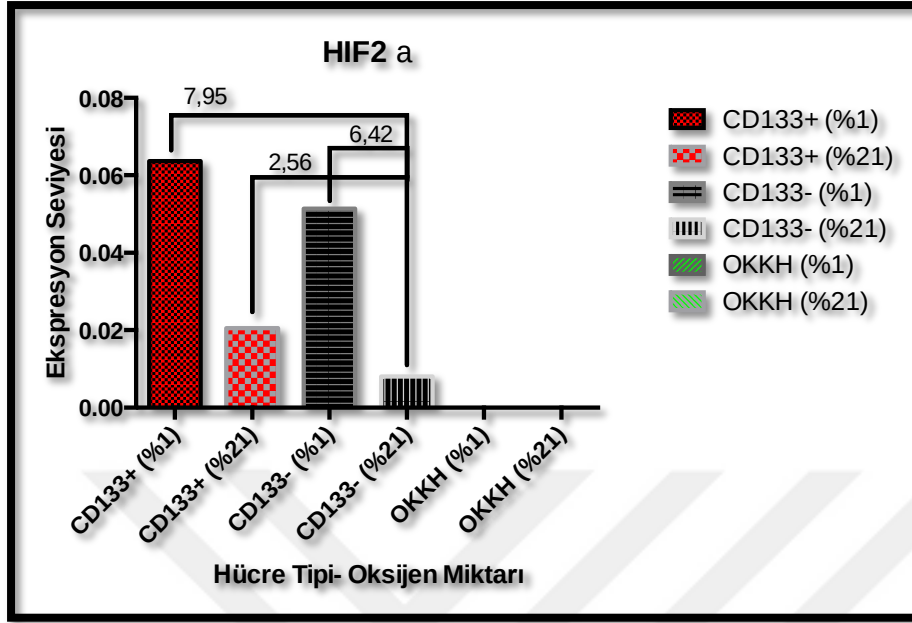
Şekil 4.9: 2B kültür kantitatif PCR NANOG ekspresyonu



Şekil 4.10: 2B kültür kantitatif PCR SOX2 ekspresyonu



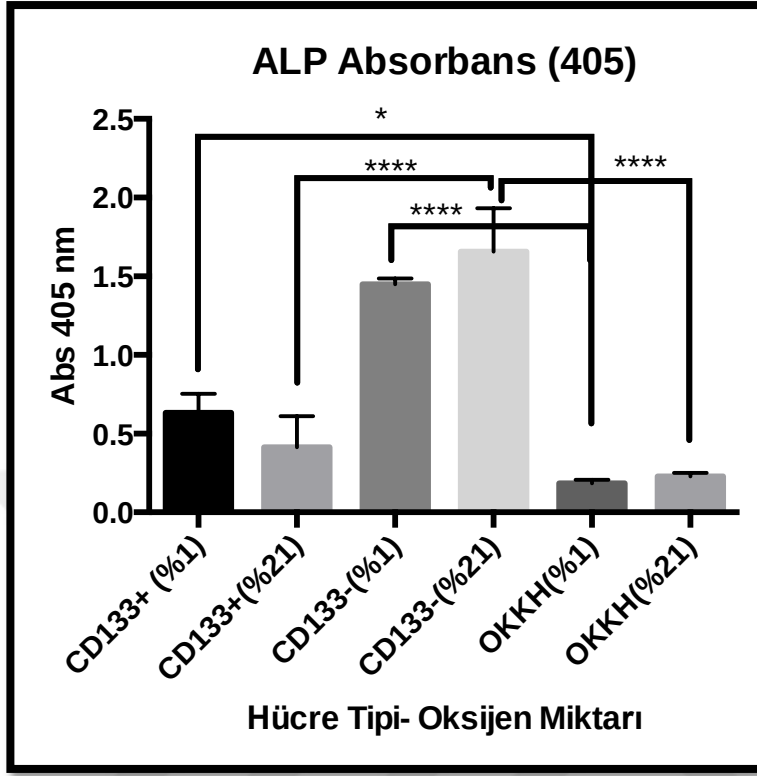
Şekil 4.11: 2B kantitatif PCR HIF1-alfa ekspresyonu



Şekil 4.12: 2B kantitatif PCR HIF2-alfa ekspresyonu

4.10. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 2 Boyutlu Kültür Alkalen Fosfataz Aktivitesi Analizi

ALP aktivitesinin farklı oksijen seviyelerinde kanser kök hücrelerinin farklılaşma karakterine olan etkisini belirlemek amacı ile yapılan ALP aktivitesinin grafiği Şekil 4.13’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13: 2B ALP aktivite grafiği

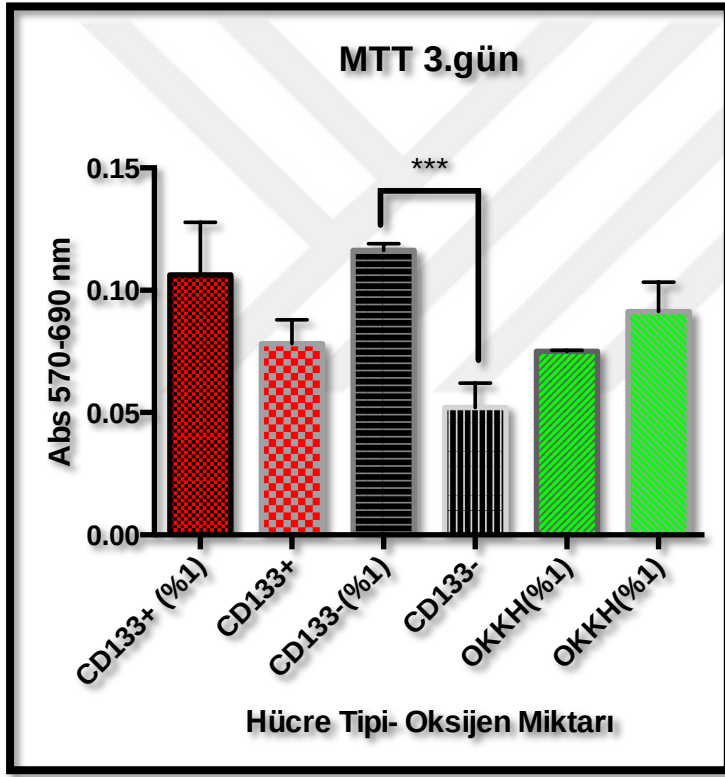
Hücrelerin Şekil 4.13’de verilen 2B ALP aktivitesine baktığımız zaman, tek bir hücre tipinin farklı oksijen seviyelerinde ALP aktivitesinin belirgin bir şekilde değişmediği ancak hücre tiplerinin ALP aktivitelerinin birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir. CD133+ hücreler yani kanser kök hücresi olarak ayrılan hücrelerin ALP aktivitesi, CD133- yani kanser hücrelerine göre belirgin bir şekilde farklılık göstermektedir. Özellikle CD133- hücrelerinin ALP aktivitelerinin yüksek olduğu gösterirken, CD133+ hücreleri CD133- hücrelere göre daha az ALP aktivitesine sahiptirler.. OKKH hücre hattı ise ALP aktivitesinin en düşük olduğu hücre tipidir.

4.11. Hipoksik ve Normoksik Şartlar altında 3 Boyutlu Kültür MTT Analizi

Hücrelerin 3B olarak, 2B kültürden farklı olarak oksijen seviyelerinin hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi ve bakteriyel selüloz doku iskelesinin de hücre canlılığına etkisinin tespit edilebilmesi amacıyla yapılan MTT analizinin 3 ve 7 gün

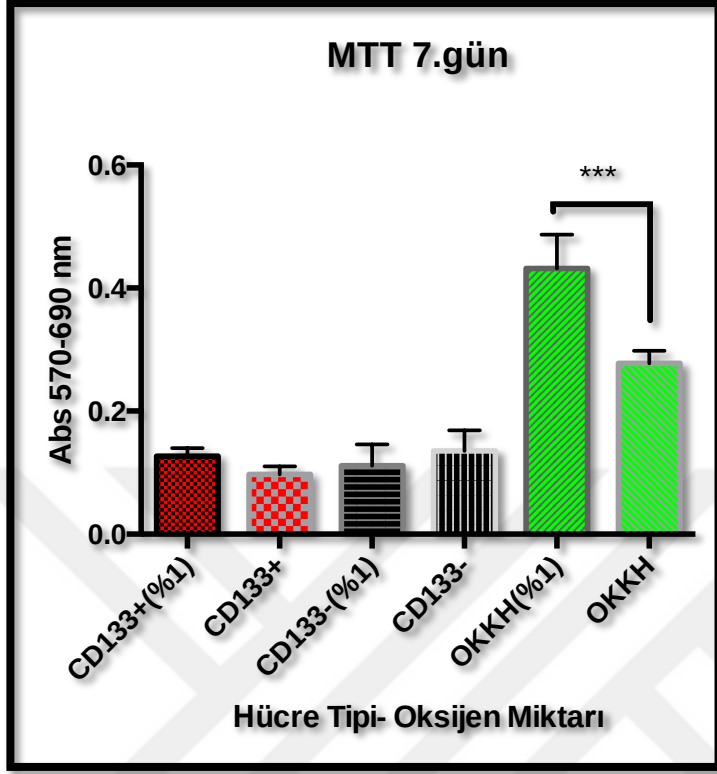
sonuçları Şekil 4.14’de ve Şekil 4.15’de gösterilmiştir.

3B kültür MTT analizi 3. gün sonuçlarına baktığımızda hem hücre tipleri arasında hem de oksijen seviyeleri arasında bir farklılık olduğu gösterilmektedir. Bu farklılık CD133- hücrelerinde gözlemlenmekle beraber hücrelerin %1 oksijen seviyesi altında %21 oksijen seviyesine göre bakteriyel selüloz doku iskelesi üzerinde daha yüksek canlılık oranı gösterdikleri görülürken, %1 oksijen seviyesinde OKKH hücreleri en düşük hücre canlılığını gösteren hücre grubudur.



Şekil 4.14: Hücrelerin 3B 3. gün MTT analizi

7.gün sonuçlarında ise hem hücre grupları arasında hem de oksijen seviyeleri arasında farklılık görülmektedir. OKKH hücreleri 3.gün MTT sonuçlarında %1 oksijen seviyesinde en düşük canlılığı gösterirken, 7.günde hipoksi şartlarında en yüksek canlılık oranına sahip hücre grubu olduğu gösterilmiştir. Diğer hücre grupları arasında belirgin hücre canlılığı değişimleri gösterilmezken, OKKH hipoksik ve normoksik şartlar altında da belirgin bir fark bulunmaktadır.

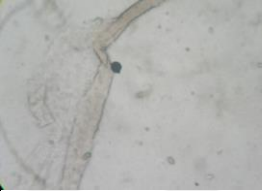
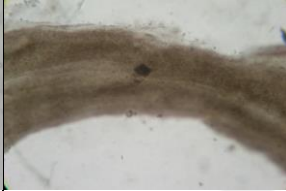
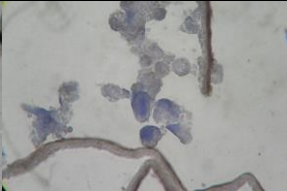


Şekil 4.15: Hücrelerin 3B 7. gün MTT analizi

4.12. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültür İmmünohistokimyasal Analizleri

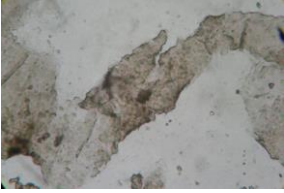
CD133+, CD133- ve OKKH hücre hatları hipoksik ve normoksik şartlar altında 3 günlük inkübasyon süresinin sonunda immünohistokimyasal boyama ile analiz edildi. Analizde, anti-CD133, Oct-4 ve anti-Sox-2 ve anti-VEGF antikorları kullanıldı. Boyama sonuçları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’de verilmiştir.

Tablo 4.5: Hipoksik şartlar altında 3B olarak inkübe edilen hücrelerin immünohistokimyasal boyama resimleri

%1	CD133	Oct4	VEGF
CD133+			
CD133-			
OKKH			

Tablo 4.6: Normoksik şartlar altında 3B olarak inkübe edilen hücrelerin immünohistokimyasal boyama resimleri

%21	CD133	Oct4	VEGF
CD133+	YOK	YOK	

CD133-			YOK
OKKH			

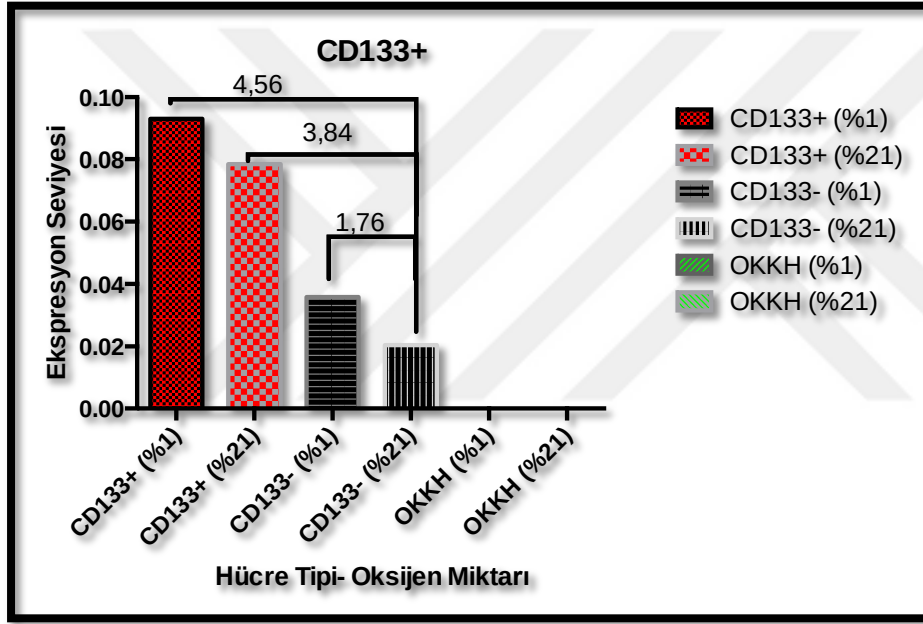
3B gruplarda yapılan analiz sonucunda membranın çok ince olmasından dolayı doku kayıpları olduğu, bununla beraber bazı kesitlerde ise hücrelerin olmadığı saptandı. Hücrelerin ve mikroyapının olduğu kesitlerde ise, 2B gruplara benzer olarak OKKH gruplarında boyanmaların daha iyi olduğu görülmüştür. OKKH %1 grupta Oct4 ve VEGF boyanmaları pozitif iken, diğer boyanmalarda OKKH %1 grubu ile benzer olarak saptandı. CD133 + ve CD133- gruplarda ise, %1'lik grupta CD133, OCT4 ve VEGF boyanmalarının pozitif olduğu, CD133- grubunda ise boyanmaların negatif olduğu gözlemlendi. %21'lik grupta membran ve hücre kaybından dolayı bakteriyel selüloz doku iskelesi üzerindeki hücreler çok az olduğundan boyanmalar negatif çıkmıştır. SOX2 boyamalarının yapıldığı gruplarda ise hücre bulunmamasından dolayı sonuç alınamamıştır.

4.13. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültür Kantitatif PCR Analizi

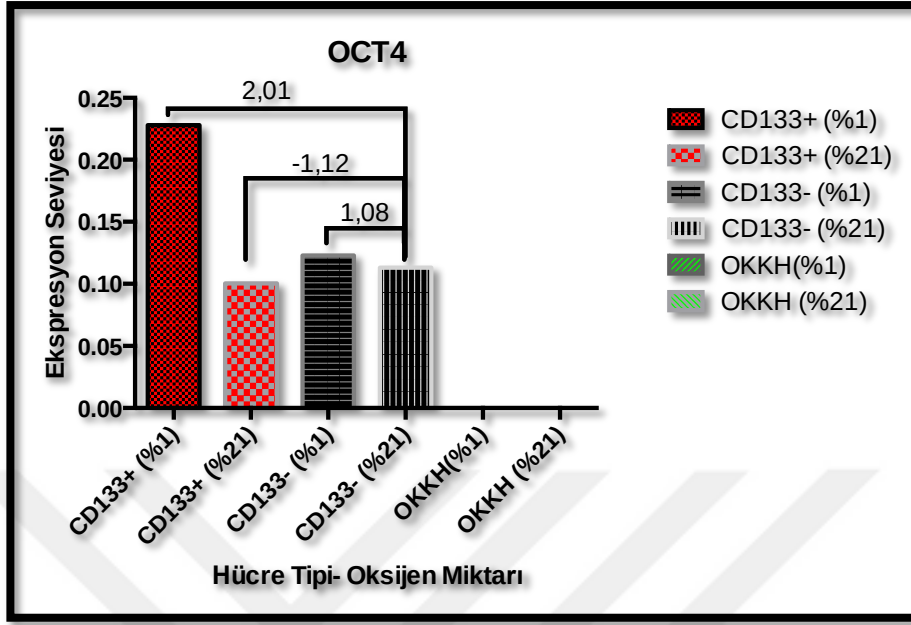
CD133+, CD133- ve OKKH hücreleri bakteriyel selüloz doku iskelesine ekildikten sonra hipoksik ve normoksik şartlar altında inkübe edilmiş ve 3 boyutlu doku iskelesi üzerindeki kanser kök hücre karakterizasyonun belirlenmesi amacı ile pluripotensi genlerinden OCT4, Nanog, Sox2 gen ekspresyonları kantitatif PCR tekniği ile analiz edilmiştir. Hipoksi indüklenebilir faktörlerin de kanser kök hücre

karakterizasyonu etkisinin incelenmesi amacı ile de HIF1-alfa ve HIF2-alfa genlerinin ekspresyonu da incelenmiştir. Bu amaçla $\square @ b s m q d e d q n r f d m n k q j j t k k m \hat{A}$ tır. Örneklerin ekspresyon seviyeleri normoksik şartlarda inkübe edilmiş olan CD133- hücrelere göre oranlanmıştır.

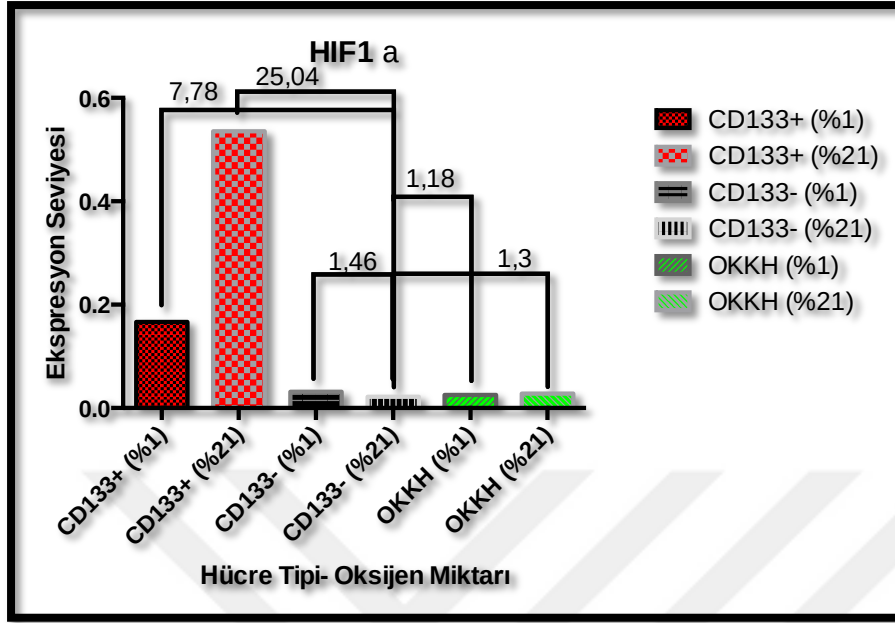
Kantitatif PCR için elde edilen sonuçlar farklı grafikler halinde Şekil 4.16- 4.17- 4.18- 4.19- 4.20- 4.21’de gösterilmiştir.



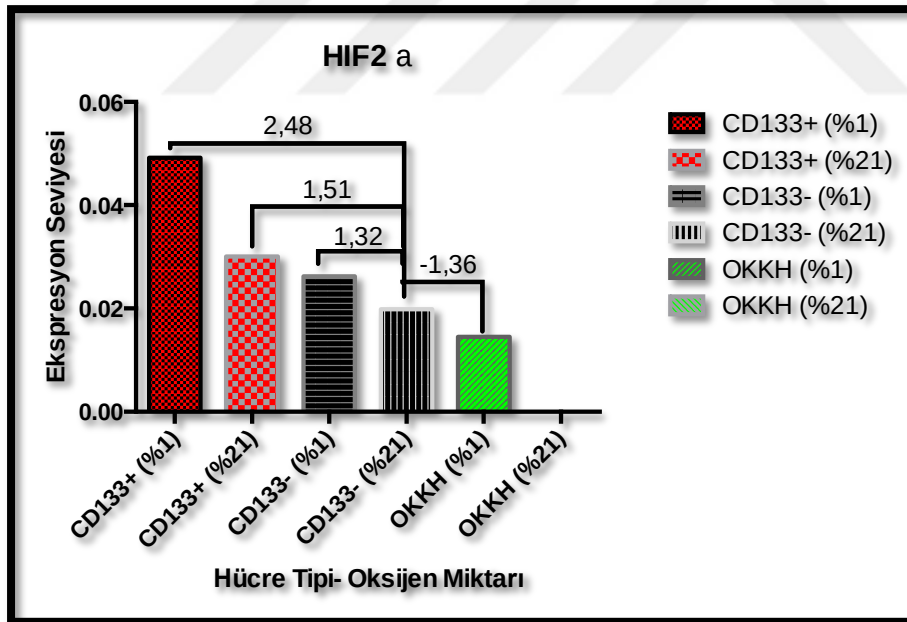
Şekil 4.16: Kantitatif PCR CD133+ ekspresyonu



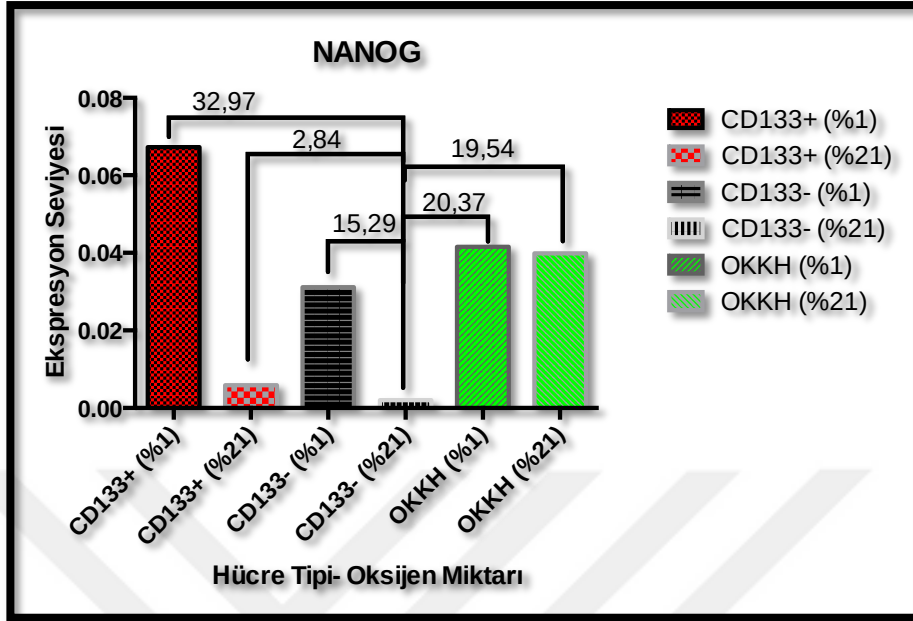
Şekil 4.17: Kantitatif PCR OCT4 ekspresyonu



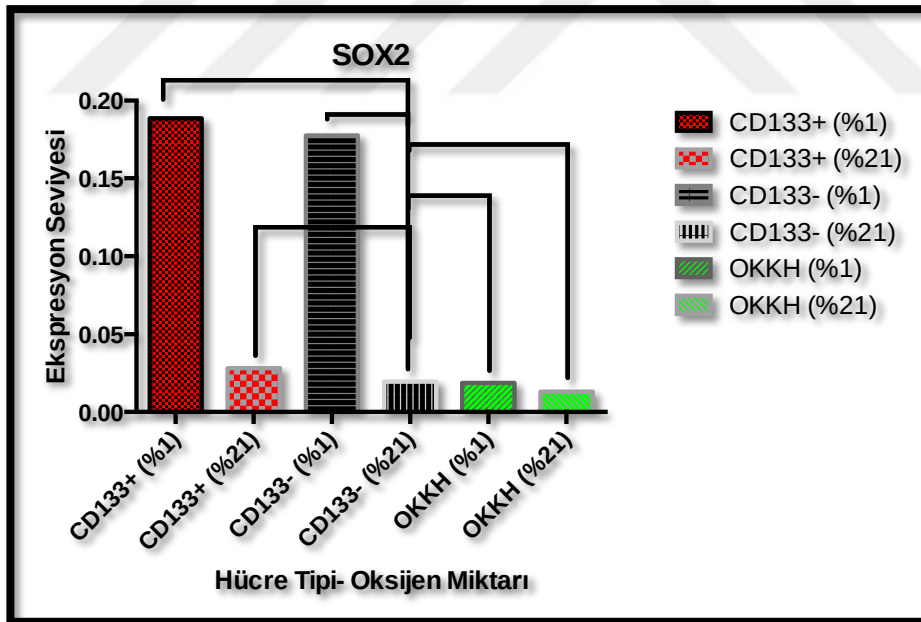
Şekil 4.18: Kantitatif PCR HIF1- Alfa ekspresyonu



Şekil 4.19: Kantitatif PCR HIF2- Alfa ekspresyonu



Şekil 4.20: Kantitatif PCR NANOG ekspresyonu



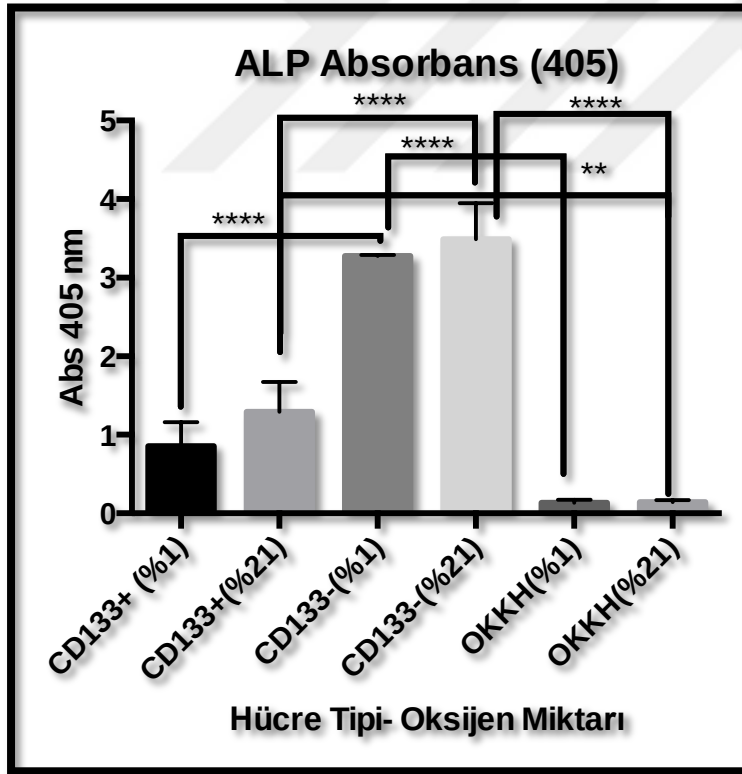
Şekil 4.21: Kantitatif PCR SOX2 ekspresyonu

Gen ekspresyon seviyelerine bakıldığı zaman, pluripotensi genlerinin, 3B örneklerde en çok hipoksik şartlarda inkübe edilmiş olan CD133+ hücrelerde görüldüğünü göstermektedir. Ancak CD133+ hücreleri takiben yine aynı şekilde

pluripotensi genleri hipoksik şartlarda inkübe edilmiş olan CD133- hücrelerde görülmektedir. Bu grupları takiben normoksik şartlarda inkübe edilmiş CD133+ ve CD133- hücreleri gelirken, OKKH hücre grubu ise bazı genlerde ekspresyon gösterirken bazılarında göstermemiş bu nedenle tam olarak yorumlanmamıştır.

4.14. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültür Alkalen Fosfataz Aktivitesi Analizi

ALP aktivitesinin farklı oksijen seviyelerinde kanser kök hücrelerinin farklılaşma karakterine olan etkisini belirlemek amacı ile yapılan ALP aktivitesinin grafiği Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

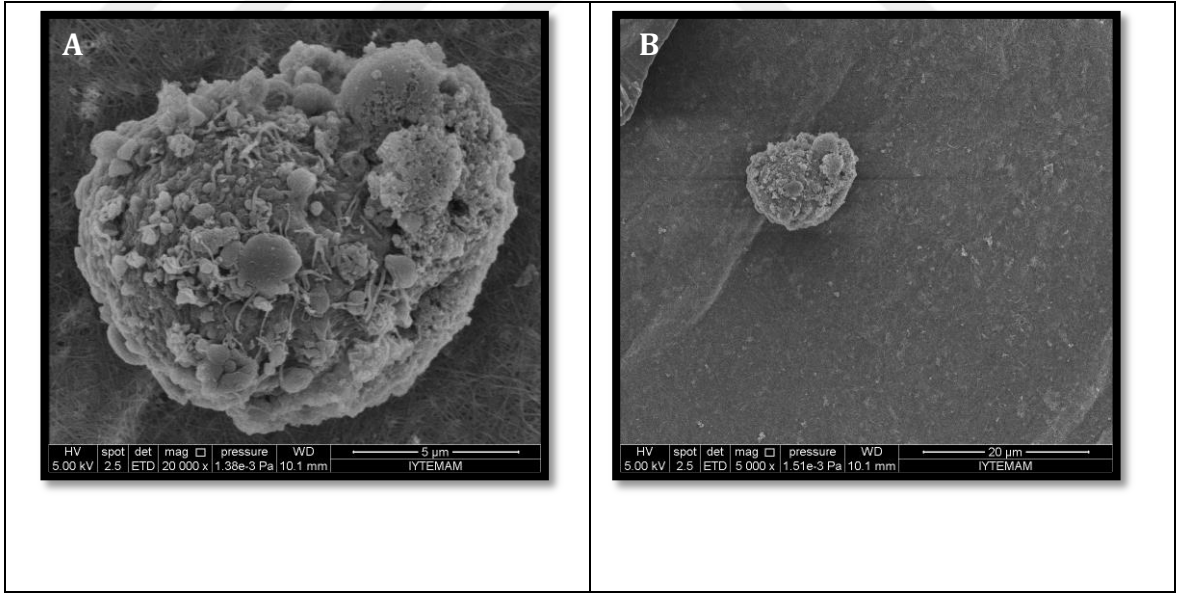


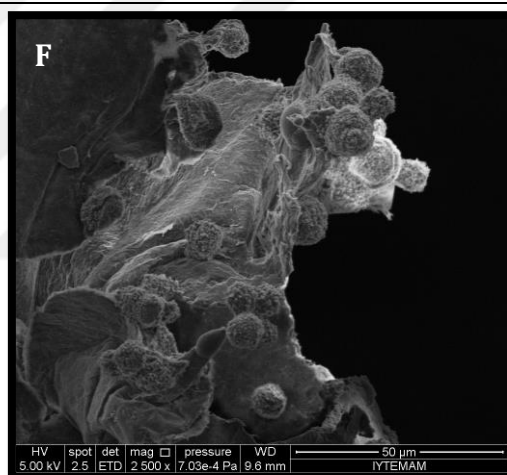
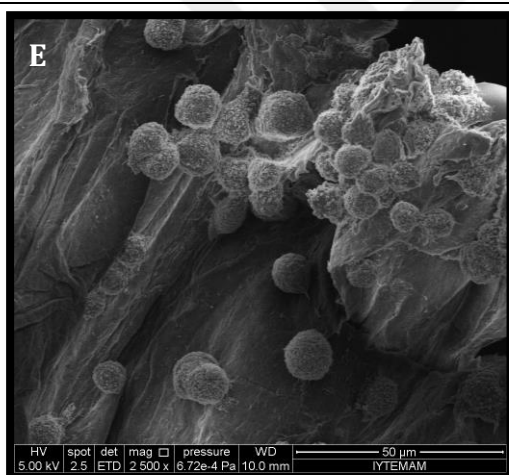
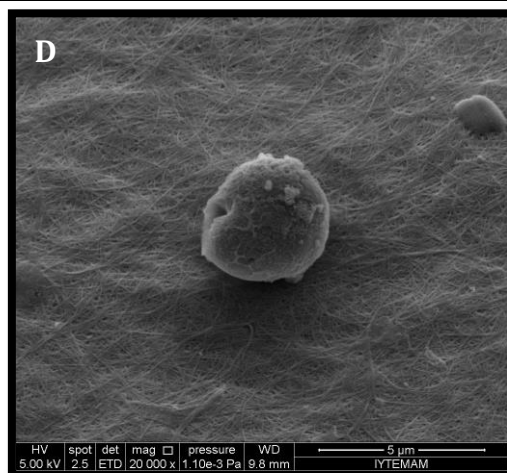
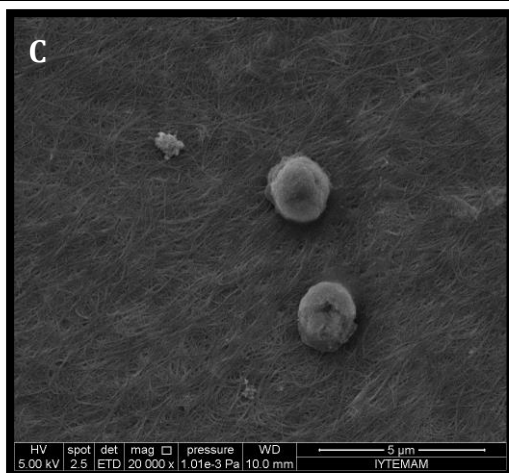
Şekil 4.22: 3B ALP aktivite grafiği

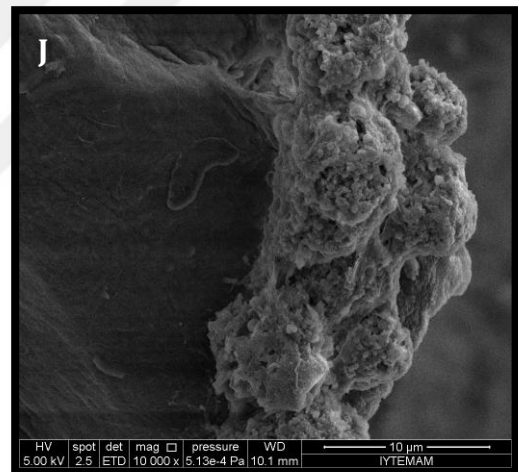
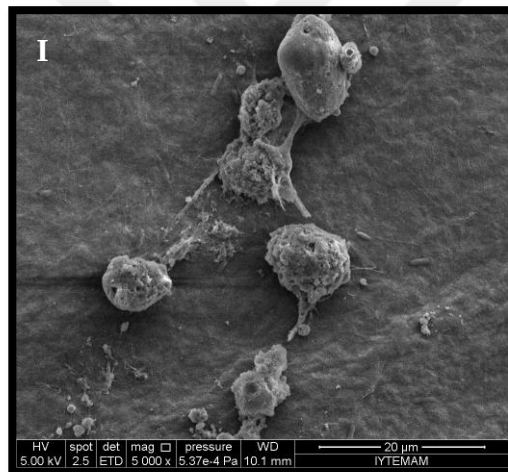
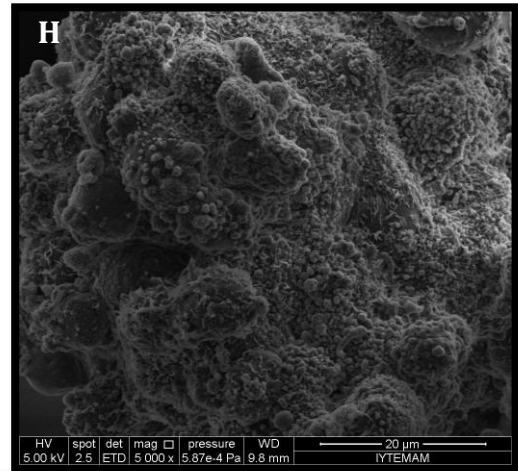
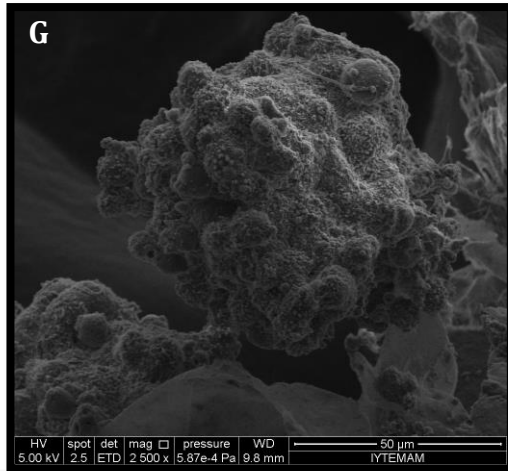
3B ALP aktivitesine baktığımız zaman, 2B örnekler ile aynı şekilde tek bir hücre tipinin farklı oksijen seviyelerinde ALP aktivitesinin belirgin bir şekilde değişmediği ancak hücre tiplerinin ALP aktivitelerinin birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir.

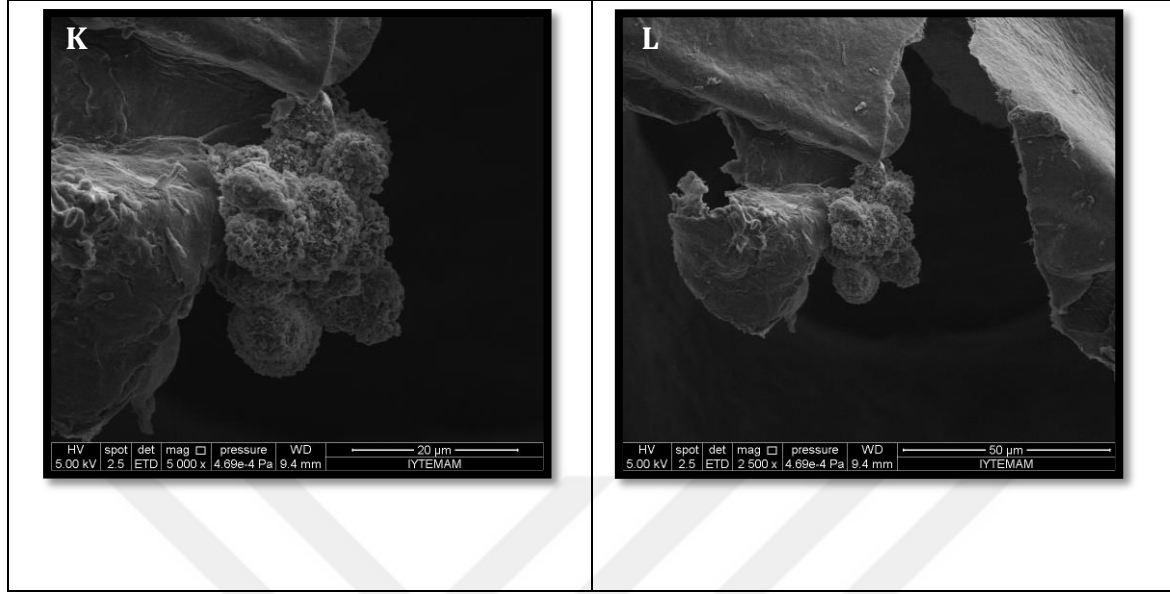
4.15. Hipoksik ve Normoksik Şartlar Altında 3 Boyutlu Kültürlerin Taramalı Elektron Mikroskop Görüntü Analizi

Hücrelerin yüzeyler üzerindeki tutunma özelliklerinin ve morfolojilerinin detaylı olarak incelenebilmesi için SEM yapıldı. SEM analizleri sonucunda özellikle hipoksik şartlar altında CD133+ ve CD133- hücre gruplarında BS doku iskelesi üzerinde yıkanma sonucu hücre kaybı olduğu gözlemlenmiştir. Normoksik şartlarda inkübe edilen hücre gruplarında ise hücrelerin tümör benzeri yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir.









Şekil 4.23: Hücrelerin SEM görüntüleri. %1 O₂ CD133+, A ve B; %1 O₂ CD133-, C ve D; %1 O₂ OKKH, E ve F; %21 O₂ CD133+; G ve H; %21 O₂ CD133-, I ve J, %21 O₂ OKKH, K ve L.

5. TARTIŞMA

Kanser kök hücreleri, kanserin tedavi direnci göstermesinde önemli bir neden olarak görülmektedir. Kanser kök hücrelerinin, kanser tedavilerinde hedeflenmesi ile, özellikle radyo ve kemoterapi direncinin kırılabileceği öngörülmektedir (108). Kanser ve kanser kök hücrelerinin tedaviye gösterdikleri bu direncin ana nedeni olarak ise kanser hücrelerinin ve kanser kök hücrelerin mikro çevrelerinin hipoksik olması görülmektedir (109).

Bu tez çalışmasında hipoksinin kanser kök hücrelerine etkisinin araştırılması amacıyla öncelikle SaOs-2 osteosarkoma hücre hattından MACS tekniği ile kanser kök hücreleri izole edilmiştir. MACS izolasyonu üç defa tekrar edilmiş ve yaklaşık olarak %0,82-3 oranında KKH'leri izole edilmiştir. SaOs-2 hattının CD133+ KKH'leri %5.5±1.8 oranında içerdiği Tirino ve arkadaşları tarafından da belirtilmiştir (110). Elde edilen izolasyon sonuçları bu anlamda literatürdeki başarıyı yakalamıştır. CD133+ KKH'lerinin izolasyon sonucu elde edilme oranı hücre kaynağına da bağlı olabilirken, ayırım sırasındaki fiziksel şartlara da bağlı olabilir. Kolonda tutulma, hücrelerin yıkanması, tripsinizasyon tekniklerine bağlı olarak hücre kaybı da yaşanmaktadır. SaOs-2 hücre hattından MACS yöntemi ile izole edilen kanser kök hücre oranı, SaOs-2 hücre hattının içermesi beklenen kanser kök hücre oranına paralellik göstermektedir; dolayısıyla MACS tekniği ile yapılan ayırımlar başarılı olarak gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvarda yaptığımız ayırımlara kontrol olarak kullanılmak üzere ticari olarak satın alınan OKKH hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücreler de ayırım sonucu elde edilen hücreler ile aynı analizlerle incelenmiştir.

Elde edilen hücrelerin hipoksik koşullar altında canlılığı MTT analizi ile incelenmiştir. Öncelikle MTT analizinin yapılmasının nedeni, hücrelerin canlılığını kontrol; etmek buna bağlı olarak da diğer analizlerin sağlıklı bir biçimde gerçekleştirilmesidir. Hücreler ait oldukları organa veya dokuya bağlı olarak hücre canlılığında farklı oranlar gösterebilirler. Sonuçlar incelendiği zaman, 2B kültürde 3. gün sonunda test edilen bütün hücre gruplarında %1 hipoksi şartlarının hücrelerin canlılığını etkilemediği görülmüştür. 7. gün sonuçları analiz edildiğinde, tüm hücre tiplerinin 3. güne göre hücre canlılıklarının arttığı görülmüştür; ancak OKKH hücre

hattında %21 oksijen seviyesinde çok yüksek bir artış gözlenmiştir. Bu nedenle literatürde daha önce hiç kullanılmamış olan OKKH hücre hattının 7. gün yüksek hücre canlılığı göstermesinden dolayı deney sonuçlarında sapma olmaması için deney süresi 3 gün olarak belirlenmiştir.

3B kültürde ise, MTT analizi 3. gün sonuçlarına baktığımızda 2B kültür sonuçlarının aksine hücre tiplerinin davranışları farklılık göstermiştir. CD133- hücreler ve OKKH için oksijen seviyesi canlılık oranında fark yaratmazken CD133+ kanser kök hücreleri 3B kültürde hipoksik ortamda normoksik ortama göre belirli düzeyde ($p<0.05$) yüksek canlılık göstermiştir. 2B kültürde en yüksek canlılık oranını gösteren OKKH hücreleri ise, %1 oksijen seviyesinde en düşük hücre canlılığını gösteren hücre grubudur ($p<0.05$). 7.gün sonuçları analiz edildiğinde ise OKKH hücreleri 3.gün sonuçlarının aksine 7.günde 3B ortamda hipoksik koşullarda normoksik ortama göre daha yüksek hücre canlılığı göstermiştir. Özellikle hücrelerin hipoksik şartlar altında inkübe edilmesinin hücre canlılığına etki etmemesi, aksine kanser kök hücre gruplarının 3B ortamda hipoksik şartlarda daha yüksek hücre canlılığı göstermesi önemli bir bulgudur. Özellikle kanser hücrelerinin hipoksik şartlara dayanıklı hücreler olması ve hipoksik ortamları tercih ettiği literatürde Höckel ve Vaupel tarafından gösterilmiştir (111). Bizim bulgularımız, kanser hücrelerinden çok kanser kök hücrelerinin hipoksiye daha güçlü yanıt verdiğini göstermektedir.

Hücrelerin immünohistokimyasal analizleri incelendiğinde 3B örneklerde, kesitler alındıktan sonra boyama işlemleri sırasında hücrelerin yıkandığı görülmüştür. Hücrelerin yüzeye çok sıkı tutunmaması ve birbiri üzerine tutunma eğilimde olması daha kolay kopmalarına ve yıkanmalar sırasında yüzeyden ayrılarak hücre kaybı görülmesine neden olmuştur. Bunun nedeni olarak hücrelerin %2,5 serum ile kültive edilmeleri gösterilebilir. FBS hücrelerin yüzeylere tutunması, canlılıklarını devam ettirmesi ve çoğalması için gerekli olan bileşenleri içermekle beraber, içeriği nedeni ile hücrelerin morfolojisini ve farklılaşmasını da etkileyebilmektedir. Yüksek serum varlığında kök hücrelerinin farklılaşma eğiliminde olduğu ve kanser kök hücrelerinin kanser hücrelerine dönüşmesi ihtimali sebebiyle bu çalışmada kullanılan besi ortamının serum içeriği %2,5 olarak kullanılmıştır (112). Bu nedenle 3B immünohistokimyasal boyama sonuçları değerlendirilememiştir.

2B immünohistokimyasal sonuçlar incelendiğinde ise CD133+, yani KKH olarak tanımlanan grubun hem %1 hem de %21 oksijen seviyesi altında CD133 , OCT4, VEGF immünoaktivitelerinin zayıf şiddette pozitif gözlemlendiği saptanmıştır. Bununla beraber CD133- grup ise %1'lik ortamda CD133, VEGF ve OCT4 aktivitelerini zayıf şiddette gösterir iken, CD133- %21'lik grupta CD133 ve SOX2 immünoaktiviteleri negatif olarak saptanmış, OCT4 ve VEGF aktiviteleri ise zayıf olarak gözlemlenmiştir. Satın alınan ticari OKKH hücre hattı ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında %1 oksijen seviyesinde CD133, VEGF ve pluripotensi boyamalarının pozitif olduğu ancak %21'lik gruba göre %1 oksijen seviyesinde bütün boyamaların daha belirgin olduğu görülmüştür. Özellikle sadece SOX2 geninin OKKH grubunda pozitif olması ise, diğer hücre gruplarının 2B kültürde kanser kök hücre özelliklerini yitirdiklerini göstermektedir. Basuro- Roy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da özellikle SOX-2 genini osteosarkoma hücre hattındaki osteojenik farklılaşma özelliği olmayan ve kanser kök hücre topluluğu olarak tanımlanan alt grupta daha çok eksprese edildiği ve osteosarkoma kanser kök hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir (113).

Kantitatif PCR sonuçları hipoksik ve normoksik şartlar altında hücrelerin 3 gün kültüre edilmesinden sonra incelenmiştir. 3B kültür sonuçları, CD133+ hücreler hipoksik şartlar altında negatif kontrol grubu olarak belirlenen %21 oksijen seviyesindeki CD133- hücrelere göre analiz edilmiştir. Hipoksik şartlar altında CD133+ hücrelerin CD133, OCT4, SOX2 ve Nanog ekspresyonlarının yüksek olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki bilgilerle uyuşan bu sonuçların yanı sıra hipoksik şartlardaki CD133- hücrelerinde normoksik şartlardakine göre kök hücre genlerinin daha yüksek eksprese edildiği görülmüştür (75). Bunun nedeni olarak da hipoksik şartlar altında KKH'lerinin karakterleri korunurken ve farklılaşmaması sağlanırken, CD133-, yani kök hücre olmayan hücre grubunun, kök hücrelere dönüşüm gösterdiği düşünülebilir. Bu hipotez 3B immunohistokimyasal boyamaların eksikliği sebebiyle desteklenememiştir; ancak literatürde bu ihtimalin varlığı üzerine çok yeni bazı çalışmalar bulunmaktadır (114). Kantitatif PCR sonuçlarımız, kanser kök hücre karakteri taşımayan hücrelerin hipoksik şartlar altında kök hücre özelliklerini kazanabilecekleri hipotezini destekler niteliktedir.

Hipoksi indüklenabilir faktörlerin (HIF) gen ekspresyonları incelendiğinde, daha çok kanserleşme ile ilişkilendirilen HIF1alfa geninin KKH'lerinin farklılaşması sonucu ekspresyon seviyesinde artış görülürken, genellikle kanser kök hücreleriyle ilişkilendirilen HIF2alfa geninin bizim çalışmamızda da KKH karakteristik genleri olan Sox2, Oct4 ve Nanog genleri ile doğru orantılı olarak eksprese edildiği gözlenmiştir (115, 116).

J'ns's'sle OBQ rnm b'k qA1A n'qndj k'q h'bm c'df'd'q'd'ne h'p'c'h'f'm'e'd l'rd d'j ro'q'd'r'x'n'm rnm b'larının genel olarak 3B n'qndj k'q h'kd o'q'k'k'k'j f'n'r's'd'q' d'e'h'f'h' a'd'k'q'd'm'l' h'r's'q' N'yd'k'k'j k'd' o'k' q'ons'd'm'r'h' f'd'n'k'q'd'm'm d'j ro'q'd'r'x'n'm'k' q'Â'e'`j'h' c'`k'f'`k'm'l' `k'q' a'h'p'h'q'd'q'h' h'kd t'x't'r'l' `l' `j's'c'Â'e' At'm't'm'n'd'e'd'm'h' n'k'q'j' 1A j't'k's't'q'd'q'm'j' `m'r'd'q' u'd'j' `m'r'd'q'j'n'j' g't'b'q'd'k'd'q'h' h'bm'f'd'q'd'f'e' uygun bir m'n'e'd'k'n'k'l' `c'Â'Â'n'k'q'j' f'n'r's'd'q'h'd'a'h'k'q' X'l' `c' u'd' B't'j' h'd'q' `m'm'Â'n' x'os'Â'Â'b' k'Â'l' `c' `c' `x'm'Â'r'd'j' h'kd 2A j't'k's't'q'd'q'm'j' `m'r'd'q'l' n'e'd'k'd'm'l' d'r'm'e'd'j' h'n'i'n'u'll' h'c'ej't' l' n'q'p'n'k'i'l'r'h'm's'j' k's'd'e'h'l' d'r'm'e'd' u'd' s't'l' n'q'd'q'q'd'j' h'd's'j' l'r'h'ut' q'f't'k'm'l' Â'tır (100).

Hücrelerin 2B ve 3B ALP aktivitesi incelendiğinde, kantitatif PCR sonuçları ile paralel sonuçlar elde edilmiştir. ALP aktivitesi bu tez çalışmasında hücrelerin farklılaşması ve kanserleşmesi sonucu kemik kanseri hücreleri olarak tanımlanması için kullanılmıştır (117).. ALP aktivitesine baktığımız zaman, hücre tipleri arasında ALP aktivitesinin belirgin olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. CD133- hücreler, yani kök hücre içermeyen kemik kanser hücreleri olarak tanımlanan hücreler en yüksek ALP aktivitesini gösterirken, CD133+ hücreleri daha az ALP aktivitesi göstermiştir. OKKH hücreleri de hem hipoksik hem de normoksik koşullarda düşük ALP aktivitesi göstermişlerdir. Kök hücre genlerini taşıyan hücre grupları, beklendiği gibi, kemik olgunlaşmasının belirteci olan ALP ekspresyonunu çok düşük seviyelerde göstermektedir.

3B olarak kanser kök hücrelerinin bakteriyel selüloz doku iskelesi üzerindeki morfolojilerini ve tutunmalarını görüntülemek amacıyla yapılan SEM analizi sonucunda da hücrelerin immünohistokimyasal prosedürde gerçekleşen hücrelerin yıkanması ve hücre kaybına uğranması gibi sorunlardan ötürü güvenilir sonuçlar elde edilememiştir. Hücreler daha çok birbirleri üzerine tutunmaya meyilli olduğu için elde edilen görüntülerde az miktarda hücreye rastlanmıştır.

3B kültürde karşılaşılan en büyük problem gözenek çaplarının yeteri kadar arttırılamaması nedeni ile hücrelerin tutunacağı alanın az olmasıdır. BS doku iskelesi içine girememesinden dolayı hücrelerin yeterince iyi tutunamaması da hücrelerin serbest olarak gözenek içerisinde sifer oluşturma yapısında olduklarını göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve sonuçları, hipoksinin kanser kök hücreleri üzerinde kök hücre karakterlerini devam ettirici bir mikro çevre olarak tanımlanabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalar %1 oksijen seviyesi ile gerçekleştirilmekle beraber, farklı hipoksik seviyelerin de denenmesi ileri çalışmalar için önerilmektedir. Böylece kanser kök hücrelerinin karakterlerini koruyabileceği minimum ve maksimum oksijen seviyeleri belirlenebilir ve bu da ilerideki çalışmalar için daha spesifik tedavilerin geliştirilmesini sağlayabilir.

Tez kapsamında kullanılan ticari OKKH kök hücre hattının özellikle gen ekspresyon seviyesinde izole edilen kanser kök hücreleri ile ve üreticinin verilerinden farklı özellikler göstermesi, ticari olarak satın alınan bu kanser kök hücre hattının yeni çalışmalarda kullanılmadan önce özenli olarak karakterizasyonunun yapılması gerektiğini göstermektedir.

Özetle; KKH'lerinin hipoksi varlığında kök hücre karakterlerini 3B kültür sistemlerinde, 2B sistemlere göre daha fazla korudukları belirlenmiştir. 2B örneklerde ise elde edilen bulgular, 2B kültür sisteminin kanser kök hücrelerinin kültivasyonuna uygun olmadığını göstermektedir.

3B kültürde karşılaşılan en büyük problem gözenek çaplarının yeteri kadar arttırılamaması nedeni ile hücrelerin tutunacağı alanın az olmasıdır. Kullanılacak doku iskelesinin gözenek çapının arttırılması durumunda bu problem asılabilir ve daha başarılı bir 3B hipoksik tümör modeli elde edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Marie-Egyptienne DT, Lohse I, Hill RP. Cancer stem cells, the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and radioresistance: potential role of hypoxia. *Cancer letters*. 2013;341(1):63-72.
2. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26(2):225-39.
3. Hill RP, Marie-Egyptienne DT, Hedley DW, editors. *Cancer stem cells, hypoxia and metastasis*. Seminars in radiation oncology; 2009: Elsevier.
4. Heddlestone J, Li Z, Lathia J, Bao S, Hjelmeland A, Rich J. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *British journal of cancer*. 2010;102(5):789-95.
5. Brunner TB, Kunz-Schughart LA, Grosse-Gehling P, Baumann M, editors. *Cancer stem cells as a predictive factor in radiotherapy*. Seminars in radiation oncology; 2012: Elsevier.
6. http://www.kokhucredernegi.org.tr/tur/kok_hucre/nedir.htm.
7. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(26):14720-5.
8. <http://www.bilim.org/kok-hucre-teknolojisi.html>. Available from: <http://www.bilim.org/kok-hucre-teknolojisi.html>.
9. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414(6859):98-104.
10. Hongbao M, Yan Y, Ma M. Totipotent of Stem Cell.
11. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*. 1981;292(5819):154-6.
12. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
13. Verfaillie C. Pluripotent stem cells. *Transfusion clinique et biologique*. 2009;16(2):65-9.

14. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2012;85(1):3-10.
15. <http://www.cellbiosciences.com/resources-stem-cell-info.php>. Available from: <http://www.cellbiosciences.com/resources-stem-cell-info.php>.
16. Nadig RR. Stem cell therapy–Hype or hope? A review. *Journal of conservative dentistry: JCD*. 2009;12(4):131.
17. Keller GM. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Current opinion in cell biology*. 1995;7(6):862-9.
18. Reubinoff BE, Pera MF, Fong C-Y, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*. 2000;18(4):399-404.
19. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*. 2003;33:245-54.
20. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary Surgery*. 2005;34(5):415-23.
21. Hima Bindu A. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. 2011.
22. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? *New England Journal of Medicine*. 2003;349(6):570-82.
23. Holmes D. Stem cell scientists share 2012 Nobel Prize for medicine. *The Lancet*. 2012;380(9850):1295.
24. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007;58:267-84.
25. Vermeulen L, Sprick M, Kemper K, Stassi G, Medema J. Cancer stem cells—old concepts, new insights. *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(6):947-58.
26. Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in cell biology*. 2005;15(9):494-501.
27. Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer treatment reviews*. 2012;38(5):515-39.

28. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research*. 2006;66(19):9339-44.
29. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011;469(7330):314-22.
30. Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C, editors. *Cancer stem cells in solid tumors. Seminars in cancer biology*; 2010: Elsevier.
31. Chen L, Xiao Z, Meng Y, Zhao Y, Han J, Su G, et al. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials*. 2012;33(5):1437-44.
32. Nikolova G, Strilic B, Lammert E. The vascular niche and its basement membrane. *Trends in cell biology*. 2007;17(1):19-25.
33. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature medicine*. 2009;15(9):1010-2.
34. Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer research*. 2006;66(9):4553-7.
35. Alenzi FQ, Bahkali AH. Stem cells: Biology and clinical potential. *African Journal of Biotechnology*. 2014;10(86):19929-40.
36. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132(4):598-611.
37. Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park G-S, Jang S-H, et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2009;15(18):2258.
38. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2006;445(7123):111-5.
39. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *nature*. 2004;432(7015):396-401.
40. Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, et al. Identification of Putative Stem Cell Markers, CD133 and CXCR4, in hTERT–Immortalized Primary Nonmalignant and Malignant Tumor-Derived Human Prostate Epithelial Cell Lines and in Prostate Cancer Specimens. *Cancer Research*. 2007;67(7):3153-61.

41. Mustafa T. Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücreleri. Türk Onkoloji Dergisi. 2009;24(1):42-7.
42. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. Journal of cellular and molecular medicine. 2009;13(8b):2236-52.
43. Foster R, Buckanovich RJ, Rueda BR. Ovarian cancer stem cells: working towards the root of stemness. Cancer letters. 2013;338(1):147-57.
44. release].
45. release].
46. Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. Nature Reviews Cancer. 2005;5(4):311-21.
47. Ebben JD, Treisman DM, Zorniak M, Kutty RG, Clark PA, Kuo JS. The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. Expert opinion on therapeutic targets. 2010;14(6):621-32.
48. Kim J-w, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. Cancer research. 2006;66(18):8927-30.
49. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956;123(3191):309-14.
50. Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwala Z, Chiles K, Feldser D, et al., editors. 'The metabolism of tumours': 70 years later. The Tumour Microenvironment: Causes and Consequences of Hypoxia and Acidity: Novartis Foundation Symposium 240; 2001: Wiley Online Library.
51. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Nature Reviews Cancer. 2011;11(2):85-95.
52. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. nature. 2001;414(6859):105-11.
53. Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. Biochemical and biophysical research communications. 2004;313(3):459-65.
54. . Available from:
<http://www.cancer.org/cancer/osteosarcoma/detailedguide/osteosarcoma-what-is-osteosarcoma>.

55. Mutsaers AJ, Walkley CR. Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone*. 2014;62:56-63.
56. Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma. *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*: Springer; 2010. p. 3-13.
57. Gill J, Ahluwalia MK, Geller D, Gorlick R. New targets and approaches in osteosarcoma. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;137(1):89-99.
58. Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M, Bacci G. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer treatment reviews*. 2006;32(6):423-36.
59. Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & development*. 2004;18(18):2183-94.
60. Csete M. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1049(1):1-8.
61. Malda J, Klein TJ, Upton Z. The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue engineering*. 2007;13(9):2153-62.
62. Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Current opinion in genetics & development*. 2007;17(1):71-7.
63. Kaelin Jr WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*. 2008;30(4):393-402.
64. LeBrasseur N. Hypoxic reaction to reactive oxygen. *The Journal of cell biology*. 2007;177(6):945a-a.
65. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(6):437-47.
66. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(6):393-410.
67. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(10):721-32.
68. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

69. Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brüne B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer letters*. 2006;237(1):10-21.
70. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 2007;129(3):465-72.
71. Yeung TM, Gandhi SC, Bodmer WF. Hypoxia and lineage specification of cell line-derived colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(11):4382-7.
72. Li Z, Rich JN. Hypoxia and hypoxia inducible factors in cancer stem cell maintenance. *Diverse Effects of Hypoxia on Tumor Progression*: Springer; 2010. p. 21-30.
73. Gordan JD, Bertout JA, Hu C-J, Diehl JA, Simon MC. HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer cell*. 2007;11(4):335-47.
74. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF- 1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *The EMBO journal*. 2004;23(9):1949-56.
75. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu C-J, et al. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development*. 2006;20(5):557-70.
76. Gilany K, Vafakhah M. Hypoxia: a review. *Journal of Paramedical Sciences*. 2010;1(2).
77. Kobayashi CI, Suda T. Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(2):421-30.
78. Yang Q-C, Zeng B-F, Dong Y, Shi Z-M, Jiang Z-M, Huang J. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in human osteosarcoma: correlation with clinicopathological parameters and survival outcome. *Japanese journal of clinical oncology*. 2007;37(2):127-34.
79. Knowles HJ, Schaefer K-L, Dirksen U, Athanasou NA. Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC cancer*. 2010;10(1):372.

80. Liu S-Y, Chang L-C, Pan L-F, Hung Y-J, Lee C-H, Shieh Y-S. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2008;44(3):277-85.
81. Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Pilar G-D, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. Hypoxia-inducible factors in OSCC. *Cancer letters*. 2011;313(1):1-8.
82. Siclari V, Guise T, Chirgwin J. Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006;25(4):621-33.
83. Warnecke C, Weidemann A, Volke M, Schietke R, Wu X, Knaup KX, et al. The specific contribution of hypoxia-inducible factor-2 α to hypoxic gene expression in vitro is limited and modulated by cell type-specific and exogenous factors. *Experimental cell research*. 2008;314(10):2016-27.
84. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell*. 2009;15(6):501.
85. Li J, Zhong X-Y, Li Z-Y, Cai JF, Zou L, Li JM, et al. CD133 expression in osteosarcoma and derivation of CD133+ cells. *Molecular medicine reports*. 2013;7(2):577-84.
86. Sachlos E, Czernuszka J. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2003;5(29):39-40.
87. Hutmacher DW, Sittering M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *TRENDS in Biotechnology*. 2004;22(7):354-62.
88. Lutolf M, Hubbell J. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature biotechnology*. 2005;23(1):47-55.
89. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(24):4353-64.

90. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I, editors. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in cancer biology*; 2005: Elsevier.
91. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annual review of cell and developmental biology*. 2006;22:287.
92. Fischbach C, Chen R, Matsumoto T, Schmelzle T, Brugge JS, Polverini PJ, et al. Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nature methods*. 2007;4(10):855-60.
93. Fischbach C, Kong HJ, Hsiong SX, Evangelista MB, Yuen W, Mooney DJ. Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(2):399-404.
94. Klemm D, Schumann D, Kramer F, Heßler N, Hornung M, Schmauder H-P, et al. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Polysaccharides II*: Springer; 2006. p. 49-96.
95. Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan D, Brittberg M, et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*. 2005;26(4):419-31.
96. Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2006;27(9):2141-9.
97. Petersen N, Gatenholm P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;91(5):1277-86.
98. Tang W, Jia S, Jia Y, Yang H. The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;26(1):125-31.
99. Szot CS, Buchanan CF, Gatenholm P, Rylander MN, Freeman JW. Investigation of cancer cell behavior on nanofibrous scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. 2011;31(1):37-42.
100. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130(4):601-10.

101. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):839-45.
102. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. 1988;240(4849):177-84.
103. Nyga A, Cheema U, Loizidou M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *Journal of cell communication and signaling*. 2011;5(3):239-48.
104. Leong DT, Ng KW. Probing the relevance of 3D cancer models in nanomedicine research. *Advanced drug delivery reviews*. 2014.
105. Kim JB, editor *Three-dimensional tissue culture models in cancer biology*. *Seminars in cancer biology*; 2005: Elsevier.
106. Alemany-Ribes M, Semino CE. Bioengineering 3D environments for cancer models. *Advanced drug delivery reviews*. 2014.
107. da Rocha E, Porto L, Rambo C. Nanotechnology meets 3D in vitro models: Tissue engineered tumors and cancer therapies. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;34:270-9.
108. Abdullah LN, Chow EK-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and translational medicine*. 2013;2(1):1-9.
109. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer treatment reviews*. 2003;29(4):297-307.
110. Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, De Francesco F, Pirozzi G, Galderisi U, et al. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PloS one*. 2008;3(10):e3469.
111. Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(4):266-76.
112. Lin S-P, Lee Y-T, Wang J-Y, Miller SA, Chiou S-H, Hung M-C, et al. Survival of cancer stem cells under hypoxia and serum depletion via decrease in PP2A activity and activation of p38-MAPKAPK2-Hsp27. *PloS one*. 2012;7(11):e49605.
113. Basu-Roy U, Basilico C, Mansukhani A. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer Lett*. 2012.

114. Bao B, Wang Z, Ali S, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, et al. Over- expression of FoxM1 leads to epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(9):2296-306.
115. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(4):S62-S7.
116. Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 α Brain. 2010;133(4):983-95.
117. Mohseny AB, Szuhai K, Romeo S, Buddingh EP, Briaire- de Bruijn I, de Jong D, et al. Osteosarcoma originates from mesenchymal stem cells in consequence of aneuploidization and genomic loss of Cdkn2. *The Journal of pathology*. 2009;219(3):294-305.

ÖZGEÇMİŞ

CANSU GÖRGÜN

Cnfum Tarihi: 19.07.1989

E-Posta: cansu.gorgun@gmail.com

GSM: (541) 855 2464

Dfıtım

- Eylül, 2012 – ... **Yüksek Lisans**; Dfd Ğnhudqhsdrh+R`čkĀ Alkh kdq Dmrsh~r~+ J Ğ G~bqd @malkh C`kĀC`kĀAnqmu`Hzmir
- Eylül, 2007 – Haziran, 2012- **Lisans**; Dfd Ğnhudqhsdrh+ Edm E`j~ksdrh+ Alxnj H x` @malkh C`kĀAnqmu`Hzmir

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- Toprak, A., **Görgün, C.**, Kuru, C. İ., Türkcan, C., Uygun, M., & Akgöl, S. (2014). Boronate affinity nanoparticles for RNA isolation. *Materials Science and Engineering: C*. Baskıda.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (proceedings) basılan bildiriler

- C. Çelik, **C. Görgün**, A. Sendemir Urkmez (2013), “Cell viability of keratinocytes on electrospun *Spirulina*/PCL composites”, 19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2013), Kasım 12-15, Aydın, Türkiye

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- A. Toprak, **C. Görgün**, C.I. Kuru, Y. Ozcan, S. Akgol, A. Denizli (2012), “RNA İzolasyonu İçin Nanobiyoteknolojik Bir Yaklaşım: Boronik Asit ile Modifiye Edilmiş Nanopolimerler”, Kromatografi Kongresi, Haziran 6 – 9, Tokat/ Türkiye

Projeler

- Ekim 2013- Nisan 2015- “ Hipoksinin Kanser Kök Hücrelerine Etkisinin İncelenmesi” Türkiye, Aliye Üster Vakfı tarafından desteklenmiştir. (Bilimsel araştırma proje desteği)

Stajlar

2011- Adana Adli Tıp Kurumu, Toksikoloji Bölümü (Zorunlu yaz stajı)

Katılınan Seminer ve Sempozyumlar

- “Crime Scene Investigation – CSI Course – Coimbra Üniversitesi, Portekiz, 25 Temmuz- 8 Ağustos, 2010. (Katılımcı)
- Squeeze Me, Stomp Me, Make Me Wine – Fermantasyon teknikleri kursu – Ege Üniversitesi, 19-26 Eylül, 2010. (Organizatör)
- Black gold: Drill for it... It ain't no trick to get rich quick!- Benzinlerin ticari, çevresel ve üretim açısından incelenmesi üzerine teknoloji kursu- Atina Ulusal Teknik Üniversitesi, 19-31 Temmuz, 2011. (Yardımcı organizatör)
- Presidents’ Meeting – Krakow, POLONYA, 11-17 Ekim, 2010, Board of European Students of Technology (BEST). (Ege Üniversitesi BEST delegesi)
- “Nanoteknoloji Sempozyumu”- Ege Üniversitesi, İzmir, 2010.
- General Assembly – Belgrade, SİRBİSTAN, 14-22 Nisan, 2011, Board of European Students of Technology (BEST). (Ege Üniversitesi BEST delegesi)

- Presidents' Meeting – Copenhagen, DANİMARKA, 8-14 Kasım, 2011, ,Board of European Students of Technology (BEST) (Danimarka Teknik Üniversitesi adına yardımcı organizatör)
- “Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar Sempozyumu”, Ege Üniversitesi, İzmir, 2011.
- Smaller than you think, more Functional than you imagine: Nanotechnology! – Nanoteknoloji uygulamaları hakkında teknoloji kursu – Ege Üniversitesi, 2-10 Eylül, 2012. (Organizatör)
- Presidents' Meeting – Timisoara, ROMANYA, 15-21 Kasım, 2012, Board of European Students of Technology (BEST), (Teknoloji Kursları Komitesi Uluslararası Delege)
- “4th Stem Cells Symposium” – Ege Üniversitesi, İzmir, 2012.
- “3rd Stem Cells Symposium” – Marmara Üniversitesi, İstanbul 2012.
- International Project Forum'12 – Ghent, BELÇİKA, 21-26 Şubat, 2013, Board of European Students of Technology (BEST), (Teknoloji Kursları Komitesi Uluslararası Delege)
- “Medical usage of biomaterials workshop” BIOMATEN, ODTÜ, Ankara, 19 Mart, 2013.
- External Event Committee Meeting'13- Ljubljana, SLOVENYA, 11-19 Ağustos, 2013, Board of European Students of Technology (BEST). (Teknoloji kursları komitesi, İnsan kaynakları koordinatörü)
- “Konfokal Mikroskop Çalıştayı,” Leica , Ankara, Türkiye, 21-22 Eylül, 2013.
- “International Symposium on Cancer Nanomedicine”, İzmir, Türkiye, 7-9 Kasım, 2013.
- “19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED)”, Kuşadası, Türkiye, 12-15 Kasım, 2013.
- “VIth International Bioengineering Congress (BEC)”, Kuşadası, Türkiye, 12-15 Kasım, 2013.

- External Event Committee Meeting'14- Barcelona, İspanya, 8-16 Şubat, Board of European Students of Technology (BEST). (Teknoloji kursları komitesi, İnsan kaynakları koordinatörü)

Organizasyon Komitesi Üyeliği

- “19th International Biomedical Science and Technology Symposium”
Organizasyon Komitesi, 12-15 Kasım, 2013, Kuşadası, Türkiye.

