

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KANSER KÖK HÜCRELERİNİN MİKRO DOKU
OLUŞUMUNA VE ORGANİZASYONUNA
ETKİSİ**

Şükrü ÖZTÜRK

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu :

Sunuş Tarihi : 05.01.2015

Bornova-İZMİR

2015

.....tarafından tezi olarak sunulan “.....”
başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen
Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca
tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve tarihinde yapılan
tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye :

.....

Üye :

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kanser Kök Hücrelerinin Mikro Doku Oluşumuna ve Organizasyonuna Etkisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / / 20..

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET**KANSER KÖK HÜCRELERİNİN MİKRO DOKU OLUŞUMUNA
VE ORGANİZASYONUNA ETKİSİ**

ÖZTÜRK, Şükrü

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

Ocak 2015, 138 sayfa

Bu tez çalışmasında kanser kök hücrelerinin mikro doku oluşturma yetisi, mikro dokuda oluşturdıkları yerleşim örüntüsü ve mikro doku kültür yönteminde karakterizasyon yöntemlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda CD133⁺ hücreleri SaOs-2 hücre dizisinden manyetik aktif hücre ayırım sistemi (MACS) tekniği ile ayrılmıştır. Hücreler mikro doku oluşturma yetilerinin araştırılması amacıyla 3D Petri Dish® tekniği kullanılarak oluşturulan agar jellerde farklı sayılarda kültüre edilmiş ve mikro doku oluşturma yetileri ters faz ışık mikroskobu ile izlenmiştir. Daha sonra CD133⁺ hücre oranı sırasıyla %50, %25, %12,5, %10, %5 ve %2,5 olacak şekilde kırmızı ve yeşil floresan boya ile boyanan CD133⁺ ve CD133⁻ hücreleri agar jellerde beraber kültüre edilmiştir. Son olarak CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların karakterizasyonları yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda immünohistokimyasal analiz yöntemi ile *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4* ve *Ki67* ifadesine, gerçek zamanlı RT-PZR ile *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* gen ifadesine bakılmıştır. Ayrıca mikro dokulardaki canlı ve ölü hücrelerin varlığı canlı&ölü hücre analizi ile belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücrelerinin yüksek hücre canlılığıyla mikro doku oluşturdıkları ve CD133⁺ hücrelerinin üç boyutlu (3B) mikro dokularda rastgele bir yerleşim gösterdiği anlaşılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışması ile kontrol grubu olarak belirlenen iki boyutlu (2B) kültür sistemine göre köklükle ilişkilendirilen gen ifadelerinde belirgin bir fark olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen bu veriler mikro dokuların 3B tümör modeli olarak kullanılabileceğini ve kanser çalışmalarında 2B ile hayvan çalışmaları arasında köprü görevi görebileceğini göstermiştir.

Anahtar sözcükler: CD133, kanser kök hücreleri, mikro doku, osteosarkoma

ABSTRACT
EFFECTS OF CANCER STEM CELLS ON MICROTISSUE
FORMATION AND ORGANISATION

OZTURK, Sukru

MSc. in Biomedical Technologies

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Aylin SENDEMİR URKMEZ

January, 2015, 138 pages

In this thesis, it is aimed to investigate the microtissue formation ability of cancer stem cells, their localization within the microtissues and characterization techniques of these microtissues. For this purpose CD133⁺ cells were isolated from SaOs-2 cell line with Magnetic Cell Sorting (MACS). To evaluate microtissue formation ability, cells were cultured in different ratios in agar gels produced by 3D Petri Dish[®] method and observed via inverted phase contrast light microscopy. Subsequently, CD133⁺ cells stained with red and CD133⁻ cells stained with green cell tracker dyes were co-cultured in agar gels in 50%, 25%, 12,5%, 10%, 5% and 2,5% ratios to investigate CD133⁺ cell localization in microtissues. CD133⁺, CD133⁻ and SaOs-2 microtissues were characterized for *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4*, *Ki67* expressions with immunohistochemistry and *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* and *nestin* gene expression profiles with RT-PCR, and live and dead cells within microtissues were defined with Live&Dead staining method. The results show that, CD133⁺, CD133⁻ and SaOs-2 cells were all able to form 3D microtissues with high cell viability, and CD133⁺ cells were located in microtissues randomly, without any pattern. Finally, when compared to the control group on 2D cell culture system, there was a clear difference in stemness gene expression profile in microtissues. Our results conclude that microtissues can be used as 3D tumor models to bridge *in vitro* culture and *in vivo* animal experiments for cancer research.

Key words: CD133, cancer stem cells, microtissues, osteosarcoma

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana her zaman destek olan, hayatın her alanında beni engin bilgi ve tecrübeleri ile aydınlatan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e, çalışmam süresince beni yönlendiren, eğitimim süresince bana büyük katkı sağlayan sevgili hocalarım Prof. Dr. Saime İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Sultan GÜLCE İZ'e içten teşekkür ve saygılarımı sunarım

İmmunohistokimyasal ve histolojik boyamalarım sırasında yardım eden ve yönlendiren çok değerli hocam Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER'e ve zamanını ayırıp analizlerimi yapan sevgili Sevtap GÖKALP'a, laboratuvar olanaklarından yararlanmama izin veren sayın Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a ve başta Esin ÖZTÜRK olmak üzere tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Kanseri Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi saygıyla sunarım

Çalışmalarım süresince destek ve yardımlarını benden esirgemeyen ağabeyim ve hocam yüksek biyomühendis Mehmet Özgün ÖZEN, çalışmalarımın tasarlanması, yapılması ve değerlendirilmesi aşamalarında büyük yardımları dokunan sevgili biyokimyager Cansu GÖRGÜN, kritik noktalarda değerli fikirlerini benimle paylaşmakta tereddüt etmeyen yüksek biyomühendis Şeyma TAŞDEMİR, Ece BAYIR, Eyüp BİLGİ ve Müge ANIL olmak üzere tüm Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma ve lisans öğrencilerimden Veli Kaan AYDIN'a teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi varlıklarıyla yanımda olan ve hiçbir zaman beni bu yolda desteklemekten geri durmayan, yaşadığım sıkıntıların aşılmasında sürekli beni cesaretlendiren, bana her koşulda inanan, güvenen sevgili anneme ve babama, beni her zaman mutlu eden,

cesaretlendiren ve destekleyen canım kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunarım.

13-FBE-011 nolu proje ile çalışmamı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne, 2014/BİL/020 numaralı projesi ile çalışmamı destekleyen Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji ve Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve 113M243 numaralı COST projesi ile çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
TABLolar DİZİNİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1 Normal Kök Hücreler.....	3
2.2. Kemik Doku ve Kemik Kanseri.....	4
2.2.1. Kemik Doku	4
2.2.2. Osteosarkoma.....	6
2.3. Kanser ve Osteosarkoma Epidemolojisi	9
2.4. Kanser Kök Hücreleri (KKH)	12

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5. Kanser Gelişim Modelleri ve Kanser Kök Hücreleri.....	16
2.6. İnsan Kanserlerinde Kök Hücreler.....	19
2.6.1. Meme kanseri kök hücreleri.....	19
2.6.2. Beyin kanseri kök hücreleri	19
2.6.3. Kolon kanseri kök hücreleri.....	20
2.6.4. Pankreas kanseri kök hücreleri	21
2.7. Normal Kök Hücreler ve Kanser Kök Hücreleri Arasındaki Farklar	22
2.8 Kanser Kök Hücrelerin Yerleşimi ve Mikro-çevresi	25
2.9 Kemik Kanseri Kök Hücreleri	27
2.10 Kanser Çalışmalarında 3 Boyutlu Kültür Sistemlerinin Önemi	30
2.11 Mikro Doku Teknoloji	32
2.11.1 Doku mühendisliğinde mikro doku teknolojisi.....	34
2.11.2 Mikro doku teknolojisinde meydana gelen önemli gelişmeler	37
2.11.3 Kanser çalışmalarında mikro doku teknolojisi	40

İÇİNDEKİLER (Devam)Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1 Hücre Kültürü	46
3.1.1 Gereç	46
3.1.2 Yöntem.....	47
3.2 SaOs-2 Hücre Dizisinin Karakterizasyonu	51
3.2.1 Gereç	52
3.2.2 Yöntem.....	52
3.3 SaOs-2 Hücre Dizisinden Kanser Kök Hücrelerinin MACS ile Ayrımlanması.....	54
3.3.1 Gereç	54
3.3.2 Yöntem.....	55
3.4 3D Petri Dish® Tekniği Kullanılarak Agar Jellerin Hazırlanması	64
3.4.1 Gereç	64

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.4.2 Yöntem.....	65
3.5 CD133 ⁺ , CD133 ⁻ ve SaOs-2 Hücrelerinin Mikro Doku Oluşturma Yetilerinin Belirlenmesi.....	68
3.6 CD133 ⁺ , CD133 ⁻ ve SaOs-2 Mikro Dokularının Karakterizasyonu	69
3.6.1 Mikro dokuların immünohistokimyasal analizi	71
3.6.2 Mikro dokularda canlı&ölü hücre analizi	73
3.6.3 Mikro dokularda RT-PZR ile gen ifade seviyelerinin belirlenmesi.....	75
3.7 CD133 ⁺ ve CD133 ⁻ Hücrelerinin Mikro Dokudaki Yerleşim Örüntüsünün İncelenmesi	75
3.7.1 Hücrelerin CellTracker™ ile boyanması	76
3.7.2 3B mikro doku sisteminde CD133 ⁺ hücre yerleşimin belirlenmesi.....	78
4. BULGULAR.....	82
4.1 SaOs-2 Hücre Dizisi Morfolojisi	82
4.2 Hücre Karakterizasyonu.....	83
4.3 CD133 ⁺ Hücrelerinin MACS ile Ayrımlanması	83

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

4.3.1 CD133 ⁺ ve CD133 ⁻ hücre morfolojileri	84
4.3.2 Ayrım sonucunda elde edilen hücre gruplarının gen ifadesi sonuçları	85
4.4 CD133 ⁺ , CD133 ⁻ ve SaOs-2 Hücrelerinin Mikro Doku Oluşturma Yetilerinin Belirlenmesi	87
4.4.1 CD133 ⁺ hücrelerinin mikro doku oluşturma yetisi	87
4.4.2 CD133 ⁻ hücrelerinin mikro doku oluşturma yetisi	90
4.4.3 SaOs-2 hücrelerinin mikro doku oluşturma yetisi.....	93
4.5 CD133 ⁺ , CD133 ⁻ ve SaOs-2 Mikro Dokularının Gen ve Protein İfadelerinin Karakterizasyonu	95
4.5.1 Mikro dokuların immünohistokimya boyama analizi sonuçları	96
4.5.2 Mikro dokuların canlı&ölü analiz sonuçları	97
4.5.3 Mikro dokuların RT-PZR analiz sonuçları	98
4.6 CD133 ⁺ ve CD133 ⁻ Hücrelerinin Mikro Dokudaki Lokalizasyon Örüntüsünün İncelenmesi	104
4.6.1 3B mikro doku sisteminde floresan görüntüleme yöntemi ile CD133 ⁺ hücre yerleşiminin belirlenmesi	104

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

4.6.2 Mikro dokularda hücre lokalizasyon örüntüsünün IHK boyama ile belirlenmesi.....	107
5. TARTIŞMA	110
6. ÖNERİLER.....	122
KAYNAKLAR DİZİNİ	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Osteosarkomada tümör heterojenite modelleri	9
2.2 Kanser kök hücre çalışmalarının tarihsel gelişimi.	16
2.3 Çeşitli hücrelerin oluşturduğu mikro dokular	35
2.4 Farklı hücre tipleri kullanılarak oluşturulan mikro dokularda hücre yerleşim örüntüsü	37
3.1 MACS tekniğinin şematik gösterimi.....	54
3.2 MACS tekniği ile CD133 ⁺ hücrelerin SaOs-2 hücrelerinden ayrırılması. .	58
3.3 Mikro dokuların oluşturulması için kullanılan 3D Petri Dish® kalıpları	64
4.1 SaOs-2 Hücrelerinin ters faz kontrast ışık mikroskobu görüntüsü..	82
4.2 SaOs-2 hücre dizisinin %2,5 FBS ortam bileşimine sahip büyütme ortamındaki büyüme kinetiği verileri.....	83
4.3 CD133 ⁺ ve CD133 ⁻ hücre morfolojilerinin SaOs-2 hücre morfolojisi ile kıyaslanması.....	85
4.4 MACS ayırımı sonunda elde edilen hücre gruplarının mRNA düzeyinde gen ifade seviyeleri	86
4.5 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133 ⁺ hücre mikro dokuların 1. 2. 3. ve 4. günkü ışık mikroskobu görüntüleri.	88

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

4.6 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133 ⁺ hücre mikro dokularında meydana gelen ölçüsel değişimin süreye bağlı değişimi	90
4.7 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133 ⁻ hücre mikro dokuların 1. 2. 3. ve 4. günlük ışık mikroskobu görüntüleri	91
4.8 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133 ⁻ hücre mikro dokularında meydana gelen ölçüsel değişimin süreye bağlı değişimi	92
4.9 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133 ⁻ hücre mikro dokuların 1. 2. 3. ve 4. günlük ışık mikroskobu görüntüleri	93
4.10 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan SaOs-2 hücre mikro dokularında meydana gelen ölçüsel değişimin süreye bağlı değişimi	95
4.11 CD133 ⁺ , CD133 ⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan 3B mikro dokularda ve 2B kültür sisteminde kültüre edilen hücrelerin canlı&ölü analizi. ..	98
4.12 CD133 ⁺ , CD133 ⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan 3B mikro dokularda gen ifade seviyeleri.	99
4.13 CD133 ⁺ , CD133 ⁻ ve SaOs-2 hücrelerinin 2B hücre kültürü sisteminde kültüre edildiklerinde elde edilen gen ifade seviyeleri	100
4.14 CD133 gen ifadesi bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması	101

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.15 Sox2 gen ekspresyonu bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması	102
4.16 OCT3/4 gen ifadesi bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması.	102
4.17 Nanog gen ifadesi bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması.	103
4.18 Nestin gen ifadesi bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması	103
4.19a 3B mikro dokularda CD133 ⁺ hücre yerleşim örüntüsünün kullanılan hücre miktarı ve zamanla değişimi	105
4.19b 3B mikro dokularda CD133 ⁺ hücre yerleşim örüntüsünün kullanılan hücre miktarı ve zamanla değişimi	106

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Tümör modellerinin oluşturma yöntemlerinin karşılaştırılması	31
3.1 RT-PZR çalışmasında kullanılan genler ve primer sekansları.....	62
3.2 RT-PZR için kullanılan cihaz protokolü.....	62
4.1 MACS ayırımlarında elde edilen CD133 ⁺ hücre verimleri.....	84
4.2 CD133 ⁺ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların ortalama çapı.....	89
4.3 CD133 ⁻ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların ortalama çapı.	92
4.4 SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların ortalama çapı.	94
4.5 2B ve 3B kültür sisteminde kültüre edilen hücrelerin immünreaktivite sonuçları.....	96
4.6 İmmünreaktivite analizine göre farklı CD133 ⁺ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokulardaki hücre yerleşimi	108

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
2B	2 boyutlu
3AB	3-aminobenzamit
3B	3 boyutlu
ALDH	Aldehit dehidrogeneaz
AML	Akut miyeloid lösemi
bFGF	Temel fibroblast büyüme faktörü
BSA	Sığır serum albümin
CAF	Kanser-iliqli fibroblast
CX43	Koneksin-43
DAB	Diaminobenzidin
DAH	Diferansiyel adezyon hipotezi
Detroit	İnsan kaynaklı deri fibroblast hücreleri
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
EGF	Epidermal büyüme faktörü ,
EKH	Embriyonik kök hücreler
EMT	Epidermal-mezenşimal dönüşümün
EpCAM	Epitelyal hücre adezyon molekülü
ESA	Epitel spesifik antijen
EthD-1	Etidyum homodimer-1
EtOH	Etanol
FACS	Floresan aktif hücre ayırımı
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
FBS	Fötal sığır serumu
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GBM	Glioblastoma multiform
GLOBOCAN	Dünya kanser veri tabanı
H NMR	Yüksek çözünürlüklü proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisini
HFB	Hidrodinamik odaklı biyoreaktör
HS2	İnsan kaynaklı deri keratinosit hücreleri
HUVEC	İnsan kaynaklı göbek kordonu endotel hücreleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
HÜKÜK	Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu
iPS	İndüklenmiş pluripotent kök hücreler
KKH	Kanser kök hücresi
Lgr5	<i>Leucine-rich repeat with G-protein-coupled reseptör</i>
MACS	Manyetik aktif hücre ayırım sistemi
MAP	Metotreksat, doksorobisin ve sisplatin
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre dizisi
MDR1	Çoklu ilaç direnç protein -1
MKH	Mezenşimal kök hücreleri
MNP	Manyetik nanopartiküller
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromit
NaCl	Sodyum klorür
NCBI	Ulusal biyoteknoloji bilgisi merkezi
NHF	Normal insan fibroblast hücreleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
NIH	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü
OCT3/4	Oktomer bağlama transkripsiyon faktörü
Panx1	Panneksin 1
PBS	Fosfat tamponu solüsyonu
PFA	Paraformaldehit
RB	Retinoblastom protein
RCCS	Döner hücre kültür sistemi
RNA	Ribonükleik asit
SaOs-2	İnsan kemik kanseri hücre dizisi
Sox2	Cinsiyet belirleme bölgesi-Y kutusu-2
SSEA ¹⁺	Durum spesifik embiryonik antijen-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Kanser modern zamanlara has olmayıp, yüzyıllardır var olan bir hastalıktır (Dinshaw et al., 2008). Kanser, gelişmiş ülkelerde ölüm sebepleri arasında birinci sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ikinci sırada yer almaktadır (Jemal et al., 2011). Dünya Kanser Veri Tabanı (GLOBOCAN) 2008 verilerine göre 2008 yılında yaklaşık 12,7 milyon kanser vakası teşhisi konmuş, 7,6 milyon kanser vakası ise ölümle sonuçlanmıştır. Görülen vakaların %56'ı ve meydana gelen ölümlerin %64'ü gelişmekte olan ülkelerde tespit edilmiştir (Ferlay et al. 2010). Amerika'da 2012 yılında toplamda 1.638.910 yeni kanser vakası görülmüş, 577,190 vaka ölümle sonuçlanmıştır (Siegel et al., 2012). Türkiye'de toplam ölümlerin arasında kanserden kaynaklanan ölümlerin oranı, 2000 yılı için hastalık yükü çalışmasında %13,1 olarak hesaplanmıştır (Dinshaw et al., 2008).

Osteosarkoma, insanda en sık rastlanan primer kötü huylu kemik tümörüdür. Fakat osteosarkoma hücrelerindeki kanserin nereden köken aldığı tam olarak bilinmemektedir (van Driel and van Leeuwen 2014). Osteosarkoma biyolojisinin anlaşılması ve osteosarkoma sağaltım çalışmalarında kullanılabilecek bilgilerin kazandırılması oldukça önem kazanmaktadır. Bu çalışmada kanser çalışmalarında sıklıkla tercih edilen ve *in vivo* koşulları taklit etmede başarısız olduğu bilinen 2B (Abbott, 2003) kültüre sistemine alternatif olabilecek bir 3B kültür modeli oluşturmak ve osteosarkoma biyolojisi hakkında yeni kazanımlar elde etmek amaçlanmıştır. Bu kapsamda osteosarkomlarda kanser kök hücre (KKH) özelliği gösterdiği bilinen CD133⁺ hücrelerinin 3B tümör modeli oluşturma kapasitelerine dair yeni bilgilerin literatüre kazandırılması hedeflenmiştir.

Son zamanlarda bilim insanlarının yaptığı çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, kanserlerin tetiklenmesi, büyümesi, tekrarlama ve metastazında küçük bir popülasyona sahip kök hücre özellikleri taşıyan tümör hücrelerinin olduğunu işaret etmektedir. Şimdiye kadar insan kanser türleri arasında

meme, beyin, prostat, yumurtalık ile baş ve boyun kanserlerinde KKH varlığı gösterilmiş olup saflaştırılmaları yapılmıştır (Collins et al. 2005). Bu çalışma ile insan kemik kanseri hücre dizisi (SaOs-2)'nde KKH varlığının gösterilmesi ve bu kök hücrelerin 3B bir tümör modelindeki davranışlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece kanser sağaltım çalışmalarında kullanılabilecek ve *in vivo* tümör yapısını başarılı bir şekilde taklit eden 2B kültür sistemine ve hayvan denemeleri arasında köprü görevi görebilecek osteosarkoma modeli oluşturulmuş olacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Normal Kök Hücreler

İnsan vücudu 269 farklı fenotipte 100 trilyon kadar hücreden meydana gelmektedir. İnsan vücudunda bulunan bu hücreler farklı fenotipte bulunmalarının yanında bölünebilmekte, farklılaşabilmekte ve kendiliğinden bir araya gelerek doku ve organ sistemlerinde önemli fonksiyonları yeri getirmektedirler (Sipe, 2002). Kök hücreler, kendini yenileme özelliğinden dolayı sürekliliklerini devam ettirebilen ve hedef dokuda farklılaşarak olgun hücrelerin oluşturulmasında aktif rol alan hücreler olarak tanımlanırlar (Reya et al., 2001).

Kök hücre kaynakları, blastositin iç kısmındaki hücrelerden (iç hücre kütleleri) elde edilen embriyonik kök hücreler ve doğum sonrası dönemde elde edilen erişkin kök hücreler olmak üzere iki çeşittir. Embriyonik kök hücreler (EKH), embriyodan oluşan, sonsuz üreme potansiyeline sahip hücrelerdir. Embriyonik olmayan kök hücreler, erişkin kök hücreleri orijinlerine göre, fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, partenot hücreleri (partenogenezis), göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri olarak isimlendirilirler (Deliloğlu Gürhan ve ark., 2008). Teorik olarak EKH oldukça yararlı olmalarına rağmen hücre düzenlenmesi, etik etmenler ve genetik manipülasyonlar gibi çeşitli problemlere kaynaklık ederler. Öte yandan yetişkin kök hücreler çok kolay elde edilmektedirler. Bunun yanında etik problemler ve immün sistem tarafından red edilme gibi sorunları da taşımamaktadırlar (Mizuno, 2009). Kemik iliği stromal kök hücreleri ya da mezenşimal kök hücreleri (MKH) olarak da bilinen iskelet kök hücreleri, yüzeye bağımlı olarak canlılıklarını devam ettiren ilik kaynaklı kolonerjik hücrelerin alt kümesi olarak bulunurlar (Bianco and Robey, 2001). Birçok araştırmacı MKH kemik iliği stromasından izole ederek kullanmaktadır. İzole edilen kemik iliği kaynaklı bu hücreler *in vitro* koşullarda adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik ve nörojenik farklılaşma yetisine sahiplerdir. Fakat kemik iliğinin hastadan elde edilme sürecinin oldukça acı

verici olduğu ve hedef hücrelerin elde edilme veriminin düşük olduğu raporlanmıştır. Elde edilen veriler mezenşimal kök hücrelerin endotel, nöral, düz kas, miyoblast ve miyosit hücrelerinin fenotipik özelliklerini eksprese ettiklerini göstermiştir (Pittenger and Martin, 2004; Mizuno, 2009).

Kök hücre kaynağı olarak değerlendirilebilecek ve son yıllarda oldukça ses getiren, EKH özelliği gösterdiği kanıtlanan “indüklenmiş pluripotent kök hücreler” (iPS), somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla elde edilirler. Bu süreçte *Octomer Bağlama Transkripsiyon Faktörü (OCT3/4 veya OCT4)*, *Cinsiyet belirleme bölgesi-Y kutusu-2 (Sox2)*, *c-myc* ve *Kruppel benzeri faktör 4 (Klf4)* gibi transkripsiyon faktörleri kullanılmaktadır (J. Yu et al., 2007). iPS’ler spesifik olarak hasta ya da hastalık göz önünde bulundurularak oluşturulabilme avantajına sahiptir (Takahashi, 2007). Fare fibroblast hücreleri *OCT3/4*, *Sox2*, *Klf4* ve *c-Myc* transkripsiyon faktörleri kullanılarak iPS olarak yeniden programlanmışlardır. Fakat oluşturulan bu hücrelerin tümörojenitesinin fazla oluşu nedeniyle *c-Myc* transkripsiyon faktörü kullanılmadan yeni bir protokol önerilmiştir (Nakagawa et al., 2008). Ayrıca, *OCT4*, *Sox2*, *nanog*, ve *LIN28* transkripsiyon faktörleri kullanılarak insan kaynaklı somatik hücrelerin embriyonik kök hücre özelliği kazandırıldığı da raporlanmıştır (J. Yu et al., 2007).

2.2. Kemik Doku ve Kemik Kanseri

2.2.1. Kemik Doku

Kemik vücuttaki en sert dokudur. Kemik dokunun üç önemli görevi vardır; 1) mekanik fonksiyon, 2) koruyucu fonksiyon ve 3) metabolik fonksiyon. İskelet kasalarına tutunma yüzeyi oluşturması, kas kasılmalarının harekete yansması mekanik fonksiyona, iç organların ve yumuşak dokuların korunması koruyucu fonksiyona, kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların depolanması ise metabolik fonksiyona örnek verilebilir (Çay ve Sezer, 2002).

Kemik dokuda birbirinden farklı üç hücre tipi bulunmaktadır: matriks üreten osteoblastlar, doku yenilenmesini sağlayan osteoklastlar ve yetişkin birey iskeletinin %90'nını oluşturan osteositler. Osteoblast ve osteosit hücreleri mezenşimal kök hücrelerden, osteoklastlar hemapoietik kök hücrelerden köken almışlardır. Osteoblast ve osteoklastlar kemiğin yüzeyinde lokalize olmuşken osteositler kemiğin içinde yer edinmişlerdir (Downey and Siegel, 2006).

Osteoblastlar ekstraselüler matriks oluşumu ve minerilizasyonunda görev alırlar. Kübik morfoloji gösterirler ve kemiğin yüzeyinde öncül hücreler ile birlikte ince bir tabaka oluştururlar. Osteoblastlar yüzeye bağımlı hücrelerdir ve çeşitli intramembran proteinlerle hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi gösterirler (Sommerfeldt and Rubin, 2001). Osteoblastların yaşam ömrü genç bir tavşanda 3 gün iken insanda bu süre 8 haftayı geçebilir. Bazı osteoblast hücreleri kendi ürettikleri kalsifye matriks içinde hapsolüp fenotiplerini değiştirerek osteositlere dönüşebilirler (Ducy, 2000). Osteositler en basit tanımları ile kendilerini, kendi sentezledikleri kemik matriks içine hapsedmiş olan osteoblastlardır. Osteositlerin mikroflaman yapıda uzantıları mevcuttur ve bu mikroflamanlar, kemik matriksinin oluşumu esnasında henüz kalsifikasyon oluşmadan önce organize olurlar (Çay ve Sezer, 2002). Osteoklastlar kıkırdak ve kemik dokunun rezorpsiyonundan sorumlu olan hücrelerdir. Bunlar dev hücreler olup hacimleri 200.000 m^3 'e kadar ulaşabilir. Çok çekirdekli yapıları bu hücrelerin önemli özelliklerinden birisidir (Çay ve Sezer, 2002; Sommerfeldt and Rubin, 2001).

Kemik onarımı üç şekilde olabilir; osteogenez, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon. Osteogenezde osteoblastlar tarafından yeni kemikleşme (*neo-ossification*) meydana getirilir. Osteokondüksiyon prosesinde kemik defektlerine osteoblastların migrasyonu söz konusu iken osteoindüksiyon sürecinde kemik morfogenetik proteini (BMP) gibi kemik oluşumunu indükleyen büyüme faktörleri mezenşimal hücrelerinin öncül osteoblast ve

osteoblast hücrelerine farklılaşmasını ve bu hücrelerin kemik defektlerine hareket etmesini sağlar (Henkel et al., 2005).

Osteogenez, mezenşimal kök hücreler tarafından başlatılan aktif bir süreçtir ve normal damarlı kemik yapısının oluşumunu sıkı bir şekilde kontrol eder. Osteogenez yetişkinlerde hayat boyu devam eden bir olaydır. Kemik oluşumu birçok etkenin karşılıklı etkileşimine bağlıdır. Bu etkenler arasında mezenşimal kök hücreler ve osteoklastlar gibi özel hücre tipleri, hidroksiapatit, ekstraselüler matriks molekülleri, büyüme faktörü, sitokin, hormon ve vitaminler gibi çözünebilen molekül ekspresyonu ve çeşitli mekanik uyarıcılar sayılabilir (Deschaseaux et al., 2009).

Kemik doku mühendisliği alanında yapılan araştırmalar spesifik faktörler, yolaklar, kemik öncül hücreleri, mineralize matriks ile öncül hücrelerin doku mühendisliği ortamındaki (çeşitli özelliklere sahip doku iskeleleri) fizyolojik özellikleri hakkında literatüre önemli bilgiler sağlamıştır (Hoemann et al., 2009). Mezenşimal kök hücrelerin olgun osteoblast hücrelerine farklılaşması ve bunun sonucunda da mineralize matriksin oluşumunda moleküler sinyal mekanizmalarının rol aldığı bilinmektedir (Janardhanan et al., 2012).

2.2.2. Osteosarkoma

Kemik sarkomları, kemik hücreleri ya da bu hücrelerin köken aldığı hücrelerden orjinlenen primer, non-epitel ve kötü huylu tümörleri içerir. Bu tümörler metastaz yapabilme potansiyeline sahiptir. Bazı kemik sarkomları tamamen osteolitik iken bazıları kireçlenmiş (osteosarkoma), bazıları da kıkırdaklı (kondrosarkoma) matriks üretir. En sık görülen kemik sarkomları osteosarkom, Ewing's sarkom ve kondrosarkomdur (Mavrogenis et al., 2014). Osteosarkoma kötü huylu mezenşimal hücrelerle ilişkili olduğu bilinen osteoid üretiminin histolojik özelliklerini taşıyan tümörler olarak tanımlanırlar. Bu tümör tipleri genellikle lokal agresiftirler ve erken sistemik metastaza eğilim gösterirler (Luetke et al., 2014).

Osteosarkoma teşhisinde histolojik olarak kendi osteoid matriksini üreten kötü huylu osteoblastik mezenşimal hücrelerin varlığı dikkate alınır. En bilindik osteosarkoma tipi geleneksel formdur. Geneleneksel form, histolojik analiz baz alınarak farklı 7 alt türe ayrılmıştır; osteoblastik, fibroblastik, kondroblastik, epitelooid, büyük hücreli, küçük hücreli ve talenjiektazik (Mutsaers and Walkley, 2014).

Osteosarkoma, insanda en sık rastlanan primer kötü huylu kemik tümörüdür. Fakat osteosarkoma hücrelerindeki kanserleşmenin nerden orjinlendiği tam olarak bilinmemektedir. Elde edilen veriler kanserleşmenin MKH ve osteoblast öncüllerinin *p53* ve *Retinoblastom Protein (RB)* yol izlerinde meydana gelen mutasyonlar olabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca, kemik mikro çevresinin de kanser gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir (van Driel and van Leeuwen, 2014).

Tümör heterojenitesi osteosarkom dahil diğer tüm katı tümörlerde ortak özelliktir. Tümör heterojenitesinin kabul gören iki modeli bulunmaktadır: "Genetik mutasyon" modelinde tümör fenotipi, uygun hücre tipinde meydana gelen mutasyon türü ve sayısı ile belirlenir. Bu da farklı genetik yapıya sahip tümör alt türlerinin oluşmasını sağlar (Mutsaers and Walkley, 2014). "Kökenli hücre" modelinde farklı olarak tümör alt türleri, organ ya da dokudaki hiyerarşide yer alan farklı hücre popülasyonlarında devam etmekte olan onkogenik olaylar sonucunda oluşur. Osteosarkomada tümör heterojenitesine verilebilecek örneklerden biri tümör türüne bağlı olarak oluşan çok çeşitli matriks türleridir (Şekil-2.1) (Visvader, 2011).

Osteosarkoma, olgunlaşmamış kemiğin oluşmasında etkili olan kötü huylu tümör hücreleri bulunduran ve çocuklar ile yetişkinlerde sıkça görülen hematolojik olmayan kötü huylu tümördür. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 2500 yeni teşhis konulmakta olup bu vakaların büyük bir çoğunluğunu 20 yaş altı çocuk ve ergenler oluşturmaktadır. Vakaların %80'inde tümör

gelişimi uzun kemiklerin metafiz gibi hızlı büyüyen bölgelerinde görülmektedir (Fiore et al., 2013).

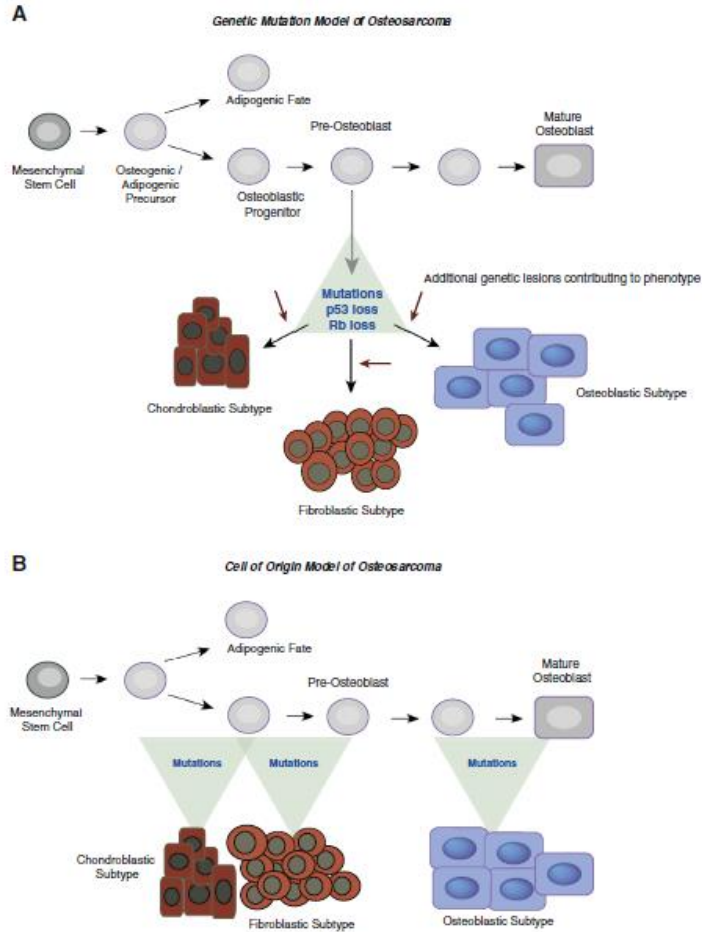
Standart bakımla osteosarkomlu çocuklarda 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %70'tir. Fakat osteosarkom teşhisi konan çocukların %30'unun 5 yıldan fazla hayatlarını devam ettiremedikleri bilinmektedir. Bu hastalığın tedavisinde başarısızlığın iki önemli nedeni vardır; zamanla gelişen kemodirenç ve metastaz (M. Xu et al., 2014) .

Osteosarkomanın tedavisinde sıklıkla tercih edilen yöntemler arasında cerrahi işlem, kimyasal tedavi ve ışın tedavisi sayılabilir. Kimyasal müdahale olarak osteosarkoma hastalarına neoadjuvan ve adjuvan tedavisi uygulanmaktadır (Gill et al., 2013). Tarihsel olarak klinisyenler tarafından osteosarkoma hastalarının iyileştirilmesi için izlenen protokollerde birçok ajan kullanılmıştır. 1990'lara kadar uygulanan protokoller, üçlü ilaç kokteyli olarak da tanımlanan metotreksat, doksorobisin ve sisplatin (MAP) içermektedir. Daha sonra osteosarkomada aktif olduğu bilinen bu ajanlara ek olarak ifosfamid ve etoposat kullanılmaya başlanmıştır (Luetke et al., 2014).

Osteosarkoma hastalarında sıkça kullanılan tedavi yöntemi tümör dokusunun kesilerek alınmasıdır. Günümüzde kullanılan cerrahi işlemler tümör dokusuna komşu olan dokuların zarar görmesini minimize etme amacına odaklanmışlardır. Görüntüleme teknolojilerindeki gelişme ve başarılı ön kimyasal tedavi uygulamaları ile birlikte sağ kalım oranlarında artış meydana geleceği düşünülmeye rağmen lokal müdahalelerde kanserin tekrarlanma oranı amputasyonlarda %2-3 iken koruyucu ameliyatlarda %5-7 olarak raporlanmıştır (Yasko, 2010).

Osteosarkomanın ışın tedavisine dirençli olduğu düşünülmeye rağmen cerrahi işlemlerle yerinden çıkarılamayan tümörlerin lokal tedavisinde ek işlem olarak kullanılabilir (DeLaney et al. 2005). İfosamid, sisplatin ve metotreksat gibi kimyasal tedavi ajanları lokal olarak uygulanan

radyoterapinin etkinliğini artırdığı ifade edilmiştir. Ayrıca bazı hastalarda kimyasal tedavi ve ışın tedavisinin beraber kullanılması ile hastalığın tekrar ortaya çıkmasında azalma meydana geldiği görülmüştür (Luetke et al. 2014).



Şekil 2.1 Osteosarkomada tümör heterojenite modelleri (Mutsaers and Walkley 2014; Visvader 2011).

2.3. Kanser ve Osteosarkoma Epidemolojisi

Kanser modern zamanlara has olmayıp, yüzyıllardır var olan bir hastalıktır. Ancak genç yaşlara oranla ilerleyen yaşlarda daha çok görülen bir hastalık olduğu için bugün dünya nüfusundaki artış ve insanların ulaştıkları nispeten ileri yaşların da etkisiyle geçmişe oranla insanlarda daha sık görülmektedir (Dinshaw et al., 2008).

Kanser, gelişmiş ülkelerde ölüm sebepleri arasında birinci sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ikinci sırada yer almaktadır. Gelişmekte olan toplumlarda meydana gelen yaşlanma, kanser ile ilişkilendirilen yaşam tarzına olan ilgi kanser vakalarının sayısında dramatik bir artışa neden olmaktadır (Jemal et al., 2011). GLOBOCAN 2008 verilerine göre 2008 yılında yaklaşık 12,7 milyon kanser vakası teşhisi konmuş, 7,6 milyon kanser vakası ise ölümle sonuçlanmıştır. Görülen vakaların %56'sı ve meydana gelen ölümlerin %64'ü gelişmekte olan ülkelerde tespit edilmiştir. GLOBOCAN verileri kadınlarda en sık görülen kanser türünün meme kanseri, erkeklerde ise akciğer kanseri olduğunu göstermiştir (Jemal et al., 2011). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kanser kaynaklı ölümlere bakıldığında kadınlarda meme kanseri, erkeklerde akciğer kanseri ön plana çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türü prostat kanseridir. Gelişmekte olan ülkelerde kadınlarda meme kanserinden sonra rahim ve akciğer kanseri sıklıkla görülmektedir (Ferlay et al., 2010).

ABD'nde 2012 yılında toplamda 1.638.910 yeni kanser vakası görülmüş, 577.190 vaka ölümle sonuçlanmıştır. Bu ülkede kanserin görülme sıklığı erkeklerde yılda % 0,6 artmışken kadınlarda sabit kalmıştır. Yapılan istatistiksel araştırmalar kanser kaynaklı ölümlerin erkeklerde yılda %1,8, kadınlarda ise %1,6 düşüş meydana geldiğini göstermişti (Siegel et al., 2012).

Dünya çapında en önemli hastalık sebebi olan kanser, ekonomik anlamda da oldukça büyük kayıplara neden olmaktadır. 2008 yılı verileri göz önünde bulundurulduğunda dünya çapında toplam maliyeti 895 milyar dolardır. ABD'de Ulusal Sağlık Örgütü (NIH)'ün yaptığı çalışmalar 2008 yılında kanserin neden olduğu toplam ekonomik maliyetin 201,5 milyar dolar olduğunu göstermiştir. Fakat yapılan kanser araştırmaları sonucunda 1971 yılında kurtulan kişi sayısı 3 milyon iken bu sayı 2012 yılında 13,7 milyona çıkmıştır. Ayrıca, Eylül 2012 ile Temmuz 2013 tarihleri arasında çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilen 11 yeni ilaç ABD Gıda ve İlaç

Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve 3 yeni görüntüleme teknolojileri geliştirilmiştir (Sawyers et al., 2013).

Türkiye'de 1982 yılında 1593 sayılı Umumi Hıfz-ı Sıhha Kanunu'nun 57. maddesi gereğince "bildirimi zorunlu hastalıklar listesi"ne alınmış olmasına rağmen ülkemizde gerçek kanser sayısı bilinmemektedir. Bununla beraber, Türkiye'de toplam ölümlerin arasında kanserden kaynaklanan ölümlerin oranı, 2000 yılı için hastalık yükü çalışmasında %13,1 olarak hesaplanmıştır (Anonim, 2010).

Sağlık Bakanlığı Kanser Kontrol Bölümü verilerine göre Türkiye'de kanser görülme sıklığı (insidans) 2002-2005 yılları arasında artış göstermiştir. İnsidans oranı her 100 bin vakada 133,78'den 173,85'e yükselmiştir. 2002-2005 yılları arasında erkeklerde ortalama büyüme hızı yaklaşık %9,7'e kadınlarda ise %8,6'a yükselmiştir. Türkiye'de en sık görülen kanser türleri sırasıyla akciğer, prostat, deri, meme ve mide kanserleri olmasına rağmen akciğeri kanseri vakalarının kadınlara göre erkeklerde daha fazla görülmesi kanser insidans büyüme oranının erkeklerde daha yüksek olmasına neden olmaktadır. (Yılmaz et al., 2011).

Osteosarkomanın insidansı tüm ırklarda ve her iki cinsde 0-14 yaş aralığı için 4,0 (3,5–4,6) iken 0-19 yaş aralığı için bu oran 5,0 (4,6–5,6) olarak hesaplanmıştır (yıl başına 1 milyon kişi). %2,4 yüzdesiyle osteosarkoma, çocuk kanserleri arasında görülme sıklığı bakımından sekizinci sırada yer almakta ve yaş bakımından iki tepeli dağılım göstermektedir. Bu da bu kanser tipinin en çok genç erişkinlerde (10-14 yaş arası) ve yetişkinlerde (65 ve üstü) görüldüğü anlamına gelmektedir. Yıl başına 1 milyon kişi dikkate alındığında erkeklerde osteosarkomanın ortaya çıkış sıklığı 5,4 iken kadınlarda 4,0'dır (Ottaviani and Jaffe, 2010).

Osteosarkoma, uzun kemiklerin metafiz bölgelerinde sıklıkla görülmektedir. Osteosarkomanın görülme sıklığı femurda %42, tibiada %19,

humerusda %10, ağız bölgesinde %8 ve pelviste %8 olarak tespit edilmiştir. Çocuklukta ve ergenlikte kanser kaynaklı meydana gelen ölümlerin %8,9 kötü huylu kemik kanseri kaynaklıdır. Buna rağmen meydana gelen osteosarkoma kaynaklı ölümlerin yıl bazında %1,3 oranında azalış gösterdiği ifade edilmektedir (Ottaviani and Jaffe, 2010; Gill et al., 2013)

Perkin ve ark., yaptıkları çalışmada son 40 yılda çeşitli metastazik kanser türlerinde toplam yaşam oranını belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda osteosarkoma için uygulanan tedavi stratejileri sonunda elde edilen toplam yaşam oranı 1973-1979 arasında %13,6, 1980-1989 arası %5,1, 1990-1999 arası %23,9 ve 2000-2010 arası %29,3 olarak elde edilmiştir. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda 2000-2010 yılları arasında tedavi edilen hastalarda toplam yaşam oranı 1970 ve 1980'lere göre yüksek olduğu fakat 1990'larla karşılaştırıldığında bu oranda belirgin bir iyileşme olmadığı anlaşılmaktadır (Perkins et al., 2014).

2.4. Kanser Kök Hücreleri (KKH)

Birçok tümör çeşidinin gelişim süreci aylar veya yıllar sürebilmekte ve tümör dokusu normal dokudaki gibi heterojen yapıda hücre popülasyonları içermektedir. Daha önce tanımlanan kanser modellerinde kontrolsüz tümör büyümesi, hücre çoğalmasını denetleyen genetik mekanizmalarda meydana gelen hasarlar, çoğalmayı inhibe eden genlerin susması ve programlı hücre ölümü ile ilgili gen aktivitelerinin bozulması ile ilişkilendirilmiştir (Al-Hajj et al., 2004). Onkogenlerin keşfedilmesiyle, kanser oluşumuna neden olan genetik olaylara dair bilğimiz hızlı bir şekilde ilerleme göstermiştir. Kolon, meme, karaciğer ve prostat gibi epitelyal kanser türleri yetişkinlerde sıklıkla görülen türlerdir ve bu dokuların her birinde, olgun doku hücresinin minör doku kök hücresi popülasyonu tarafından doldurulduğu düşünülmektedir. Bu kök hücreler, hızlı çoğalabilen öncül hücre popülasyonlarını oluşturmakta ve bu süreç olgun epitel hücresi oluşumu ile son bulmaktadır. Birçok doku tipinde sadece uzun yaşam ömrü olan hücreler kök hücre özelliği taşımakta

iken diğ er hücre tipleri tipik olarak günlük ya da haftalık yaşam ömrüne sahiptir (Al-Hajj and Clarke, 2004).

Kök hücreler asimetrik bölünme sonucu iki kardeş hücre oluşturmakla karakterize olurlar. Oluşturulan hücrelerden biri her bölündüğünde çoğalma kapasitesini kaybetmeksizin kendini yenileyebilme özelliklerinde olan yeni kök hücre iken diğ eri kendini yenileyebilme karakterini göstermeyen fakat farklılaşma ve çoğalma kabiliyetine sahip öncül (progenitör) hücredir. Normal kök hücreler *in vivo* da yaşlanmış ve zarar görmüş dokuların onarımında görev almaktadır (Di Fiore et al., 2009).

Bir tümör dokusunda genetik insitabilite ve/veya çevresel faktörlerden dolayı meydana gelen mutasyonlar farklı popülasyonlarda hücrelerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu da tümör dokusunda heterojen bir yapının oluşmasına neden olmaktadır. Heterojenitenin diğ er bir açıklaması da tümör dokusunun büyümesi, KKH ve tümörojenik olmayan hücrelerin çoğalmasını sağlayan tümörojenik (kök hücre)  zellikte bir popülasyonun varlığıdır [37].

Son zamanlarda bilim insanlarının yaptığı çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, kanserlerin tetiklenmesi, büyümesi, tekrarlama ve metastazında küçük bir popülasyona sahip kök hücre özellikleri taşıyan tümör hücrelerinin olduğunu işaret etmektedir. şimdiye kadar insan kanser türleri arasında meme, beyin, prostat, yumurtalık ile baş ve boyun kanserlerinde KKH varlığı gösterilmiş olup saflaştırılmışlardır (Chaffer et al., 2011). Reya ve arkadaşlarının savunduğu hipoteze göre kanser, kök hücre popülasyonunda meydana gelen mutasyonların artışı sonucu ortaya çıkar (Reya et al., 2001). Kanser kök hücresi teorisine göre sadece  zel KKH popülasyonu kanser büyümesini sağlar. KKH popülasyonunu tanımlayan 4 tane anahtar özellik vardır:

1. İmmün sistemi baskılanmış farelere transplante edildiğinde sadece KKH tümörojenik özellik gösterir,

2. KKH yüzey belirteçleri kullanılarak diğer kanser hücrelerinden izole edilebilir,

3. KKH'lerden temel almış tümörler hem tümörojenik hem de tümörojenik olmayan hücreleri içerir,

4. KKH alt kültürü birçok kuşak boyunca seri transplante edilmesi bu hücrelerin kendi kendine çoğaldığını gösterir (O'Connor et al., 2014; Shackleton, 2010).

KKH'lerin izolasyonu amacıyla *CD44*, *CD24*, *CD29*, *CD90*, *CD133*, epitel spesifik antijen (ESA) ve aldehit dehidrojenaz (ALDH) gibi hücre yüzey belirteçleri kullanılmaktadır. KKH yüzey markörlerin ekspresyonunun doku spesifik olduğu bilinmektedir. Örneğin meme kanseri kök hücreleri $CD44^+CD24^{-/düşük}$ ve $ALDH^+$ ile karakterize olurken kolon, beyin, kemik ve akciğer kanserleri kök hücreleri $CD133^+$ ile boyun ve baş kanser kök hücreleri $CD44^+$ ile karakterize olurlar (Z. Yu et al., 2012).

KKH biyolojisi hakkında edinilen bilgiler hematopoetik kök hücreler ve bu hücrelerin kötü huylu hali olan lösemi kök hücrelerinin tanımlanmasını sağlayan normal ve kötü huylu hematopoez çalışmalarına dayanmaktadır. Bu anlamda önemli gelişmeler 1980'lerin sonu ve 1990'ların başında floresan aktif hücre ayırımı (FACS) tekniği ile hücre yüzey belirteçleri baz alınarak normal hematopoetik kök hücrelerin ayırılması ile yaşanmıştır (Tan et al., 2006).

1997 yılında ilk olarak John ve ark. FACS tekniğini kullanarak akut miyeloid lösemiden (AML), farelere enjekte edildiğinde lösemin oluşmasını başlatan lösemi kök hücrelerinin varlığına dair kanıtlar bulmuşlardır. Bu grup sadece $CD34^+CD38^-$ hücre yüzey proteinlerini eksprese eden hücrelerin farelerde lösemi oluşturduklarını da göstermiştir. Bu çalışmalar kanser kök hücre biyolojisine oldukça önemli katkılar sağlamıştır (Lapidot et al., 1994; Bonnet and Dick, 1997)

KKH varlığını ilk olarak Al-Hajj ve ark. 2003 yılında yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Bu araştırmacılar insan meme kanseri hücrelerini immün sistemi baskılanmış fareler enjekte ettiklerinde sadece bir kısmının yeni tümör oluşturma kabiliyetine sahip olduklarını göstermişlerdir. Tümörojenik (tümör başlatıcı) özelliği olan hücreleri tümörojenik olmayan hücrelerden ayırmak amacıyla hücre yüzey protein ekspresyonlarına bakıldığında tümör başlatıcı özelliğinde olan hücrelerde $CD44^+CD24^{-/düşük}$ olduğunu tespit etmişlerdir. $CD44^+CD24^{-/düşük}$ ekspresyonu gösteren 100 adet hücrenin farelerde tümör oluşturduğu, bahsi geçen hücre yüzey ekspresyon proteinlerini eksprese etmeyen hücrelerden binlercesi enjekte edildiğinde tümör oluşturmadıkları görülmüştür (Al-Hajj et al., 2003).

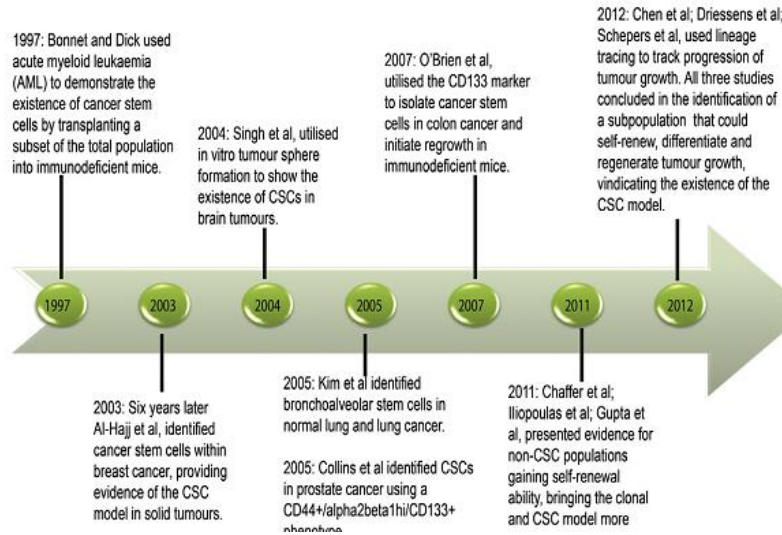
2003 yılında Singh ve ark. beyin tümörleri için KKH özelliği gösteren hücreleri saflaştırıp tanımlamışlardır. Elde edilen *in vitro* veriler beyin tümörlerinden *CD133* hücre yüzey proteinini kullanarak saflaştırılan bu hücrelerin çoğaldığı, farklılaştığı ve kendini yenileyebildiğini göstermiştir. Aynı araştırma grubu beyin tümörü kök hücrelerinin kendini yenileyebilme kapasitesinin oldukça agresif medullablastom örneklerinden çok daha yüksek olduğunu ve bu hücrelerin farklılaşarak *in vivo* tümör benzeri fenotip sergilediklerini de göstermiştir (Singh et al., 2003).

Daha sonra 2005 yılında Collins ve ark. insan prostat kanseri için KKH karakterleri gösteren hücrelerin varlığını göstermişlerdir. Yapılan çalışmada elde edilen hücrelerin kendini yenileyebilme kapasitesi gösterdiği ve koloni oluşturmayan fenotipik açıdan heterojen popülasyonlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Prostat kanseri kök hücresi olarak adlandırılan bu hücrelerin $CD44^+/\alpha2\beta1/CD133^+$ fenotipine sahip olduğu ve bu belirteçlerin tümör örneklerinden kök hücre izole etmek amacıyla kullanılabileceği ifade edilmiştir (Collins et al., 2005).

2007 yılına gelindiğinde ise O'Brien ve ark. kolon kanseri kök hücrelerini *CD133* hücre yüzey proteini ifadesi temel alarak tanımladıklarını duyurmuşlardır. Bu çalışmasında O'Brien ve ark. immün sistemi baskılanmış

farelere renal kapsül transplantasyonu yapmışlardır. Elde edilen veriler *CD133* ifadesi gösteren hücrelerin yeniden çoğalma kapasitesi olduğu, farklılaşabildiği ve seri transplantasyonlar sonucunda heterojen yapıda tümör oluşturabildiğini göstermiştir (O'Brien et al., 2007).

2011 yılında Chaffer ve ark. kanser kök hücre modellerine bazı önemli eklemeler yapmıştır. Yapılan çalışmada basal benzeri insan meme dokusu epitel hücresi alt popülasyonu tanımlanmıştır. Bu alt popülasyonun kendiliğinden kök hücrelere farklılaştığı raporlanmıştır. Ayrıca onkojenik transformasyonların kendiliğinden dönüşümü artırdığı ve dolayısı ile kanser kök hücre özelliği göstermeyen hücrelerin kanser kök hücre özelliği gösterdiği ifade edilmiştir (Chaffer et al., 2011).



Şekil 2.2 Kanser kök hücre çalışmalarının tarihsel gelişimi (O'Connor et al., 2014).

2.5. Kanser Gelişim Modelleri ve Kanser Kök Hücreleri

Kanserlerin oluşumunu ve gelişimini açıklayan farklı modeller bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda 4 farklı kanser gelişim modeli önerilmiştir; klonal evrim modeli (stokastik model), KKH modeli, evirtim modeli ve dinamik KKH modeli (Shackleton, 2010; O'Connor et al., 2014)

Klonal evrim ile kanser yayılım modeli; kanser hücrelerinin genetik açıdan kararsız durumda olmaları düşüncesini temel almaktadır. Klonal evrim

modelinde, kanser hücreleri yüksek tümör oluşturabilme potansiyellerine sahiptir ve bunlardan sadece bazıları bazı genetik mutasyonlar geçirerek kötü huylu, yayılım gösterebilen tümör hücrelerine dönüşmektedir (Lengauer et al., 1998). Bazı kanser türlerinde, tümör içi genetik heterojenlik bulunmuştur. Örneğin yemek borusu beze tümöründe kromozomlar floresan boyalarla işaretlenip moleküler sitogenetik inceleme yapılmış ve deoksiribonükleik asit (DNA) telomer uzunlukları saptanmıştır. Bu incelemede klonal heterojenliğin varlığı gösterilmiştir (Maley et al., 2006). Bu, bir kanser içerisindeki tümörojenik hücrelerden genetik açıdan farklı klonların oluşabileceğini göstermektedir. Hangi tümörojenik hücrelerde genetik değişikliklerin meydana gelebileceği ve farklı kanser türlerinde hastalığın farklı evrelerinde farklı bir şekilde meydana geleceği düşünülmektedir (Shackleton, 2010).

KKH modeline göre, tümör dokusunun içerisinde sadece bir grup hücre yeni tümör oluşturma kapasitesindedir ve tümör oluşturma özelliği taşımayan hücreler daha sonra böyle bir özellik geliştiremezler. Pratikte, KKH modelindeki kanser dokusunda tümörojenik hücreler, tümörojenik olmayan hücrelere göre daha az miktarda olmalıdır. Hücrelerin evriminin incelenebilmesi için tümörojenik hücrelerin tanımlanması ve tümör dokusundan ayrıştırılabilmesi gerekmektedir. Bu modelin kullanışlı olması tümör dokusundaki kanser kök hücrelerin ve kanser kök hücre özelliği göstermeyen hücrelerin ayrımlanmasına bağlı olduğu ifade edilmiştir (Shackleton, 2010; O'Connor et al., 2014; Reya et al., 2001). Kanser kök hücre alt popülasyonu barındıran bir tümörde kanser kök hücrelerin oluşması en az iki farklı yolla gerçekleşir. Birinci yolda normal kök hücrelerin gelişmesini sağlayan mutasyonların meydana gelmesiyle normal kök hücre kaynaklı hücrelerin oluşmasıdır. İkincide ise onkojenik mutasyonlara bağlı olarak hücrelerde meydana gelen değişimler sonucu hücreler postmitotik farklılaşma evresine girmeden çoğalmaya devam eder ve mutasyonların biriktiği kendini yenileyen hücrelerden meydana gelen bir havuzun oluşmasına neden olur. Bu havuz farklılaşmış hücrelerden türeyen kanser kök hücrelerin ortaya çıkmasına kaynaklık eder (Clarke and Fuller, 2006).

Evirtim modeli, tümörojenik kanser hücrelerinin, çoğalma ve yayılma açısından daha az veya daha çok aktif hücre profillerine kendi içlerinde dönüşümlerini temel almaktadır. Doğrudan bir kanıt olmamasına rağmen, *in vivo* çalışmalar, tümör içindeki cilt kanseri hücrelerinde, Brn-2 ifadesi, pigmentleşme ve hayatta kalma gibi ilişkiler, hücre dönüşümlerini destekler niteliktedir. Evirtim modeli, KKH modelinde tümörojenik hücreler ve tümörojenik olmayan hücreler arasındaki farkları belirlemek için önerilmiştir (Shackleton, 2010). Tümörojenik hücreler ve tümörojenik olmayan hücreler arasında iki yönlü hücre dönüşümü KKH modelinde düşünülmemiştir çünkü bu model sadece kanser kök hücrelerinin gerçek potansiyellerinin tümör oluşturduğunu düşünmektedir. KKH modeline göre, tümör içerisindeki hücrelerin tümörojenik olan grubu tümörojenik potansiyelini kaybetmemiş olarak açıklanmaktadır. KKH’da, tümörojenik olarak düşünülen bir hücre, herhangi bir zaman diliminde tümörojenitesini yitirebilmektedir (Ablett et al., 2012).

Son iki yılda bilinen KKH modeline oldukça önemli katkılar yapılarak *dinamik kanser kök hücre* modeli oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalar KKH’lerin farklılaşarak oluşturduğu öncül ve tümörojenik özelliği olmayan hücrelerin tekrar KKH özelliği kazanarak yeniden bölünebilme, farklılaşabilme yeteneğini kazandıklarını göstermişlerdir. Farklılaşmış hücreler ve KKH’ler arasında sürekli bir değişimin var olduğu KKH modelindeki hiyerarşinin geçici olduğu düşünülmektedir (Kreso and Dick, 2014). Bu sonuçlar dinamik KKH modelinin oluşmasına önemli katkılar sağlamıştır. Yeni bir yaklaşım olan dinamik KKH modeli dikkate alınarak yapılacak olan kanser sağaltım çalışmalarında hedef olarak hem farklılaşmış hem de KKH özelliği gösteren hücrelerin seçilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (O’Connor et al., 2014).

2.6. İnsan Kanserlerinde Kök Hücreler

Yapılan araştırmalar birçok kanser türünde KKH özelliğinde olan hücrelerin varlığını göstermiştir. Meme, beyin, akciğer, prostat, kolon, pankreas ve kemik tümörlerinde kök hücre varlığı gösterilmiştir.

2.6.1. Meme kanseri kök hücreleri

KKH varlığı ilk olarak tespit edilen kanser türü meme kanseridir. Al-Hajj ve ark. immün sistemi baskılanmış farelerle yaptıkları çalışmada enjekte ettikleri hücrelerden $CD44^+CD24^{-/düşük}$ fenotipinde olanların tekrar tümör oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin *in vitro* da mamosfer oluşturabildiği de gösterilmiştir (Al-Hajj et al., 2004; Al-Hajj and Clarke, 2004; Al-Hajj et al., 2003). Meme kanseri kök hücrelerinin belirlenmesinde kullanılan diğer önemli belirteç de yüksek ALDH-1 aktivitesidir (Ginestier et al., 2007). Daha sonra yapılan araştırmalar sonucunda $CD133^+$, $CD49F^+DLL1^{yüksek}DNER^{yüksek}$, $CD133^+CXCR4^+$ fenotiplerine sahip hücrelerin de meme kanseri kök hücre özelliği gösterdiği belirlenmiştir (Pece et al. 2010). $CD44^+CD24^{-/düşük}$ ve ya ALDH-1 ifadesi gösteren KKH meme kanserinin metastaz yapmasında öncül rol oynamaktadır. Bu fenotipe sahip hücrelerin kemik dokuya olan metastazdan da sorumlu olduğu belirlenmiştir (Hermann et al., 2010).

2.6.2. Beyin kanseri kök hücreleri

Pentaspın transmembran glikoproteini olan *CD133* birçok katı tümörlerde tümör başlatıcı hücrelerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Beyin tümörleri konusunda yapılan araştırmalar oldukça tehlikeli olan glioblastoma multiform (GBM) hedefli olmuştur. İlk olarak 2004 yılında Singh ve arkadaşları *CD133* hücre yüzey proteinini kullanarak beyin tümöründe KKH varlığını göstermiştir (Singh et al., 2003). Birkaç araştırmacı grubu *CD133* belirtecini GBM kök hücrelerinin izolasyonu için aday olarak göstermelerine rağmen bunun çok da doğru olmadığı düşünülmektedir

(Hermann et al., 2010). Daha sonra yayınlanan raporlarda *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda *CD133* ifade varlığının tümörojenik olan ve olmayan hücreler arasında bir fark oluşturmadığı vurgulanmıştır (Joo et al., 2008). Fakat KKH'lerin belirlenmesinde *CD133*'ün farklı katlanmasıyla oluşan klonu *AC133*'ün kullanılabileceği ifade edilmiştir. Son olarak yapılan bazı çalışmalar *CD133* ifadesi olsa bile SSEA-1⁺ (durum spesifik embriyonik antijen-1)'in oldukça tümörojenik alt popülasyonunun belirlenmesi için kullanılabileceği gösterilmiştir (Son et al. 2009).

Yapılan araştırmalar GBM kök hücrelerinin normal sinir sistemi kök hücre özelliklerini sergilediklerini göstermiştir. Bu hücreler normal kök hücreler gibi nörosfer olarak büyüebilmekte, farklılaşarak nöronal ve makroglial hücre tiplerini oluşturabilmekte, kendini yenileyebilmekte ve en önemlisi *in vivo* tümör dokusu oluşturabilmektedirler. Yapılan transplantasyon çalışmaları GBM kök hücrelerinin yüksek invazif karakter gösteren tümörler oluşturduğunu göstermiştir (Mannelli and Gallo, 2012; Joo et al., 2008).

GBM kök hücreleri normal sinir sistemi kök hücrelerinden farklı hücre yüzey belirteç ekspresyon paterni göstermektedirler. Fakat *in vivo* tümör yapısında normal sinir sistemi kök hücreleri gibi hipoksik koşullarda mikro çevre oluşturdıkları raporlanmıştır (Hermann et al., 2010).

2.6.3. Kolon kanseri kök hücreleri

Normal bir hücrenin kanserleşme süreci birkaç katı tümörde olduğu gibi kolon kanserinde de iyi bir şekilde anlaşılmıştır. Kolon kanserinde kanserleşmenin birkaç kök hücreden başladığı Barker ve ark. tarafından gösterilmiştir. Bu süreçte ekspresyon belirteci olarak *Lgr5* (*leucine-rich repeat with G-protein-coupled receptor*) kullanılmıştır. Fakat bu reseptörün tümör oluşumundaki rolünün tam olarak aydınlatılamaması ve bu proteine spesifik antikörün üretilmemesi kanser kök hücre izolasyonunda kullanımını kısıtlamıştır (Barker et al., 2007).

2007 yılında kolon kanser kök hücreleri ilk olarak farklı iki grup tarafından art arda *CD133* kullanılarak elde edilmiştir (O'Brien et al. 2007). Daha sonra Dalerba ve ark. yaptıkları çalışmada *CD44* ve epitelyal hücre adezyon molekülü (EpCAM) kombinasyonunu kullanmıştır. Aynı araştırma grubu *CD133* kullanılmasıyla elde edilen verilerle karşılaştırıldığında *CD166* kullanıldığında elde edilen sonuçların daha tutarlı olduklarını göstermiştir (Dalerba et al., 2007).

Shmelkov ve ark. yaptıkları çalışmada *CD133* sentezinin KKH'lerde olmadığını aksine farklılaşmış hücrelerde olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışma kapsamında hem *CD133*⁺ hem de *CD133*⁻ hücrelerin immün sistemi baskılanmış farelerde metastazik tümörlerin oluşmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *CD133*⁻ metastazik hücrelerin oldukça agresif tümörleri oluştuğu ve bu karakterdeki hücrelerin fenotipik olarak kanser başlatıcı hücrelerde bulunan belirteçleri sentezlediği raporlanmıştır (Shmelkov et al., 2008).

2.6.4. Pankreas kanseri kök hücreleri

İlk olarak pankreas kanserinde KKH varlığı Li ve ark. tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu araştırma grubu immün sistemi baskılanmış fareleri kullanarak insan pankreas adenosarkomasında oldukça tümöröjenik olan *CD44*⁺*CD24*⁺*EpCAM*⁺ fenotipinde hücreleri tanımlamışlardır. Yapılan çalışmalar sadece bu hücrelerin tümör oluşturabildiği, tipik kök hücre özellikleri olan yeniden yenilenme, farklılaşmış öncül hücrelerin üretilmesi ve gelişme için gerekli sinyal yollarının aktifleştirilmesi gibi özellikleri taşıdıkları gösterilmiştir (C. Li et al., 2007). Daha sonra Hermann ve ark. *CD133* ifadesi gösteren primer ve pankreas hücre hatların yeniden yenilenebilme, sfer oluşturabilme ve *in vivo* tümör oluşturabilme yeteneğinde olduklarını göstermiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarla ALHD-1 ifade eden hücrelerin de KKH özelliğinde oldukları gösterilmiştir (Hermann et al., 2007).

2.7. Normal Kök Hücreler ve Kanser Kök Hücreleri Arasındaki Farklar

Normal kök hücrelerde genetik sağlamlık fonksiyonların devam ettirilmesi için kritik öneme sahiptir. Normal kök hücrelerde mutasyonların rahat bir şekilde meydana gelmesi konsensüsün kolay bir şekilde bozulmasını dolayısıyla meydana gelen mutasyonların bir sonraki kök hücre jenerasyonlarına geçmesini oldukça kolaylaştırır (Shackleton 2010). Bu da kök hücrelerin bulunduğu normal dokularda fonksiyon bozuklukları ve uzun dönemde kanserleşmenin meydana gelmesine neden olabilmektedir. Yüksek ölüm oranına sahip kanser türü teşhisi konan hastaların yüksek derecede radyasyona maruz kaldıkları dolayısıyla uzun dönemde normal kök hücrelerde meydana gelen genetik mutasyonlar sonucu kanserlerin geliştiği düşünülmektedir. Sonuç olarak normal kök hücrelerin genetik sağlamlıklarının dikkatli bir şekilde düzenlendiği ifade edilmektedir (Sahin and DePinho, 2010).

Tümörojenik hücelere bakıldığında genetik integrite kontrol mekanizmaları oldukça zayıf kalmaktadır. Dolayısı ile zamanla çok farklı mutasyonlar meydana gelebilmekte bu da tümörün çeşitli tedavilere cevap vermesinde önemli problemlere neden olmaktadır. Sonuç olarak bazı tümörojenik kanser hücrelerinin genetik sağlamlılıklarında meydana gelen bozukluklar bu hücrelerin normal kök hücrelerden farklı kılmaktadır (Shackleton, 2010).

Normal doku kök hücrelerinin farklı fonksiyonel durumlar arasındaki evirtimi homeostatisin düzenlenmesi açısından oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar fare hematopoetik kök hücrelerinin değişen koşullara göre aktif ya da pasif hale farklılaşabildiklerini göstermiştir. Ayrıca fare hematopoetik kök hücrelerin aktif formunda *CD34* ekspresyonunun arttığı durağan fazda ise azaldığı görülmüştür (Wilson et al., 2008). Kök hücrelerin organın ve organizmanın ihtiyacına göre evrildiğinin diğer bir örneğini deride görmekteyiz. Deri yapısının korunduğu durumlarda interfoliküler epidermisin

varlığı interfoliküler epidermal kök hücreleri tarafından korunmaktadır (Levy et al., 2005) Ancak yaralanma sonucu oluşan deri bozukluklarının giderilmesinde normal görevleri saç folicülünün devamlılığını sağlamak olan saç folikülü kök hücreleri interfoliküler epidermisin iyileşmesinde rol almaya başlar (Ito et al., 2007). Tüm bu sonuçlar normal doku kök hücrelerinin değişen çevre şartlarına göre farklılaştığını ve aktif hala geldiğini kanıtlar niteliktedir (Shackleton, 2010).

Tümörojenik kanser hücrelerinde meydana gelen evirtimler bu hücrelerin kimyasal tedavide kullanılan ajanlara veya ilaçlara karşı direnç oluşturmayı sağladığı yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Örneğin meme kanserinde e-kaderinlerin susturulması sonucu meme kanseri hücrelerinde epidermal-mezenşimal dönüşümün (EMT) indüklendiği ve meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaca karşı direncin geliştiği gösterilmiştir (Gupta et al., 2009).

Öte yandan tümörojenik kanser hücrelerinde meydana gelen evirtim süreçlerinin tümör dokusunda farklı fenotiplerde hücre alt gruplarının oluşum mekanizmalarını anlamada yardımcı olacağı ifade edilmiştir (Gangopadhyay et al., 2013).

Kök hücre biyolojisinde hücrelerin farklılaşma yeteneğini kaybetmeden çoğalma özelliği göstermesi oldukça önemli bir yere sahiptir (Bianco and Robey, 2001). Normal doku spesifik hücrelerin oluşmasında farklılaşmış fenotipe sahip olan hücrelerin varlığı kendini yenileyebilme potansiyelinin kaybolması ve total hücre çoğalma kapasitesinin azalmasıyla meydana gelmektedir (Reya et al., 2001). En yüksek kendini yenileyebilme kapasitesine sahip olduğu bilinen hücre tipi EKH'lardır. Bu hücreler pluripotent özellik göstererek doku spesifik kök hücreler dahil tüm hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. Fakat doku spesifik kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi oldukça kısıtlı olup, söz konusu dokuya ait hücrelerin oluşmasından sorumludur (O'Connor et al., 2014) Birçok normal dokunun gelişiminde

hücrenin çoğalma kapasitesi ve hücrenin farklılaşma özellikleri arasında oldukça sıkı bir şekilde kontrol edilen ters ilişkinin varlığı gösterilmiştir (Shackleton, 2010).

Kanserin oluşumu ve gelişiminden sorumlu tümör şekillendirebilme yeteneğine sahip hücrelerin kaynaklandıkları hücelere fenotipik olarak benzemesine gerek olmadığı bilinmektedir (Lengauer et al., 1998). Ayrıca KKH modelinde tümörojenik hücrelerin morfolojik olarak da farklılaşmasına gerek olmadığı tespit edilmiştir. Örneğin meme kanseri kök hücreleri oluşturdukları tümörojenik olmayan hücelere morfolojik olarak benzedikleri raporlanmıştır (Al-Hajj et al., 2003). Ayrıca, normal hücre gelişmesinde gözlemlenen çoğalma ve farklılaşma arasındaki ters ilişkinin kanser kök hücreleri bulunduran kanserler için zorunlu olmadığı sonucuna varılmıştır.

Aynı dokuda bulunan KKH ve normal kök hücrelerin aynı belirteçleri ifade etmesi beklenmemektedir. Hücre yüzey markörleri kök hücreleri farklılaşmış hücrelerden ayırt etmekte önemli bir araçtır (Clarke and Fuller, 2006). Belirteçlerin diğer önemli bir kullanım amacı kök hücre özelliği taşıyan hücreleri farklılaşmış olan hücrelerden ayırmaktır. Normal kök hücrelerin ayrılması için kullanılan markörler aynı zamanda tümörojenik olan hücre alt popülasyonları, tümörojenik olmayan hücrelerden de ayrılmasında kullanılır (Hermann et al., 2010).

Birçok çalışmada aynı organda bulunan kök hücrelerin KKH ile ortak belirteç ifade profilleri gösterdiği ifade edilmiştir. Örneğin meme dokusu kök hücreleri ile tümörojenik kök hücrelerinde *CD24* ifadesi bozuklukların olduğu görülmüştür (Al-Hajj and Clarke, 2004). Fakat öte yandan aynı dokudaki KKH'lerde bulunan kök hücre belirteçleri normal kök hücre belirteçleri ile aynı olmak zorunda olmadığı da ifade edilmiştir. Normal kök hücrelerdeki belirteç ifade örüntüsü gelişim boyunca neredeyse sabit kalmaktadır (Shackleton, 2010).

CD133 belirteci hem beyin tümörlerinde hem pankreas tümörlerinde hem de kemik kanseri tümörlerinde kök hücre varlığını göstermek için kullanılır (C. Li et al., 2007; Kelly et al., 2010; Hemmati et al., 2003). Fakat daha önce de belirtildiği gibi bazı çalışmalar *CD133* proteinin tümörojenik kök hücrelerinin belirlenmesinde kullanılabilen genel bir belirteç olamayacağını göstermiştir. Bunun yanı sıra genel olarak kanser hücre fenotipi, diğer bir deyişle belirteç ekspresyonu tek başına tümörojenik hücrelerin tanımlanmasında yeterli olamamaktadır (Hermann et al., 2010; Shackleton, 2010).

2.8 Kanser Kök Hücrelerin Yerleşimi ve Mikro-çevresi

1978 yılında Schofield hematopoetik kök hücrelerin farklılaşma ve yeni kök hücrelerinin oluşması mekanizmalarının düzenlenmesini sağlayan bir niş ya da diğer bir deyişle özel bir lokalizasyon olabileceğini önermiştir. Daha sonra kök hücre nişinin, kök hücreler ile fiziksel teması olan hücrelerin bulunduğu veya hücrelerin köklüklerini devam etmesini sağlayan faktörlerin salgılandığı fizyolojik mikro-çevre olabileceği öngörülmüştür (Sneddon and Werb, 2007).

Kök hücrelerin oluşturduğu nişte yer alan hücrelerin kök hücrelerle olan etkileşimleri, uzaktan gelen farklılaşma sinyallerinin hücrelere iletilmesi ve yeniden yenilenebilme özelliklerini devam etmede oldukça önemli rolleri vardır. Son yıllarda bağırsak, sinir, epidermal ve hematopoetik sistemi kök hücreleri için mikro-çevreler tanımlanmıştır. Yetişkin memeli kök hücre nişlerinde görülen hücre-hücre etkileşimleri ve bazı faktörlerin salınması kök hücrelerin nasıl davranacağını belirlemektedir. Hedgehog, Wnts, BMPs, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve Notch gibi sinyal molekülleri hücre mikro çevresinde bulunmakta ve hücrenin nasıl hareket edeceğini belirleme noktasında önemli görevler üstlenmektedir (Kaplan et al., 2007; Sneddon and Werb, 2007).

Son yapılan çalışmalar klasik inanıştan farklı olarak kök hücre ve mikro-çevresi arasındaki ilişkinin oldukça dinamik olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalarla kök hücrelerin farklı mikro-çevreler oluşturabileceği gösterilmiştir. Örneğin hematopoetik kök hücrelerinin osteoblast ve damar nişi oluşturdıkları ve bu iki evre arasında gidip geldikleri ifade edilmiştir (Kaplan et al.,2007; L. Li and Xie, 2005).

Normal bir kolonik kriptte, kök hücrelerin devamlılığının sağlanmasında kök hücre nişinde panet hücreleri (ince bağırsakların kript epitellerinin alt kısmında bulunan piramit biçimli, iri granüllü asidofilik hücreler).önemli rol oynamaktadır. Kolon kanseri gelişim sürecinde nişte yer alan normal hücreler fonksiyonlarını kaybeder ve mikro evre tümör oluşumundan sorumlu kanser kök hücrelerinin oluşmasına neden olur (S. Chen and Huang, 2014).

Meme tümörleri baz alınarak yapılan gözlemler sonucunda kanser stroması yoğun bir şekilde bağ doku ve fibroblast hücrelerinin varlığı ile karakterize edilmiştir. Stromal hücreler mezenşimal hatlardan türevlenirler. Fibroblast hücreleri en fazla bulunan stromal hücrelerdir. Tümör mikro çevresinde bulunan fibroblast hücreleri “kanseri-İlgili fibroblast” (CAF) olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler MKH, endotel hücreler, adipositler ve kanser epitel hücrelerinden köken alabilmektedir. Ayrıca, bu hücreler kanserin gelişmesi ve invazyonunda önemli işlev görmektedir (Jotzu et al., 2009; S. Chen and Huang, 2014; Sneddon and Werb, 2007).

KKH’lerin içinde bulundukları mikro evre ile etkileşimlerinin açıklanabilmesi için birçok olası model tanımlamak mümkündür. Olası modelleri şu şekilde sıralayabiliriz:

1. KKH’ler gelişmek için ayrı bir nişe ihtiyaç duymayabilirler. Normal kök hücrelerin nişini kullanabilirler,
2. KKH’lerin aktif hale gelmesi için ayrı bir mikro çevreye ihtiyaç olabilir,

3. Normal kök hücreler gibi KKH'lerin asimetrik bölünmesi ve kök hücre özelliklerinin devamlılığının sağlanmasında KKH'lerin ortamda kalması için bir niş ihtiyaç duyulabilir,
4. KKH'lere ait nişin aktifleşmesi için tümörün gelişiminde rol alan ve daha önceden oluşturulmuş nişten kaynaklanan sinyaller önemli rol alabilir,
5. KKH'ler niş bağımsız olabilirler. Bu da bu hücrelerin kök hücre özelliklerini devam ettirebilmeleri için gerekli faktörlerin kendileri tarafından sağlayabildikleri anlamına gelmektedir,
6. KKH'lerin farklılaşması ya da ölmesi için gerekli faktörleri salgılayan ayrı bir niş olabilir (Sneddon and Werb, 2007).

2.9 Kemik Kanseri Kök Hücreleri

Kemik kanseri vakaları yetişkin gençlerde ve 65 yaş üstü yetişkinlerde sıklıkla görülmektedir. Kemik kanseri tümörlerinde de son zamanlarda oldukça önemli bir konu olan KKH varlığı yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

Di Fiore ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada MG-63 osteosarkoma hücre hattından uzun dönemli 3-aminobenzamid (3AB) uygulaması yaparak pluripotent kök hücre belirteçlerinden eksprese eden ve 3AB-OS olarak nitelendirilen yeni bir KKH varlığı gösterilmiştir. 3AB-OS hücreleri, MG-63 hücreleri ile karşılaştırıldığında oldukça küçük oldukları, sfer oluşturma kapasitelerinin oldukça yüksek olduğu, kendini yenileyebilme yetilerinin güçlü olduğu ve hücre çoğalma safhasında salgılanan hücre döngüsü belirteçlerinin yüksek oranda ifade edildiği görülmüştür. Ayrıca, izole edilen bu hücrelerin *CD133* ekspresyon profili gösterdikleri, MG-63 ile karşılaştırıldığında osteojenik ve adipojenik farklılaşmaya daha az yatkın oldukları ve kök hücre durumunda kalmak için gerekli olan *Oct3/4*, *hTERT*, *nükleostemin* ve *Nanog* gibi belirteçlerin ifade edildiği de gösterilmiştir (Di Fiore et al., 2009).

Di Fiore ve grubunun yaptığı diğer bir çalışmada MG-63 osteosarkoma hücre dizisinden izole edilen kemik kanseri kök hücrelerinin farelerde tümör oluşturup oluşturmadığına bakmışlardır. Elde edilen veriler 3AB-OS hücrelerin farelerde tümör oluşturduğunu ve oluşan tümörlerde *pAKT*, *beta1-integrin* ve *pFAK*, *nuclear beta-catenin*, *c-Myc*, *sklin D2* ifadelerinin oldukça yüksek olduğunu göstermiştir (Di Fiore et al., 2012).

Yine Di Fiore ve arkadaşlarının çalışmalarında kemik kanseri kök hücre özellikleri gösterdiği belirlenen 3AB-OS hücrelerin *in vitro* koşullarda endoderm, mezoderm ve ektodermden kaynaklı nesillere farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Meydana gelen farklılaşmanın morfolojik, moleküler ve fonksiyonel olduğu vurgulanmıştır (Di Fiore et al., 2013).

2005 yılında Gibbs ve ark. insan kemik tümör biyopsileri ve MG-63 osteosarkoma hücre dizisini kullanarak yaptıkları çalışmada kendini yenileyebilme özelliğinde olan bir alt popülasyonunun varlığını göstermişlerdir. Bu alt popülasyona sahip hücrelerin sarkosfer oluşturma yetkinliklerinin yüksek ve STAT3 yol izinin aktif olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin embriyonik kök hücre belirteçleri olan *Oct3/4* ve *nanog* ifadesi gösterdikleri gözlemlenmiştir. Yüzeye tutunan hücreler ile karşılaştırıldığında bu belirteç ifadelerinin sarkosferlerde daha fazla olduğu görülmüştür (Gibbs et al., 2005).

Kelly ve ark. karşılaştırma grubu olarak döner hücre kültür sistemi (RCCS) kullandıkları çalışmada 3 adet osteosarkoma hücre hattı (SaOs-2, HOS, U2OS) ve diğer birçok kanser tipi hücre hattından *CD133* ifade eden hücreleri NASA'nın geliştirdiği hidrodinamik odaklı biyoreaktör (HFB) kullanarak ayırmış ve kültüre etmişlerdir. Her iki biyoreaktör sistemi de hücrelerin tutunamadığı koşulların oluşturulması amacıyla kullanılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonunda elde edilen veriler HFB sisteminde *CD133*⁺ hücre büyümesinin RCCS sistemine göre daha fazla artırdığını, hücre çoğalmasının 15 kat fazla olduğunu ve *CD133*⁺ hücrelerinin kimyasal

muameleye oldukça dirençli olduklarını göstermiştir. Aynı çalışmada elde edilen diğer önemli bir veri de *CD133* ifade eden hücre oranlarının SaOs-2 hücrelerinde $10,86 \pm 6,8$; HOS hücrelerinde $37,7 \pm 7,8$ ve U2OS hücrelerinde ise $1,06 \pm 0,05$ olmasıdır (Kelly et al., 2010).

Tirino ve ark. SaOs-2, MG-63 ve U2OS hücre dizilerini kullanarak osteosarkomada kök hücre varlığını göstermeye çalışmış ve 3 hücre grubunda iki farklı hücre alt popülasyonun varlığı tespit edilmiştir; $CD133^+$ (%3-5) ve $CD133^-$. Antikor boyamalarında $CD133^-$ hücrelerinin *CD133* ve *Ki-67* antijenini ifade edemedikleri $CD133^+$ hücrelerin ise bu belirteçleri eksprese ettikleri görülmüştür. Bu sonuçlara ek olarak $CD133^+$ hücrelerinin serumsuz ortamda kültüre edildikten 24 saat sonra sfer oluşturdıkları $CD133^-$ ise oluşturmadıkları tespit edilmiştir (Tirino et al., 2008).

Gene Tirino ve ark. KKH'lerin tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla yaptıkları diğer bir çalışmada da 21 farklı insan kemik tümörü örneklerinde *CD29*, *CD34*, *CD44*, *CD90*, *CD117* ve *CD133* gibi köklük ve farklılaşma antijen varlığını sitometrik yöntemlerle araştırmışlardır. Ayrıca immün sistemi baskılanmış fareler kullanılarak tanımlanan kök hücrelerin tümör oluşturma kabiliyeti de incelenmiştir. Elde edilen veriler tüm örneklerin *CD133*, *CD44* ve *CD29* antijenlerini ifade ettikleri ve sfer oluşturma kapasitesi olan $CD133^+$ hücrelerin farelerde tümör oluşturabildiklerini, *CD133* ekspresyonun osteosarkomda kanser kök hücre varlığının tanımlanması için kullanılabileceğini göstermişlerdir (Tirino et al., 2011).

Li ve ark. SaOs-2 ve birçok farklı osteosarkom dokusunda $CD133^+$ hücrelerin bulunduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, $CD133^+$ hücreleri kültüre alındıklarında hücrelerin G0/G1 durumundan G2/M ve S hücre döngülerine girdiği ve kültür süresi arttıkça $CD133^+$ hücre seviyesinin azalarak normal seviye düştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca $CD133^-$ hücreleri ile karşılaştırıldığında $CD133^+$ hücrelerinin koloni oluşturma etkinliğinin fazla olduğu ve kök hücre ilintili genlerin, çoklu ilaç direnç protein -1 (MDR1) ve

Sox2, *CD133*⁺ hücrelerinde belirgin bir şekilde yüksek olduğu bulgularla desteklenmiştir (J. Li et al., 2013).

Tian ve ark. U2OS, SaOs-2 ve MNNG/HOS olmak üzere üç farklı osteosarkoma hücre dizisinde *CD271*⁺ hücrelerinin kendini yenileyebildiklerini, sfer oluşturabildiklerini, *OCT3/4*, *STAT3* ve *nanog* gibi EKH pluripotensi genlerini eksprese ettiklerini göstermiştir. Ayrıca, *CD271*⁺ hücrelerinin *in vivo* tümör oluşturma yetisinde oldukları da vurgulanmıştır. Tüm bu sonuçlar osteosarkomada farklı hücre alt popülasyonlarının olabileceğini ve KKH varlığı için farklı stratejilerin kullanılabileceğini göstermiştir (Tian et al., 2014).

Tümör başlatıcı hücrelerin genellikle sessiz evrede oldukları ve proteozom ekspresyonlarını azalttıkları bilinmektedir. Tamari ve ark. U2-OS ve MG-63 osteosarkoma hücre dizilerinden FACS tekniği ile proteozom aktivitesinin düşük olduğu hücreleri ayırmış ve bu hücrelerin asimetric bölünme ve artan sfer oluşturma kapasitesi gösterdiğini dolayısı ile KKH özelliği gösterdiklerini tespit etmiştir (Tamari et al., 2014)

2.10 Kanser Çalışmalarında 3 Boyutlu Kültür Sistemlerinin Önemi

2B kültür sistemi geleneksel olarak iyi bilinen ve pek çok araştırmacı tarafından kullanılan bir sistem olmak ile birlikte *in vivo* ortamı iyi bir şekilde yansıtamamaktadır. 2B sistemlerde hücrenin tutunduğu yüzeye bağlı olarak tepkileri, salgılanan maddeler ve eksprese ettiği genler farklılık göstermektedir. Yapılan çalışma ve amaca göre farklılık gösterse de 3B kültür sistemi 2B kültür sistemine göre *in vivo* sisteme daha yakın olabilmektedir (Freshney, 2005; Abbott, 2003). 3B kültür sistemlerinde, salgılanan hücre yüzey reseptörleri, çoğalma özellikleri, hücre yoğunluğu ve metabolik fonksiyonlar 2B kültür sistemleri ile karşılaştırıldığında farklılıklar göstermektedir. Örneğin, insan yumurtalık kanser hücrelerinin 3B kültürde taksole karşı gösterdikleri dayanıklılığın 2B kültüre göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Langer and Tirrell, 2004).

Kanser hücre kültürü çalışmalarında çoklukla geleneksel 2B hücre kültürü sistemleri kullanılmaktadır. Fakat kanser terapötüğü geliştirme ve sinyal çalışmalarında bu monolayer kültürler *in vivo* tümörlere göre önemli farklılıklar göstermektedir. 2B kültürlerde hücre gelişiminde hücreler; hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyonu, çoğalma özellikleri, hücre yoğunluğu ve metabolik fonksiyonlar farklıdır (Horning et al., 2008). Bu sistemlerdeki hücrelerin ekstraselüler matriks yapısında, sinyal yollarında, hücre tutunma molekülleri ve büyüme faktörü sentezinde gözlenen değişimler sonucunda hücre polaritesi, farklılaşması gibi birçok fonksiyon değişerek *in vivo* doku özelliklerini yitirmektedir (Yamada and Cukierman, 2007). 2B kültürlerdeki bu sorunların yanı sıra *in vivo* çalışmalardaki fazla sayıda değişkenin getirdiği sorunlar ve analiz zorluklarını aşabilmek için 3B kanser modelleri bir köprü olarak görülmektedir. Bu sebeple kanser terapötüğü geliştirme ve kanser sinyal yolları araştırmalarında kullanılmak üzere birçok *in vitro* 3B model oluşturulmuştur. Hücre agregat modelleri (Zou et al., 2010), kitosan-aljinat doku iskeleleri (Kievit et al. 2010), kolajen bazlı hidrojel (Hsiao et al., 2009), poli-kaprolakton/kolajen fibrilleri ve bakteriyel selüloz fibrillerinin (Szot et al., 2011) kullanımı bunlardan bazılarıdır. Ancak, bugüne kadar üretilen üç boyutlu kanser modelleri de yer yer *in vivo* tümör yapısını yansıtmakta yetersiz kalmıştır.

Tümör modellerinde kullanılan 3B modeller 2B kültür ile karşılaştırıldığında çok daha gerçekçi ve anlamlı bilgiler sağlarlar. Dolayısı ile mikro doku teknolojisi ile oluşturulan yapılar 2B tekniklere alternatif bir çözüm sunmaktadır. Bununla beraber 3B modellerin de, uygulanan yöntemle ilgili bazı sorunları bulunmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Tümör modellerinin oluşturma yöntemlerinin karşılaştırılması

3B kültür		Kaynak	2B kültür		Kaynak
Avantaj	Dezavantaj		Avantaj	Dezavantaj	

<i>in vivo</i> tümör dokusuna hacimsel büyüme kinetiği, hücrel heterojenite ve farklılaşma karakteristikleri gibi özellikler açısından benzerlik gösterirler.	Çok sayıda üretme zorluğu	(Mueller-Klieser ,1997) (Tung et al. 2011)	2B kültürler kolaydır ve hücrelerin yaşamları için elverişli kültürlerdir.	3B kültürler göre hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyonu, çoğalma özellikleri, hücre yoğunluğu ve metabolik fonksiyonlar farklıdır.	(Horning et al., 2008; F. Xu and Burg, 2007)
Tümör hücrelerin 3B küre şeklinde büyümesi <i>in vivo</i> koşullara oldukça benzerlik gösterir. Hücre çeşidi bakımından <i>in vivo</i> tümör dokusunu taklit ederler.	Kullanılan bazı yöntemlerin maliyeti yüksektir.	(Fennema et al., 2013; Hirschhaeuser et al., 2010; Kunz-Schughart et al., 2004)		Hücrelerin polaritesi ve farklılaşma potansiyeli değişerek <i>in vivo</i> doku özellikleri yitirilir.	(Yamada and Cukierman, 2007)
Anti-kanser ilaç taramaları için oldukça uygun bir araçtır.	Kullanılan bazı yöntemler zaman, tecrübe ve belli bir teknoloji kapasitesi gerektirir.	(Del Duca et al., 2004; Dubessy et al., 2000; Esguerra et al., 2010; Torisawa et al., 2007)		2B elde edilen sonuçlar kanser tedavisinde kullanıldığında tedavide başarılı olunmamaktadır	(Fennema et al., 2013)
Kullanılan bazı yöntemler mikro dokuların boyut ve şeklinde homojeniteyi sağlarlar.	Bazı tekniklerde hücreler yüzeyle etkileşim halinde olduklarından adezyon moleküllerinin ekspresyonunda değişiklikler meydana gelmektedir.	(Fennema et al. 2013),(Napolitano et al. 2007a) (Oudar 2000), (Tung et al. 2011)		Hücrelerin 3B ortamda gösterdikleri gen ekspresyonu, hücre-hücre ve hücre –matriks etkileşimlerini göstermezler.	(L. Chen et al., 2012)
Bazı yöntemler ucuz ve tecrübe gerektirmezler.		(Rago et al. 2008) (L. Chen et al. 2012)			
Bazı tekniklerde pH, nütrient konsantrasyonu, glikoz ve oksijen gibi fiziko-kimyasal parametrelerin kontrolü kolayca yapılabilmektedir.		(Dubessy et al. 2000; Sutherland et al., 1970)			

2.11 Mikro Doku Teknolojisi

Doku mühendisliği uygulamalarında 3B doku oluşturma teknikleri temelde iskele kullanılan ve kullanılmayan olmak üzere iki çeşittir. İskele

kullanılarak oluşturulan 3B modellerde malzeme olarak çeşitli polimerik ya da biyolojik materyaller tercih edilmektedir. İskele kullanılmadan oluşturulan 3B modellerde hücreler kendiliğinden bir araya gelerek 3B yapılar oluştururlar. İskele kullanılmadan 3B yapıların oluşturduğu teknikleri 3 ana başlıkta toplamak mümkündür; hücre tabakası tekniği, tek hücre enjeksiyonu ve mikro doku teknolojisi (Kelm and Fussenegger, 2010).

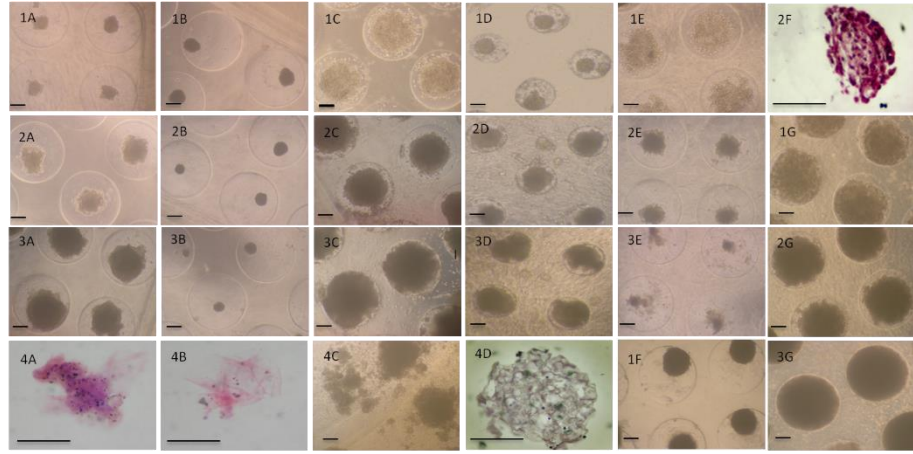
Mikro dokuların oluşturulması için hücrelerin tutunamadığı özel yüzeyler kullanılmaktadır (Napolitano et al., 2007a). Hücreler yüzeye tutunamadıklarından tabakalaşma meydana gelmekte ve mikro dokular oluşmaktadır (T. Achilli et al., 2014). Hücre tabakalanması, bazı hücre yüzey adezyon moleküllerinin görev aldığı bir prosestir. Bu süreç, diferansiyel adezyon hipotezi (DAH) denilen hipotezle açıklanmaktadır. Bu hipoteze göre mikro dokularda her hücre kendi başına bir ayrık sistemdir ve her hücrenin sahip olduğu kohesif ve adesif kuvvetler vardır. Mikro dokuların oluşmasında bu iki kuvvetin oldukça önemli rolleri bulunmaktadır. Hücrelerin tabakalamasında kuvvetli kohesif kuvvete sahip olan hücreler, oluşan mikro dokunun merkezine yerleşirken daha zayıf kuvvetleri olan hücreler mikro dokunun dış kabuğunda tabakalaşma meydana getirmektedirler. Bu iki önemli kuvvete ek olarak hücre iskeletinin biyomekanik özelliklerinin de önemli rolü olduğu ifade edilmiştir (T.-M. Achilli et al., 2011).

Mikro doku oluşum sürecinde meydana gelen tabakalaşma sürecinde baskın olarak etkili olan başlıca hücre adezyon proteinleri E-kaderinlerdir (Duguay et al., 2003). Fakat diğer hücre elemanlarının da bu süreçte önemli olabileceklerine dair literatür bilgileri mevcuttur. Bao ve ark. mikro doku oluşum sürecinde etkili olabilecek bağlantı proteinini tanımlanması amacıyla C6 glioblastoma hücreleri kullanılarak 3D Petri Dish® tekniği ile mikro dokular oluşturmuşlardır. Mikro doku oluşturulan hücrelerde paneksin 1 (Pax1) bloke edildiğinde tabakalaşma sürecinin engellendiği gözlemlenmiştir. Bu da Pax1 molekülünün tabakalaşma prosesinde ivmelendirme etkisi olabileceğini kanıtlamıştır (Bao et al., 2012).

Diğer bir çalışmada Bao ve ark. gap bağlantı kanallarında önemli bir görevi olduğu bilinen koneksin proteinlerinin bir araya gelerek oluşturduğu heksamer yapısını gösteren koneksin-43 (CX43)'ün tabakalaşma sürecinde önemli olduğunu göstermişlerdir. Normal insan fibroblast hücreleri (NHF), insan KGN granülosa hücreleri (KGN) ve insan meme kanseri hücreleri (MCF-7) kullanılarak oluşturulan mikro dokularda Cx43 bloke edildiğinde tabakalaşma kinetiğinin anlamlı bir şekilde inhibe olduğu görülmüştür. Ayrıca gap bağlantı kanallarında geçirgenliği artıran Gap26 koneksinin KGN ve NHF hücrelerinin tabakalaşma sürecini artırdığı gösterilmiştir (Bao et al., 2011). Tüm bu sonuçlar gap bağlantı proteinlerinin de mikro doku oluşum sürecinde oldukça önemli olan tabakalaşma aşamasında önemli görevler üstlendiğini kanıtlar niteliktedir.

2.11.1 Doku mühendisliğinde mikro doku teknolojisi

Mikro dokular ilgilenilen dokudan enzimatik ya da mekaniksel olarak izole edilen primer hücrelerden, hücre hatlarından (Friedrich et al. 2009) veya kök hücrelerden üretilirler. Mikro dokular (sferoid, sfer ve hücre agregatı olarak da isimlendirilir) özellikle onkolojide tümör benzeri mikro-çevre oluşturmak ya da gelişim biyolojisinde erken gelişim safhalarını taklit etmek amacıyla embriyoid kitlelerinin oluşturulmasında uzun zamandır kullanılmaktadır (Desoize and Jardillier, 2000; Kelm et al., 2010). Birçok farklı hücre tipinin kendiliğinden bir araya gelerek mikro doku oluşturma kabiliyetine sahip oldukları gösterilmiştir (Ozturk et al., 2013) (Şekil-2.3). Mikro dokular *in vitro* 'da daha geniş mühendislik ürünü dokular oluşturmak için yapı bloğu olarak kullanılmışlardır (Jakab et al. 2004). Bu anlamda sferoidlerin mili metre boyutunda makro dokular oluşturmak için kendiliğinden dizilebilecekleri gösterilmiştir (Dean et al., 2009).



Şekil 2.3 Çeşitli hücrelerin oluşturduğu mikro dokular: IMR-32, (1A, 2A, 3A), AdMSC (1B, 2B, 3B) HS-2 (1C, 2C, 3C), SaOs-2 (1D, 2D, 3D), BMSC, (1E, 2E, 3E) MCF-7, (1G, 2G, 3G) IMR-32 ve AdMSC mikro dokularının H&E görüntüsü (4A, 4B) Santrifügasyon sonrasında yapısı bozulan HS-2 mikro dokularının görünümü (4C), SaOs-2 ve 3T3 mikro dokularının H&E boyama sonuçları (4D,2F) (Ölçek çizgisi 400 µm). (Ozturk vd., 2013)

Bir mikro dokunun diğer bir mikro doku ile temas etmesiyle kaynaştıkları gösterilmiştir, fakat mikro dokuların belli bir paternde birleşmelerini sağlamak için yeni tekniklere ihtiyaç vardır. Bu amaç doğrultusunda hücrelerin direkt kalıba ekimi (Kelm et al., 2010), hücrelerin biyo kağıt (biopaper) ya da hidrojel içine yazdırılması (Norotte et al., 2009), hücre adezyonunu teşvik etmek için yüzey paternlerinin oluşturulması (Fukuda et al., 2006; Otsuka et al., 2004) veya manyetik kuvvet aracılığıyla paternlerin oluşturulması gibi farklı teknikler kullanılmıştır (Ho et al., 2010; Shimizu et al., 2007; B. M. Mattix et al., 2014).

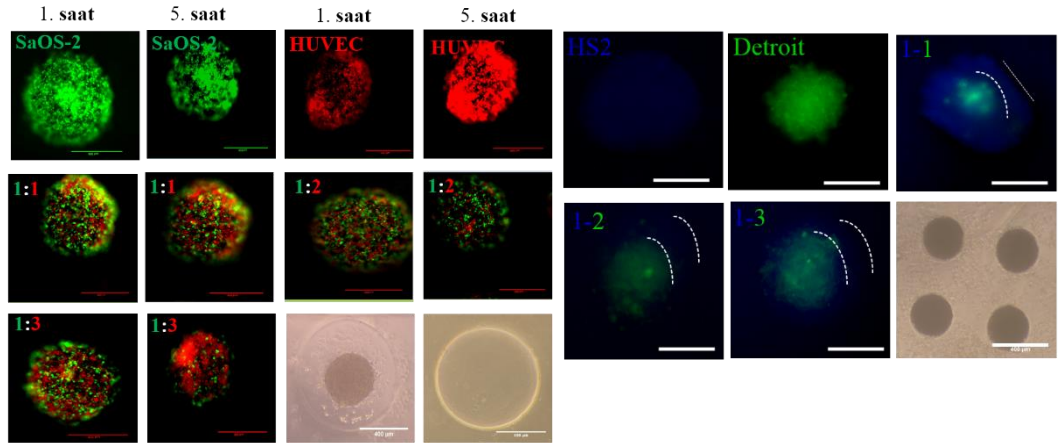
Manyetik kuvvet varlığında, manyetik nanopartikül barındıran mikro dokular istenen şekil, doku ve paternde bir araya getirilirler. Hücresel aktivite, canlılık ve fenotip üzerinde istenmeyen çeşitli yan etkilerin oluşmasını indüklediğinden günümüzde sıkça tercih edilen tekniklerde araştırmacılar manyetik nanopartiküllerini (MNP) hücreler tarafından alınması sürecine odaklanmıştır. MNP' lerin sferoidler ile birleştirme sonuçları iki farklı mikro dokudan oluşan (Janus) yapıların manyetik alan ile manipüle edilebildiğini ve

manyetik kuvvetlerin istenen şekillerde mikro dokuların füzyonunu sağladığı gösterilmiştir (B. M. Mattix et al., 2014).

Mattix ve ark. demir oksit nanopartiküllerine alternatif olarak kullanılabilecek magnetoferritin ile mikro dokuları işaretlemiş ve elde edilen manyetik işaretli yapıların doku mühendisliğinde yapı bloğu olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu anlamda yapılan çalışmada Mattix ve grubu magnetoferritin nanopartiküllerini içeren mikro dokuların manyetik olarak istenen örüntüde yerleşim gösterdiği ve yapay damar şeklinde halkasal yapıda mikro doku entegrasyonu meydana geldiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar da magnetoferritin işaretli mikro dokuların doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabileceğini ispat etmiştir (B. Mattix et al., 2014). Diğer bir araştırma grubu mikro dokuların basit bir şekilde manipülasyonuna olanak sağlamak için HeLa hücrelerini manyetik olarak işaretlemiş ve damla asılı metot ile sferoidler oluşturmuşlardır. F-aktin dağılım karakterine bakıldığında manyetik nanopartikül işaretli mikro dokularda 2B kültür sistemine göre 3B hücre iskeletin yeniden organize olduğu görülmüştür (Ho et al., 2010). Whatley ve ark. işlevselleştirilmiş süper paramagnetik demir oksit nanopartikülleri kullanarak hücre temelli 3B doku yapısı üretebilmek için bir metot önermişlerdir. Yapılan çalışmada manyetik şablon kullanılarak manyetik partiküller ile işaretlenen endotel hücresi mikro dokularının 3B paternde entegrasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Konfokal ve ışık mikroskobu sonuçları endotel hücre mikro dokularının yüksek homojenitede tekrar tekrar üretilebildiğini ve *in vitro* 3B yapıda canlılıklarını devam ettirdiklerini göstermiştir (Whatley et al., 2014).

Öztürk ve ark. 3D Petri Dish® tekniği kullanılarak oluşturulan agar jellerde SaOs-2 ile insan kaynaklı göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) ve insan kaynaklı deri fibroblast hücreleri (Detroit) ile insan kaynaklı deri keratinosit hücreleri (HS2) beraber kültive edilerek 3B mikro-dokular oluşturmuş ve hücrelerin 3B yerleşimlerini araştırmıştır. Ayrıca bu çalışmada farklı hücre oranları kullanılarak hücre sayısının lokalizasyona etkisi

belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen veriler SaOs-2 – HUVEC ko-kültüründe hücrelerin rastgele yerleşim gösterdiği ve hücre sayısının yerleşime etkisi olmadığı görülmüştür. HS2-Detroit ko-kültüründe ise fibroblast hücrelerinin mikro dokunun merkezinde yerleşim gösterdiği keratinosit hücrelerinin ise mikro dokunun çevresinde yerleşim gösterdiği ve hücre sayısının bu örüntüye bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Tüm bunlara ek olarak yapılan büyüklük analizi sonuçlarına göre HS2-Detroit ko-kültürü yapılarak oluşturulan mikro-dokuların büyüklüğünde 72 saat sonra belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir. SaOs-2 – HUVEC ko-kültüründe ise 1 ile 5 saat sonraki büyüklükleri karşılaştırıldığında belirgin bir azalma meydana geldiği görülmüştür (Öztürk vd., 2014).



Şekil 2.4 Farklı hücre tipleri kullanılarak oluşturulan mikro dokularda hücre yerleşim örüntüsü. (Öztürk vd., 2014)

2.11.2 Mikro doku teknolojisinde meydana gelen önemli gelişmeler

Tarihsel olarak mikro doku oluşturmak için ilk raporlanan teknik, 1970'lerde Sutherland ve ekibi tarafından geliştirilen *spinner flask* tekniğidir. Bu teknikte hücreler dönen kültür kabında kültüre edilir ve dönmenin etkisiyle hücreler süspansiyon halinde kalır. Zamanla süspansiyon halinde bulunan hücreler bir araya gelerek mikro kürecikler oluştururlar. Bu teknikte

hücrelerin tutunmasını önlemek için silikonlanmış kültür kabı kullanılır. Mikro dokuların boyutunda homojeniteyi sağlamak için hücreler dönen kültür kabında uzun süre kültive edilmelidir. Bu tekniğin önemli bir avantajı pH, nütrient konsantrasyonu, glikoz ve oksijen gibi fiziko-kimyasal parametrelerin kontrolünün kolayca yapılabilmesidir (Dubessy et al., 2000; Sutherland et al., 1970). Birçok çalışmada glial tümör ve medulla blastoma hücre hatlarından mikro doku oluşturmak için de hareketli bir teknik olan *spinner flask* tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğin en büyük dezavantajı çoğaltılabilen mikro dokuların üretilmemesidir. *Spinner flask* tekniğinde mikro dokuların oluşması için 6 hafta çalışmayı devam ettirmek gerekir. Döner kültür kabı tekniğinin tersine 1977 yılında Yuhas ve arkadaşları statik bir uygulama olan sıvı üst tabaka tekniğini tanımlamışlardır. Hücrelerin büyüyüp çok hücreli tümör dokusu oluşturmak için agar kaplı yüzeylerde kanser hücrelerinin küresimsi bir yapı kazanarak yaklaşık olarak 100 µm büyüklüğünde mikro doku oluşturduğunu göstermişlerdir (Dubessy et al., 2000; Yuhas et al., 1977). Bu teknik, hücrelerin tutunamama esasına dayanan ve tümör mikro dokusu şekillendirmek için kullanılan tekniklerin temelini oluşturmaktadır. Bunlar arasında sıvı üst tabaka tekniği en çok kullanılan yöntemdir. Söz konusu yöntemin en önemli dezavantajı, hücrelerin yüzeye etkileşim halinde olmaları nedeniyle adezyon moleküllerinin ekspresyonunda değişikliklerin meydana gelmesidir. Bu da *in vivo* ya da *in vitro*'da kullanıldıklarında hücrelerin tutunma davranışlarını değiştirdiğini göstermektedir (Oudar, 2000).

Olgun astrosit, oligodendrosit ve nöron gibi bazı sıçan beyin hücrelerinin bir araya gelip hücre kümesi oluşturmaları için hareketsiz doku kültürü sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemde hücreler agar kaplı yüzeyde kültive edilmiş ve olgunlaşmamış hücrelerin 4 gün sonra olgunlaşmış astrosit, oligodendrositlerin, 20 gün sonra ise nöronların hücre kümeleri oluşturdıkları gözlemlenmiştir (Bjerkvig et al., 1986). Hücrelerin agar yüzeye tutunamaması sonucu bir araya gelmesi ile agar kaplı yüzeylerde hücre kümeleri oluşur. Bu hücre kümelerinin çapı 48 saatte 500 µm'ye kadar büyüebilmektedir. Bu teknik asılı damla metodundan farklı olup, oluşan hücre kümeleri iki

boyutludur. Asılı damla metodunda ise sedimantasyon aşamasından sonra oluşan düzenek ters çevrilip hücre kümelerinin üç boyutlu hale gelmesi beklenmektedir. Duca ve arkadaşları mikro doku oluşturmak için hem asılı damla yöntemi hem de *spinner flask* tekniğini kullanmışlardır. Yapılan histolojik testler asılı damla yöntemi ile oluşturulanların aksine *spinner flask* yöntemiyle oluşturulan mikro dokuların merkezinde nekroz bölgelerinin bulunduğunu göstermiştir (Del Duca et al., 2004). Asılı damla tekniğinde mikro dokuların oluşturulması iki basamakta gerçekleştirilmektedir ki, bu da mikro doku oluşumu için oldukça uzun bir süreyi gerektirmektedir.

Tümör modellerinde kullanılan mikro dokular iki boyutlu kültür ile karşılaştırıldığında çok daha gerçekçi ve anlamlı bilgiler sağlarlar. Dolayısı ile mikro doku teknolojisi ile oluşturulan mikro dokular 2B tekniklere alternatif bir çözüm sunmaktadır. Mikro dokuların bu avantajlarına rağmen yüksek verimlilikte tarama yapabilmek için, örneğin terapötik ajan taraması, büyük ölçekte/çok sayıda üretme zorluluğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Tung ve ark. asılı damla tekniğinin farklı bir uygulamasını raporlamışlardır. Geliştirilen kültür kabında mikro doku oluşturulabilecek 384 adet kuyucuk bulunmaktadır. Bu kuyucuklarda oluşturulan küçük boyutta hücre agregatlarının boyutu oldukça homojendir (Tung et al., 2011). Ayrıca, tecrübe gerektirmeyen bir teknik olmasıyla da asılı damla, *spinner flask*, non-adeziv yüzeylerin oluşturulduğu tekniklerden ayrılmaktadır. Bu tekniğin en büyük dezavantajlarından biri maliyetinin yüksek olmasıdır (Fennema et al., 2013). Mikro fabrikasyon ve mikro akışkan temelli teknikler oldukça homojen boyutta çok sayıda küçük hücre kümelerini oluşturmak için geliştirilmiştir. Bu teknikler oldukça hızlı, daha az tecrübe gerektiren ve yüksek verimlilikte tarama yapılmasına olanak tanımaktadır. Bilim insanları tarafından kullanılan yöntemlerin kolay, hızlı, düşük maliyetli ve mikroskop gibi cihazlara entegre olabilmesi gerektiği ifade edilmiştir (Fennema et al., 2013). Mikro akışkan kanallar hücre agregatları oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu teknik oluşturulan agregatların boyutunu kontrol etme noktasında büyük kolaylık

sağlamaktadır. Fakat bu teknik belli bir teknoloji kapasitesi gerektirmektedir (Torisawa et al., 2007).

Mikro dokuların oluşturulması amacıyla yeni bir teknik geliştirilmiştir. Bu teknikte prototiplendirme teknolojisi kullanılarak non-adesif hidrojellerin kullanılabildiği, üzerinde mikro çıkıntılar olan kalıplar geliştirilmiştir (T. Achilli et al., 2014; Dean et al., 2009; Napolitano et al., 2007a; Rago et al., 2008). Bu kalıplar sayesinde mikro dokuların boyu, şekli ve kompozisyonu kolayca kontrol edilebilir; oluşan mikro dokular görüntüleme çalışmalarında kullanılmak için kalıplardan kolaylıkla geri kazanılabilir ve hücrelerin kendiliğinden bir araya gelerek mikro dokuların oluşma sürecinin dinamiği mikroskop altında kolayca takip edilebilir (Napolitano et al., 2007a).

Ayrıca, bu teknik hücrelerin kendiliğinden bir araya gelip mikro doku oluşumunun kinetiğini matematiksel olarak ölçmeye de olanak sağlamaktadır (T. Achilli et al., 2014). Tekniğin diğer önemli bir avantajı ucuz ve tecrübe gerektirmeyen kolay bir uygulama olmasıdır (Fennema et al., 2013). Oysa, birçok teknikte mikro dokuları ortamdan uzaklaştırmak kontrollü şartlarda mikroskop altında gerçekleştirilir ki, bu işlem uzun zaman ve tecrübe gerektirir (Dubessy et al. 2000).

2.11.3 Kanser çalışmalarında mikro doku teknolojisi

Çok hücreli tümör mikro dokuları, erken safhada damarsız tümörün büyümesi ve tümör mikro çevresini çalışmak için *in vitro* model olarak kullanılmıştır. Oluşturulan mikro dokular ile gerçek tümör arasında hacimsel büyüme kinetiği, hücresel heterojenite ve farklılaşma karakteristikleri gibi özelliklerde benzerliğin olması, mikro dokuları *in vitro* tümör modeli geliştirmek için oldukça önemli bir araç haline getirmiştir (Kunz-schughart et al., 1998). Birden çok hücrenin bulunduğu tümör mikro dokuları 50 yılı aşkın süredir tümör biyolojisini çalışmak amacıyla kullanılmaktadır. 1940’larda ilk olarak Holtfreter daha sonra da 1950’lerde Muscona tarafından çalışmalar yapılmasına rağmen gerçek anlamda mikro dokuların tümör çalışmalarında

kullanılması 1970 yılında Sutherland ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda kullanmalarıyla başlamıştır (Santini et al., 2004). Tümör hücrelerin 3B küre şeklinde büyümesi *in vivo* koşullara oldukça benzerlik gösterir. Bu modeller yapısında, yüzeyde korumasız, merkezde gömülü, çoğalabilen ve çoğalamayan, normoksik, hipoksik, canlı ve ölü olmak üzere çeşitli özelliklerde hücreler barındırılır ve bu halleriyle *in vivo* tümör yapısına oldukça benzerlik gösterirler. Tümör mikro doku tekniği, insan tümör hücrelerinin fonksiyonel fenotiplerini sağlamak için kullanılan klasik bir yöntemdir (Kunz-Schughart et al., 2004; Hirschhaeuser et al., 2010). Mikro dokular hem normal tümör hücreleri hem de kanser kök hücreleri kullanılarak oluşturulabilir.

Mikro dokuların kullanılmasının diğer önemli bir sebebi de anti-kanser ilaç taramaları için oldukça uygun bir araç olmalarıdır (Dolznic et al., 2011). Birçok terapötik stratejilerin ihtiyacını karşılamak için tümör mikro dokularının endotel ya da immün hücreleri ile ko-kültürünün yapıldığı modeller literatürde yerini bulmuştur. 150 mikrometreden küçük olan mikro dokular 3B hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi gösterebilirler. Mikro dokuların çapı 200 - 500 mikrometre arasında olduğunda kimyasal gradient oluştuğu ve (atıklar, oksijen ve besinlere karşı) çap 500 mikrometreden büyük olduğunda da merkezde nekrozun oluştuğu ifade edilmiştir (Friedrich et al., 2007; Kunz-Schughart et al., 2004; Hirschhaeuser et al., 2010).

RGD (Arg-Gly-Asp) sekansları ile modifiye edilen sentetik bir hidrojel matriksi kullanılarak oluşturulan 3B sistemde yumurtalık kanseri hücreleri hidrojel içine gömülmüş ve hücrelerin mikro doku oluşturdıkları belirlenmiştir (Loessner et al., 2010). Kötü huylu tümörde tümör/konakçı etkileşiminin önemini anlamak için kolon kanseri hücre hatları, monositik ve fibroblast hücreleri ile beraber kültür edilmişlerdir. Tümör hücreleri ya tek tabakalı ya da mikro doku şeklinde büyütülmüşlerdir. Tümör mikro dokularını oluşturmak için asılı damla tekniği kullanılmıştır (Krueger et al., 2005).

Fibroblast ve kanser hücrelerinin büyümesi için mikro çevre ya da niş oluşturdıkları belirlenmiştir. Yapılan bazı ko-kültür çalışmalar arasında fibroblast monolayer kültür üzerine tümör mikro dokularının kültürü, tümör mikro dokusu ve fibroblast mikro dokusunun beraber kültürü, fibroblast hücre süspansiyonunun tümör mikro dokusu ile beraber kültürü, fibroblast mikro dokularının tümör hücre süspansiyonu ile beraber kültürü bulunmaktadır (Friedrich et al., 2007; Krueger et al., 2005; Hoffmann et al., 2009; Seidl et al., 2002).

Kolon kanseri hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokular tek tabakalı miyofibroblast, normal kolon epiteli ya da HUVEC hücreleri ile beraber kültüre edilip, kolon kanserinde rol alan tümör nekrozu faktörü (TNF)'nün ekspresyonuna bakılmıştır (Paduch and Niedziela, 2009). Başka bir araştırma grubu da kemik metastatik prostat kanserinin mikro çevresini taklit etmek için prostat kanseri mikro dokuları osteoblast ya da endotel hücreleri ile beraber kültüre etmişlerdir (Hsiao et al., 2009). Diğer bir uygulamada da tümör mikro dokuları embroid küreciklerle beraber kültüre edilmişlerdir. Bu çalışmada embriyonik kök hücrelerin lökositlere farklılaştıktan iki gün sonra endotelyal markörleri eksprese etmeye başladıkları gözlemlenmiştir. Bu çalışmadaki problem embriyoid küreciklerin boyutunun homojen olmamasıdır (Hannig et al., 2010).

Kişiyeye özel tedavilerde tümör biyopsilerinden alınan hücrelerle tümör mikro dokusu oluşturmak üzerinde ilginin arttığı bir çalışma alanıdır. Baş ve boyun bölgelerinden alınan kötü ve iyi huylu tümör hücrelerinden oluşan mikro dokular monositlerle beraber kültür edilmişlerdir. Biyopsi materyalinin kullanılmasının getirdiği en önemli avantaj, kültüre edilen mikro dokularda tümör öncül hücrelerinin varlığıdır. Tümör immünolojisinde mikro dokular 1990' lardan beri kullanılmaktadır (Hirschhaeuser et al., 2010; Chong et al., 2009). Tümör mikro dokuları monosit, makrofaj, dentritik hücreler, T lenfositler ve doğal öldürücü hücreler ile beraber kültüre edilmişlerdir. Bu hücre tipleri hücre süspansiyonu olarak mikro dokunun bulunduğu ortama

eklenmiş ve hücre göçü, aktivasyonu ve olgunlaşması izlenmiştir (Konur et al., 1998). Anjiyogenez çalışmaları için, meme kanseri mikro dokuları makrofajlarla beraber kültüre edilmiş ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu sistem immün sistemi baskılanmış farelere aktarıldığında damar oluşumunda artış olduğu görülmüştür (Bingle et al., 2005).

Son zamanlarda yayınlanan raporlarda kanser kök hücrelerinin özellikle ya da sadece mikro doku kültüründe devamlılıklarını sağladıkları vurgulanmıştır (Hirschhaeuser et al., 2010). Yuan ve çalışma arkadaşları, kendisini yenileyebilen, farklılaşabilen ve mikro doku oluşturabilen GBM hücrelerini hastalardan izole etmeyi başarmışlardır. Ayrıca, immün sistemi baskılanmış farelerde yaptıkları denemeler sadece mikro doku oluşturan hücrelerin tümör oluşturdıklarını göstermiştir (Yuan et al., 2004). Yayınlanan bazı raporlarda kanser kök hücreleri serumlu ortamda kültüre edildiklerinde hücrelerin tutunmaya başladıkları, farklılaşma ve tümörojenik özelliklerini yitirdikleri belirtilmiştir. Benzer sonuçlara Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda rastlamışlardır. Bu grup kanser kök hücrelerini serumlu ortamda kültüre aldıklarında kendi kendine yenileme ve farklılaşma yetilerinin kaybolduğunu ve ayrıca gen ekspresyon profillerinde değişimler meydana geldiğini raporlamışlardır (Lee et al., 2006).

İmmün sistemi baskılanmış fareler kullanılarak birçok kanser türünde kanser kök hücre varlığı gösterilmiştir. Bu yöntem alternatif olarak insan primer tümörlerinde kanser kök hücrelerinin varlığını tespit etmek amacı ile *in vitro* da non-adesif ortamlarda mikro doku oluşturma tekniği kullanılmaktadır. Bu tekniğin hızlı ve ucuz olması gibi önemli avantajları olmasına karşılık bazı fizyolojik kısıtlamalarının da mevcut olduğu bilinmektedir. Buna rağmen bu iki metotda yapılacak yenilikler, klinik uygulamalarda kullanılabilecek daha etkili kanser kök hücre belirleme yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (Han et al., 2011; Valent et al., 2012).

Han ve ark. mide kanseri tümörlerinden izole ettikleri EpCAM⁺/CD44⁺ hücrelerin kanser kök hücre özelliğini gösterip göstermediğini anlamak için hem immün sistemi baskılanmış fareler hem de mikro doku yöntemini kullanmışlardır. Sonuç olarak, EpCAM⁺/CD44⁺ hücrelerin farelerde hem morfolojik hem de fenotipik heterojenite açısından mide kanseri tümörlerine benzerlik gösteren tümörler oluşturdukları rapor edilmiştir. Aynı hücrelerin tümörojeniteyi devam ettirerek serumsuz ortamda eksponansiyel olarak büyüyen mikro dokular oluşturdukları da gözlenmiştir. Diğer ilginç bir sonuç ise tek bir kanser kök hücresinin çeşitli farklılaşmış hücreler barındıran mikro dokular oluşturduğunun tespit edilmesidir. Böylece EpCAM⁺/CD44⁺ mide kanseri hücrelerinin kanser kök hücre araştırmaları için ideal bir model olabileceği gösterilmiştir (Han et al., 2011).

Yukarıda bahsi geçen iki yöntemin beraber kullanıma dair çeşitli kanser türlerine yönelik raporlar literatürde bulunmaktadır. Zhang ve ark. mikro doku oluşturan hücre grubu ile normal yumurtalık tümör hücrelerinin tümör oluşturma yetisini karşılaştırmak amacıyla mikro doku oluşturan 100 adet hücreyi farelere enjekte ettiklerinde 73 ila 102 gün sonunda tümör oluşumu gözlerken 10⁶ adet normal tümör hücresi ile yapılan çalışmada ise farelerde tümör oluşumu gözlememişlerdir. Mikro doku oluşturma potansiyeline sahip hücreler kullanılarak farelerde geliştirilen tümörler analiz edildiğinde histolojik, sitolojik ve yapısal olarak hasta tümörlerine benzer oldukları ve yumurtalık kanseri belirteçlerinden biri olan CA-125 belirtecini eksprese ettikleri görülmüştür. Ayrıca, mikro doku oluşturan hücre kaynaklı tümörlerin kalın bağırsak, mide, böbrek, karaciğer ve bağırsak zarına metastaz yaptıkları da gözlemlenmiştir (Zhang et al., 2008). Başka bir çalışmada ise akciğer kanseri tümörlerinden izole edilen ve mikro doku oluşturabilen CD133 pozitif hücreler immün sistemi baskılanmış farelere enjekte edildiğinde kısa sürede orijinal tümöre fenotipik olarak benzer tümörleri oluşturdukları tespit edilmiştir (Eramo et al., 2007).

Diğer önemli bir çalışma da Riman ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Burada mikro doku teknolojisinin kanser sağaltım uygulamalarına yönelik *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda kullanılmasının daha doğru sonuçlar vereceği vurgulanmıştır. Riman ve ark. SaOs-2, MG-63 ve HOS hücre dizileri ile insan primer osteoblastik ve kondroblastik osteosarkom dokularından elde edilen hücreleri kullanarak asılı damla metodu ile mikro dokular oluşturmuştur. Oluşturulan 3B yapılarla kanser tedavisinde kullanılan doksorubisin, sisplatin gibi ilaçlar uygulanmış ve elde edilen sonuçlar 2B kültür sistemi sonuçlarıyla kıyaslamıştır ve elde edilen veriler mikro dokuların ve *in vivo* osteosarkomanın histolojik karakter bakımından benzer olduklarını göstermiştir. Ayrıca, 2B kültür sistemi ile kıyaslandığında mikro dokuların IC₅₀ değerinin 1,7 kat daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır (Rimann et al., 2014).

Santini ve ark. yüksek çözünürlüklü proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisini (H NMR) kullanarak MG-63 hücre dizisinin 2B ve 3B kültür sistemindeki metabolik farklılıklarını araştırmışlardır. Yapılan çalışmalar sonunda MG-63 mikro dokularının (50-80 mikrometre çap) metabolik fonksiyonlarının 2B kültür sisteminden önemli derecede farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (Santini et al., 2004).

Kemik kanseri hakkında sahip olunan bilgi kapasitesi tedavi ve teşhise yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi bakımından değerlendirildiğinde yeterli olmadığı görülmektedir. Bu sebepten dolayı yapılacak yeni çalışmalarla bilgi kapasitesinin artırılması oldukça önem kazanmaktadır. Bu çalışmada osteosarkoma kanserinde olduğu bilenen KKH'lerin mikro doku oluşturma yetisi, mikro dokudaki katarizasyonları ve yerleşimine dair literatüre yeni kazanımlar sağlamak amaçlanmıştır. Böylece kanser sağaltım çalışmalarında kullanılmak üzere 3B *in vitro* osteosarkoma modelinin geliştirilmesine yönelik mikro dokuların potansiyelleri değerlendirilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasının hücre kültürü uygulamalarının tamamı Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Grubu (EGEREACT) Laboratuvarı'nda yapılmıştır. İmmünohistokimya analizi ve kesit alma işlemi Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bölümünde ve gerçek zamanlı PZR analizi hizmet alımı kapsamında Genmar firmasında yapılmıştır.

3.1 Hücre Kültürü

3.1.1 Gereç

Bu tez çalışmasında kullanılan insan kaynaklı osteosarkoma hücre dizininin (SaOs-2, Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu, HÜKÜK, Türkiye) kültürü aşağıda verilen gereçler kullanılarak yapılmıştır.

1. 25 cm² yüzey alanına sahip filtreli kültür kapları (Greiner, Cellstar®, Almanya)
2. 75 cm² yüzey alanına sahip filtreli kültür kapları (Greiner, Cellstar®, Almanya)
3. 2, 5, 10 ve 25 mL hacimli steril serolojik pipetler (Sarsted, Almanya)
4. Hemositometre (Neubuer, Almanya)
5. Tripan mavisi (Sigma, ABD) solüsyonu (%0,4) [(0,4 gram tripan mavisi 100 mL fizyolojik tuzlu suda çözdürüldü)
6. Dimetilsulfoksit (DMSO) (Sigma, HibriMax, ABD)
7. L-glutamin (100X, Gibco, İngiltere)
8. Gentamisin (Gibco, 10 mg/mL, İngiltere)
9. Sodyum pirüvat (100X, Biochrom AG, Almanya)
10. %0,25 Tripsin- etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (Sigma, ABD)
11. DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, 4,5 g/L glikoz, Gibco, İngiltere)

12. Isıl işlemle inaktif edilmiş f3tal sığır serumu (FBS, Biochrom AG, Almanya)
13. Ters faz kontrast ışık mikroskobu (Olimpus, CK-40-SL, Japonya)
14. CO₂'li inkübat3r (Thermo Scientific, ABD)
15. 37 °C'ye ayarlı su banyosu
16. Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, ABD)
17. 15 mL ve 50 mL hacimli santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)
18. 1, 2 ve 2,5 mL hacimli eppendorf tüpleri (LP Italiana SPA, İtalya)
19. Fosfat tamponlu salin tabletleri (PBS) [(200 mL/tablet, Sigma, ABD)]
20. 2 mL hacme sahip kriyotüpler (Greiner, CELLSTAR[®], Almanya)
21. 2 mL ve 2,5 mL hacimli steril past3r pipetleri (LP Italiana SPA, İtalya)

3.1.2 Y3ntem

3.1.2.1 SaOs-2 hücre hattının stoklanması

Çalışma öncesi gereken hücre miktarı hesaplanarak, çalışmanın aynı hücre pasaj numarasında gerçekleştirilebilmesi için hücreler stoklanmıştır. Çalışmada kullanılan SaOs-2 hücre dizisi hücre kültür kabında taşıma usulü ile laboratuvara getirildiğinden stoklama için aşağıda verilen yöntem kullanılmıştır:

1. Kültür kabında laboratuvara getirilen SaOs-2 hücre dizisi besi ortamında (%10 FBS ve 0,01 mg/ml gentamisin içeren DMEM) bir gece 37°C' de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübat3rde bekletildi.
2. Hücre kültür kabını dolduran, hücrenin kendilerine ait orijinal besi ortamı 5 mL kültür kabında bırakılmak kaydıyla 50 mL'lik steril santrifüj tüpüne alındı ve hücre stoklanmasında kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı.
3. Hücrelerin besi ortamı 2-3 günde bir hücrelerin canlılığının devamını sağlamak amacı ile orijinal besi ortamı ile değıştirildi.

4. Kültür kabı yüzeyi %80-90 doluluğa ulaştığında hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besı ortamı çekildi.
5. Hücrelerin yüzeyi serumu uzaklaştırmak amacı ile daha önceden 37  C’de ısıtılmış olan Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı.
6. Hücrelerin yüzeyden kalkması için tripsinizasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla, hücrelerin üzerine tripsin-EDTA (2,5 g/L tripsin, 0,5 mM EDTA) solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37  C’deki inkübatörde bekletildi.
7. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlendiğinde %10 FBS içeren besı ortamı ile hücreler santrifüj tüpüne toplandı.
8. Hücreler 1000 rpm ve 4 C’ta 5 dakika santrifüjlendi.
9. Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
10. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besı ortamı ile süspanse edildi.
11. Hücre s spanسیونu 1:2 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besı ortamı koyularak kültüre devam edildi.
12. Hücre kültürünün besı ortamı 2 günde bir taze besı ortamı ile değiştirildi.
13. Hücreler yeterli sayıya ulaşınca aşağıda tanımlanan dondurma protokolü kullanılarak -196 C sıvı azot tankında stoklandı.

3.1.2.2 SaOs-2 hücre dizisinin dondurulması

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

- 1- Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besı ortamı çekildi.
- 2- Hücrelerin yüzeyi 37 C’de önceden ısıtılan Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanarak serum uzaklaştırıldı.
- 3- Hücrelerin  zerine tripsin-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 hızla 4 °C sıcaklıkta 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.

3.1.2.3 SaOs-2 hücre dizisinin çözündürülmesi

Deneysel çalışmaların başlatılabilmesi için bu tez çalışmasında kullanılacak olan hücre dizisinin çözündürülmesi amacıyla aşağıda verilen yöntem uygulanmıştır.

Hücre çözdürme işleminden önce laminar akışlı biyo-güvenlik kabini %70 etanol içeriğine sahip alkollü solüsyon ile dezenfeksiyonu yapılarak hazırlanmıştır. Ayrıca su banyosu ve hücre kültürü çalışmasında kullanılacak büyütme ortamının hazırlanması için gerekli malzemelerin 37 °C sıcaklığa getirilmiş olmasına dikkat edilmiştir.

1. -86 °C’ye soğutulmuş derin dondurucuda 2 mL hacimli hücre dondurma tüpünde dondurulmuş SaOs-2 hücre dizisi derin dondurucudan alınarak hızlı bir şekilde önceden sıcaklığı 37 °C’ye getirilmiş su banyosuna konuldu.
2. Hücre süspansiyonunun çözündüğü görülünce dondurma tüpünün dış yüzeyi %70 etanol solüsyonu ile dezenfekte edilerek laminar akışlı biyo-güvenlik kabinine alındı.

3. Dondurma tüpünün ağzı gevşetilerek daha önceden hazırlanmış olan %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 1 mM sodyum pirüvat ve 0,01 mg/mL gentamisin ve %87,9 DMEM (d-glikoz içeriği 4,5 g/L) içeriğine sahip büyütme ortamından 1 mL alınarak hücrelerin üzerine yavaş yavaş eklenerek homojenize edildi.
4. Hücreler homojenize edildikten sonra 15 mL hacimli santrifüj tüpüne alınarak toplam hacim 6 mL olacak şekilde büyütme ortamı eklenmiştir.
5. 4 °C’de 1000 rpm (devir/dakika) hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin santrifüj tüpünün dibinde, dondurma besi ortamında bulunan DMSO’un ise süpernatantta toplanması sağlandı.
6. Santrifüj tüpü biyo-güvenlik kabinine alınarak süpernatant uzaklaştırılıp santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
7. Homojenize edilen hücreler etiketleme işlemi tamamlanmış 25 cm² yüzey alanına sahip filtre kapaklı kültür kabına alınarak üzerine 4 mL büyütme ortamı eklenip 37 °C’de %5 CO₂ ortamında kültüre edildi..

Yukarıda tanımlanan hücre çözündürme yöntemi diğer tüm çalışmalarda da kullanılmıştır.

3.1.2.4 SaOs-2 hücre dizisinin çoğaltılması ve pasajlanması

SaOs-2 hücrelerinin çoğaltılması için aşağıda bileşimi verilen büyütme ortamı kullanılmıştır:

- %10 FBS
- %1 L-glutamin (2 mM)
- %1 sodyum pirüvat (1 mM)
- %0,1 gentamisin (0,01 mg/mL)
- %87,9 DMEM (d-glikoz içeriği 4,5 g/L)

Kültürü sürdürmek için hücrelerin besi ortamı 2-3 günde bir tazelenmiştir. Ters faz kontrast mikroskopla yapılan gözlemlerle hücrelerin yüzeyi kaplamama oranına göre pasajlanıp pasajlanmamasına karar verilmiştir. Pasajlama işlemi aşağıda verilen yöntemle yapılmıştır.

- 1- Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
- 2- Hücrelerin yüzeyi 37°C’de önceden ısıtılan Ca^{+2} Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanarak serum uzaklaştırıldı
- 3- Hücrelerin üzerine tripsin-EDTA (2,5 g/L tripsin, 0,5 mM 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 santrifüj tüpüne toplandı.
- 5- Hücreler 1000 rpm’de 4 °C’de 5 dakika santrifüjlendi.
- 6- Santrifügasyon sonrası süpernatant döküldü.
- 7- Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
- 8- Pasaj oranı 1:2 olacak şekilde hücreler yeni flasklara alındı ve üzerine taze büyütme besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.
- 9- Hücre kültürünün besi ortamı 2-3 günde bir taze büyütme besi ortamı ile değiştirildi.
- 10- Yeterli sayıya ve gelen hücreler deneylerde kullanıldı.

3.2 SaOs-2 Hücre Dizisinin Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan SaOs-2 hücre dizisinin karakterizasyon çalışmaları “**CD133 (+) Kanser Kök Hücreleri ile Bakteriyel Selüloz Doku İskelesi Üzerinde Üç Boyutlu Osteosarkom Modeli Oluşturulması**” başlıklı yüksek lisans bitirme tezi kapsamında gerçekleştirildi. Bu tez kapsamında elde edilen verilere atıf yapılarak sonuçlar değerlendirildi.

3.2.1 Gereç

SaOs-2 hücrelerinin karakterizasyonunun yapılması çalışmasında yukarıda verilen (Bknz: 3.1.2) gereçlere ek olarak aşağıda listelenen gereçler kullanılmıştır.

1. 96 gözlü kültür kabı (Greiner, Cellstar®, Almanya)
2. 3-(4,5-dimetitiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromit (MTT, Sigma, ABD)
3. DMSO (Sigma, ABD)
4. Spektrofotometre (Molecular Devices, ABD)

3.2.2 Yöntem

3.2.2.1 SaOs-2 hücre dizisinin büyüme kinetiği

Hücrelerin %2,5 FBS içeriğine sahip büyüme ortamındaki kinetik değişimlerinin belirlenebilmesi amacıyla SaOs-2 hücreleri 75 cm² yüzey alanına sahip kültür kabından tripsinizasyon işlemi uygulanarak kaldırıldı ve boya almama esaslı tripan mavisi tekniği kullanılarak hemositometre ile sayıldı. 96 gözlü kültür kabının her gözüne 3 tekrarlı olacak şekilde 1x10⁴ hücre/mL ana stoktan alınıp hücre ekimi yapıldı. SaOs-2 hücre hattı için 20 gün boyunca 24 saat aralıklarla MTT analizi ile aşağıda belirtilen basamaklar takip edilerek hücre canlılığı ölçümü yapıldı.

1. Analizi yapılacak hücrelerin besi ortamı boşaltıldı.
2. Hücrelerin üzerine %10 MTT içeren (5 mg/mL) serumsuz besi ortamından 100 µL eklenerek 3 saat karanlıkta karanlıkta 37°C'de, %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonunda MTT içeren ortam boşaltıldı, formazan kristallerinin çözünebilmesi için 100 µL DMSO eklendi ve 10 dakika 300 rpm hızında çalkalandı.

4. 570 ve 690 nm dalga boylarında spektral okuma ile absorbans ölçülerek aşağıda anlatılan şekilde çıkarılan kalibrasyon eğrisine göre her okumada var olan canlı hücre sayıları belirlendi.

3.2.2.2 SaOs-2 hücre dizisinin hücre sayısı 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 farklı hücre sayılarına denk gelen absorbans değeri belirlenerek kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Uygulanan protokol aşağıda belirtilmiştir:

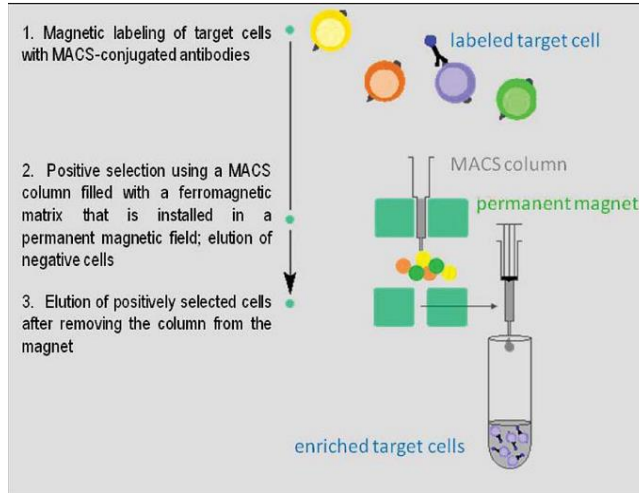
1. Hücreler 96 gözlü kültür kabına farklı konsantrasyonlarda (10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 ve 10^7 hücre/göz), 5 tekrarlı olacak şekilde ekildi.
2. Kültür kabı yüzeyine hücre tutunmasını takiben 3 saat sonra MTT testi uygulandı.
3. MTT için, pleytteki kullanılmış besi ortamı çekildi.
4. Hücrelerin üzerine 100 μ L %10 MTT (5 mg/ml) içeren serumsuz besi ortamı eklendi.
5. Hücreler karanlıkta 37°C’de, %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde 3 saat inkübe edildi.
6. 3 saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortam çekildi.
7. Hücrelerin üzerine DMSO eklenerek mitokondrilerde oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.
8. Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm’ de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözünmesi sağlandı.
9. Spektrofotometrede, 570-690 nm dalga boylarında absorbans değerleri okutularak kaydedildi.
10. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hücre sayısı-absorbans grafiği çizildi. Elde edilen grafiğin matematiksel modeli çıkartılıp büyüme grafikleri çizildi.

3.3 SaOs-2 Hücre Dizisinden Kanser Kök Hücrelerinin MACS ile Ayrılması

Bu çalışmada kullanılacak olan kanser kök hücreleri SaOs-2 hücre dizisinden manyetik aktif hücre ayırma sistemi (MACS) tekniği kullanılarak ayrılmıştır. Ayırım yapılırken intraselüler hücre yüzey proteini olan *CD133* kullanılmıştır (Kelly et al. 2010).

MACS tekniği 1990 yıllarında Miltenyi ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Kısaca bu teknik hedef yüzey proteinine bağlanmak üzere işaretlenmiş manyetik mikro partikülleri kullanarak manyetik alan varlığında istenilen hücrelerin ayrılmasını sağlar.

Kullanılan manyetik mikro partiküller yaklaşık olarak 100 nm büyüklüğünde olup hücrelerde herhangi bir toksik etki oluşturmamaları vurgulanmıştır (Miltenyi et al., 1990; Grützkau and Radbruch, 2010)



Şekil 3.1 1 MACS tekniğinin şematik gösterimi (Grützkau and Radbruch, 2010)

3.3.1 Gereç

MACS tekniği ile SaOs-2 hücre dizisinden $CD133^+$ fenotipine sahip kök hücrelerin ayrılması için aşağıda verilen gereçler kullanılmıştır.

1. *Mini-Midimacs Starting Kit* (Miltenyi, Almanya)
2. *CD133 Mikrobead Kit* (Miltenyi, Almanya)
3. Sığır serum albümini (BSA, Sigma, ABD)
4. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS tabletleri (Sigma, ABD)
5. PBD içinde hazırlanmış %1 w/v'lik EDTA solüsyonu (Biochrom, Almanya)
6. 15 mL ve 50 mL hacimli santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)
7. Buz

3.3.2 Yöntem

SaOs-2 hücre dizisinden MACS tekniği kullanarak kanser kök hücrelerinin ayrırılması için aşağıda verilen adımlar izlenmiştir. Ayrıma geçmeden aşağıda bahsedildiği gibi önce kullanılacak olan tampon hazırlanarak pH'sı ayarlanmış ve sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir:

Tampon hazırlama protokolü

- Tablet başına 200 mL distile su olacak şekilde Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS hazırlandı.
- PBS içerisinde %0,5 (w/v) olacak şekilde yeterli miktar BSA tartıldı. Bunun için 50 ml PBS içinde 0,25 g BSA tartılıp çözdürüldü.
- Solüsyon içerisinde 2 mM olacak şekilde, EDTA solüsyonu eklendi. 50 mL PBS içine %1 w/v'lik EDTA solüsyonundan 2,9 mL eklenmiştir.
- Solüsyon pH'sı nitrik asit ve sodyum hidroksit kullanılarak 7,2'ye ayarlandı.
- Solüsyon 0,22 μm çaplı filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Manyetik işaretleme ile CD133⁺ hücrelerin ayrırılması (Şekil 3.2)

Hücreler yeterli sayıya çoğaltıldıktan sonra tripsinizasyon ile süspanse hale getirildi ve hücre sayımı yapıldı. İstenen hücre miktarı tampon ile süspanse edilerek 10 dakika 1220 rpm’de santrifüj yapıldı.

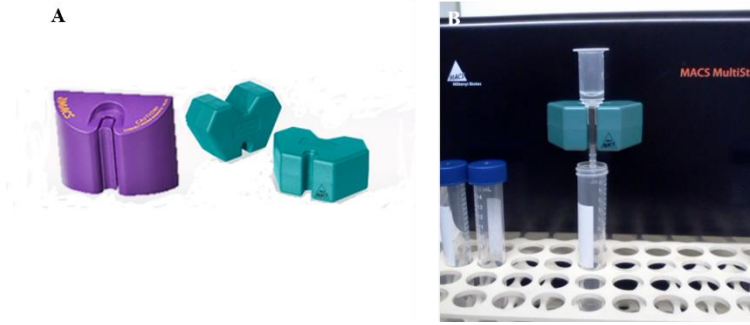
1. Üreticinin önerdiği protokole göre 2×10^8 hücreye kadar MS kolonu ile (miniMACS seperator) ayırım yapılabilmektedir. Bu sayının üzerinde ise LS kolonu ile (midiMACS seperator) ile ayırım yapılması önerilmiştir.
2. Süpernatant döküldü. Üretici, 10^8 hücreye kadar 300 μ L tampon eklenerek homojenize edilmesini, hücre sayısı 10^8 ’i geçtiğinde kullanılacak tampon ve diğer solüsyonların miktarının doğru orantılı olarak artırılması gerektiğini önermiştir.
3. 10^8 hücreye kadar 100 μ L FcR bloklama solüsyonu eklenerek homojenize edildi (hızlı çalışılmalıdır).
4. 10^8 hücreye kadar 100 μ L CD133 MicroBeads solüsyonu eklenip, homojenize edildi (hızlı çalışılmalıdır).
5. 30 dk 4 °C’de bekletildi. Bekleme işlemi buz üstünde ve çalkalayıcıda yapıldı.
6. 4 °C’de alınan hücre süspansiyonuna 2 mL tampon solüsyonu (10^8 hücre için) eklendi ve 1220 rpm’de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjün bitimine yakın kolon hazırlığı tamamlandı.

Kolon hazırlama protokolü

- MiniMACS ya da MidiMACS seçimine göre separatör standa yerleştirildi.
- Uygun kolon tipi kolonun üzerindeki çıkıntılar dışa bakacak şekilde separatörün içine doğru itildi.
- Kolonun yerleştiğinden emin olunduktan sonra kolonun altına santrifüj tüpü (15 mL) yerleştirildi.

- Kolonun çeperlerinden yavaşça köpük oluşturmayacak şekilde 500 µL tampon çözelti geçirildi. (LS kolonu kullanılacaksa bu miktar 3 mL olmalıdır).
 - Bu miktarın damlaması bittiğinde hücre süspansiyonu geçirme işlemine başlandı. Kolon yıkandıktan sonra kolon altındaki santrifüj tüpü değiştirildi. Ayrıca tampon kolondan akıtıldıktan hemen sonra hücre süspansiyonun kolondan geçirilmesine dikkat edildi.
7. Süpernatant dökülüp, hücreler 500 µL (10^8 hücre için) tampon ile süspanse hale getirildi. (Köpük oluşturmamaya dikkat edilmelidir.)
 8. Hücre süspansiyonu tek seferde hücrelerin kolonun tam merkezinden geçebileceği şekilde tek seferde boşaltıldı. (köpük oluşturmamaya dikkat edilmeli) ve damlama bitene kadar beklendi.
 9. Kolonda tutunmayan hücrelerin kolondan uzaklaştırılması için 3×500 µL (LS kolonu için 3×3 mL) tampon kolon çeperlerinden akıtılarak geçirildi. Böylece, alt tüpte $CD133^-$ hücreler toplandı.
 10. 1 mL tampon (LS kolonu için 5 mL) kolona çeperden eklendi. Kolon separatörden ayrıldı ve yeni bir santrifüj tüpü içerisine steril piston yardımıyla $CD133^+$ hücreler akıtıldı.
 11. Ayrımlanan $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücreler hemositometre ile sayılarak deney setleri kuruldu.

Yukarıda verilen MACS ile ayırım yöntemi $CD133^+$ hücrelerin ayrımlanması gereken tüm çalışmalarda kullanılmıştır. Prosedürde yapılan değişiklikler ayırım için kullanılan SaOs-2 miktarına göre düzenlenmiştir. Hücre sayısı 1×10^8 geçtiğinde MidiMACS seperatörü kullanılmıştır. Seperatör değişiminin yanında yukarda da belirtildiği gibi kullanılacak olan tampon, *micro-bead*, ve FcR bloklama solüsyonlarının miktarı doğru orantılı olarak artırılmıştır.



Şekil 3.2 1 MACS tekniği ile $CD133^+$ hücrelerin SaOs-2 hücrelerinden ayrıştırılması. (A) Çalışmada kullanılan MidiMACS (mor) ve MiniMACS (yeşil) seperatörleri (B) Kolondan hücrelerin geçirilerek alt tüpte toplanması.

3.3.2.1 MACS tekniği ile elde edilen $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücrelerinin gen ekspresyonlarının RT-PZR ile belirlenmesi

MACS ayırımı ile SaOs-2 hücrelerinden ayırımı yapılan $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücrelerinde kanser kök hücre belirteci olan *CD133* proteini, köklük genleri olarak tanımlanan *OCT3/4*, *Sox2*, *nestin* ve *nanog* proteinlerinin ifadelerinin belirlenmesi amacıyla her hücre tipinden 3 tekrar olmak üzere 1×10^5 hücre gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu (RT-PZR) analizine gönderildi. Yapılan analizde kullanılan gereçler ve yöntem aşağıda verilmiştir.

Gereç

Aşağıda listelen gereçler kullanılmıştır:

1. Di-sodyum hidrojen fosfat di-hidrat (Merck; 106580, Almanya)
2. Santrifüj tüpleri (Greiner bio-one, Cellstar; EK-10171/15ml, EK12261/50ml, , Almanya)
3. Potasyum di-hidrojen fosfat (Merck; 104871, Almanya)
4. Etanol (Merck; 100983, Almanya),
5. Tripure (Life Science, 11667165001, ABD)

6. Kloroform (Merck; M1024312500, Almanya)
7. İzopropanol (Merck; 109634, Almanya)
8. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche; 04379012001, ABD)
9. Isı döngüleyici (Roche, ABD)
10. Işık döngüleyici 480II (Roche, ABD)

Yöntem

Örnek toplanması ve RNA izolasyonu

Tüm deney gruplarına ait hücre hattı örneklerinden yaklaşık 1 milyon alınarak (pirinç büyüklüğünde) ezilerek ve homojenizatör kullanılarak parçalanıp 2 mL ependorf tüplere aktarıldı ve aşağıdaki proses izlendi:

1. Tüplere 1 mL tripure eklendi ve tüpler 45 saniye vortekslendi. Böylece tüpteki hücreler homojen bir görünüm alarak parçalandı ve tripure çözeltisinin etkisiyle de pembe bir renk görünümünü alır.
2. Vortekslenen tüplerin soğumaları için buz üstünde 2 dk bekletildi.
3. Tüpler 5 dk oda ısısında bekletildi.
4. Tüplere 200 µL kloroform eklenerek 5 dk beklendi. Kloroform, homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlar. Böylece RNA, DNA ve protein elde edildi.
5. 12.000 rpm' de 4 °C' de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda 3 faz oluştuğu görüldü.
 - 1.faz (sulu faz): RNA içerir (renksizdir).
 - 2.faz: DNA içerir (beyaz renklidir).
 - 3.faz (organik faz): Protein içerir (kırmızı renktedir).
6. RNA izolasyonu için renksiz olan 1.faz yeni tüpe aktarıldı.
7. Yeni tüpe 500 µL izopropanol eklendi. Oda ısısında 10 dk inkube edildi. İzopropanol RNA' yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanıldı.

8. Tüp 12.000 rpm' de 4 °C' de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
9. Oluşan çökelek üzerine 1 mL %75 etanol (EtOH) eklendikten sonra örnek 7.500 x g' de 4 °C' de 5 dakika santrifüjlendi.
10. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. 57 °C' de EtOH uçuruldu.
11. Kalan çökeltiye 50-100 µL RNase içermeyen su eklenerek pipetlendi.
12. RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü.
13. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları UV spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi.
14. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edildi.

İdeal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/A280 absorbans oranının 1,8-2,0 olması beklenir. Spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA degradasyonunun kontrolü agaroz jel elektroforeziyle gerçekleştirilebilir. Genel olarak reaksiyon başına 5 ng total RNA'nın ortalama düzeyde ifade edilen mRNA tespitinde yeterli olacağı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak gen ifadesine bakılacak materyalin özelliğine bağlı olarak RNA miktarı reaksiyon başına 5 ng ile 5 µg arasında alınmalıdır. Bu aşamada elde edilen m-RNA'ların bozulmasını engellemek için, örnekler derin dondurucuda (-80°C) saklandı.

cDNA Sentezi

cDNA sentezi için "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche, ABD) kullanıldı.

1. Her örnek için RNA+H₂O'dan 11 µL ye kadar konuldu (en fazla 4000 ng) ve 2 µL random heksamer primer eklendi (RNA örneği 11 µL, + random heksamer primer 2 µL = 13 µL).

2. Tüpler ısı döngüleyiciye yerleştirildi. 65 °C’ de 10 dk RNA’lar denatüre edildi. Bu arada mastermiks hazırlandı. (Bu miktarlar örnek sayısı ile çarpılarak hazırlandı)
3. Tek reaksiyon için; reaksiyon tamponundan 4 µL, *protector* RNase inhibitor 0,5 µL, deoksinukleotid miks 2 µL, *transcriptor reverse transcriptase* 0,5 µL olacak şekilde toplam 7 µL’lik “mastermiks” hazırlandı.
4. Isıl döngüleyiciden alınan örnekler soğutma kabına yerleştirildi.
5. Her tüpe 7 µL hazırlanan karışımdan dağıtıldı ve pipetle 3-4 kez karıştırıldı.
6. Tüpler ısıl döngüleyiciye yerleştirildi ve aşağıda verilen, hazırlanmış program çalıştırıldı:

- 25 °C ‘de 10 dk
- 50 °C’de 60 dk
- 85 °C’de 5 dk
- 4 °C’de bekleme

Primer Dizaynı

Primer dizaynı için hedef genler ve “housekeeping gen” olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve Actβ gen bölgeleri ABD Ulusal Biyoteknoloji Bilgisi Merkezi (NCBI) ve *ensemble* gen bankaları kullanılarak belirlendi. Bu iki fragmentin cDNA sekansları ve normal bölgeleri kullanılarak da primer ve probe düzenlendi. Primer probe düzenleme işlemi *clustal W aling* programı ve *oligo7 software* kullanılarak yapıldı. Elde edilen primer ve problemlerin blast programı ile spesifikliğı kontrol edildi. Primer ve prob dizileri aşağıda verilmiştir:

Tablo 3.1 RT-PZR çalışmasında kullanılan genler ve primer sekansları

Gen Adı	Sağ Primer Sekansı	Sol Primer Sekansı
CD133	CAGCAGAGAGCAGATGACCA	TCCACAGAAATTTACCTACATTGG
OCT3/4	CTTAGCCAGGTCCGAGGAT	CTTCGGATTTTCGCCTTCTC
Sox2	CTGATCATGTCCCGGAGGT	ATGGGTTCGGTGGTCAAGT
Nanog	TTGCTATTCTTCGGCCAGTT	ACAGGTGAAGACCTGGTTCC
Nestin	AAGCTGAGGGAAGTCTTGA	AGGTGGCCACGTACAGGA
GAPDH	AATACGACCAAATCCGTTGACT	AGCCACATCGCTCAGACAC
Actβ	TGGGCACTGAGTGTGTCC	TGTACGTGGCCATTTCAGG

Gerçek zamanlı PZR (kantitatif-PZR)

Elde edilen cDNA'lar, yukarıda belirtilen primer ve probe'lar kullanılarak ve aşağıdaki karışım ve cihaz protokolleri ile LightCycler 480II cihazı ile çalışıldı:

Tablo 3.2 RT-PZR için kullanılan cihaz protokolü

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon			Soğutma
Parametre					
Analiz Modu	Yok	Nicelleştirme Modu			Yok
Döngü	1	45			1
Hedef [°C]	95	95	60	72	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20
Acquisition Mode	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok

Hedef ve “housekeeping” genler için reaksiyon karışımının hazırlanması

Tek reaksiyon için; 6,8 µL nükleaz içermeyen su, 0,5 µL “forward primer” (20µM), 0,5 µL “reverse primer” (20µM), 0,2 µL “taqman probe”-UPL prob (10µM), 10 µL enzim ve dNTP karışımı hazırlandı (toplam 18 µL).

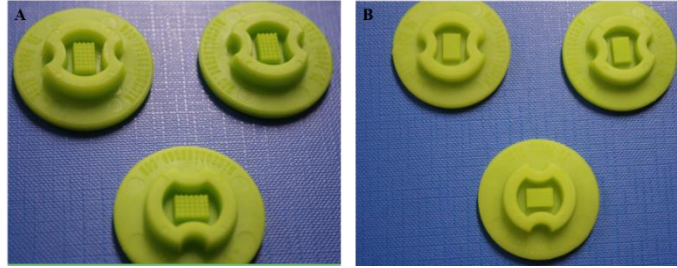
Reaksiyon tüpüne, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden eklendi ve reaksiyon sayısı kadar ilave edilerek reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım homojenize edildi ve kapilerlere ya da kültür kaplarına her bir reaksiyon için 18 µL reaksiyon karışımından aktarıldı. 2 µL örnek veya kontrol her bir kapilere son reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan kapilerler (karışım ilave edildikten sonra) soğuk bloktaki adaptörleri ile birlikte 2000 rpm’ de 15 saniye santrifüjlendi.

Gerçek zamanlı-PZR analizi

Elde edilen sonuçlara bağlı değerlendirme yapabilmek için $\Delta/\Delta C_t$ metodu kullanıldı. Bu metot ile hedef genin C_t değerleri Act β ve GAPDH ile normalize edildi (bu değer ΔC_t olarak geçer). Gruplar arasında oranlanarak elde edilen sonuç $\Delta/\Delta C_t$ ’yi verir ve bu değer 2 den büyük ise o oranda hedef pozitif ifade artışı, -2 den düşük ise hedef “aşağı-regüle” sonucu verildi.

3.4 3D Petri Dish® Tekniği Kullanılarak Agar Jellerin Hazırlanması

3D Petri Dish® tekniği Morgan ve ark. tarafından mikro doku oluşturmak amacıyla geliştirilmiştir. Kısaca, bu teknikte “3D Petri Dish” olarak adlandırılan kalıplar kullanılarak agar jel üzerinde derinlik ve çap boyutu bakımından homojen olan kuyucuklar oluşturulur. Oluşturulan bu kuyucuklarda hücreler kültüre edildiğinde zamanla kendiliğinden bir araya gelme ve tutunma süreci sonunda mikro dokular oluşur (Rago et al. 2008; T. Achilli, McCalla, and Meyer 2014; Dean, Rago, and Morgan 2009).



Şekil 3.3 1 Mikro dokuların oluşturulması için kullanılan 3D Petri Dish® kalıpları. (A) 800 µm çaplı kuyucukların oluşturulması için kullanılan kalıplar (B) 400 µm çapına sahip kuyucukların oluşturulması için kullanılan kalıplar.

3.4.1 Gereç

Agar jellerin oluşturulması amacıyla yapılan çalışmada aşağıda belirtilen gereçler kullanılmıştır.

1. 3D Petri Dish kalıpları (MicroTissue Inc., ABD) (Şekil 3.2)
2. Agar (Sigma, ABD)
3. Sodyum hidroksit (NaOH, Merck, Almanya)
4. Otoklav (Hirayama, ABD)
5. 24 gözlü kültür kapları (Greiner, Cellstar®, Almanya)
6. Küt uçlu pens

7. Cam şişe
8. Manyetik ısıtıcı (Wisd Laboratory Instruments, Almanya)
9. Hassas terazi (Sartorius, Almanya)

3.4.2 Yöntem

Mikro doku çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen agar jellerin hazırlanması için aşağıda verilen yöntemden yararlanılmıştır:

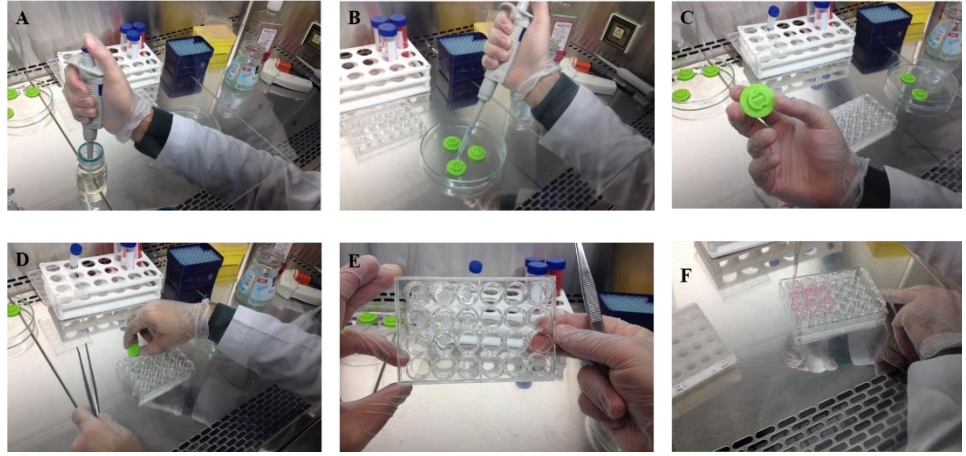
3.4.2.1 Agar solüsyonun hazırlanması

- 0,45 gram NaCl hassas terazi kullanılarak tartılıp 50 mL distile suda çözdürüldü
- 1 gram agar tartılarak 50 mL tuzlu suyun içine konuldu. Böylece %2 agar, %0,95 NaCl içeren agar solüsyonu hazırlanmış oldu.
- Hazırlanan agar solüsyonu, kalıplar ve küt uçlu pens otoklava atılmak üzere hazırlandı.
- Hazırlanan malzemeler 121 °C’de, 1,02 atm basınçta 20 dakika otoklavda steril edildi.

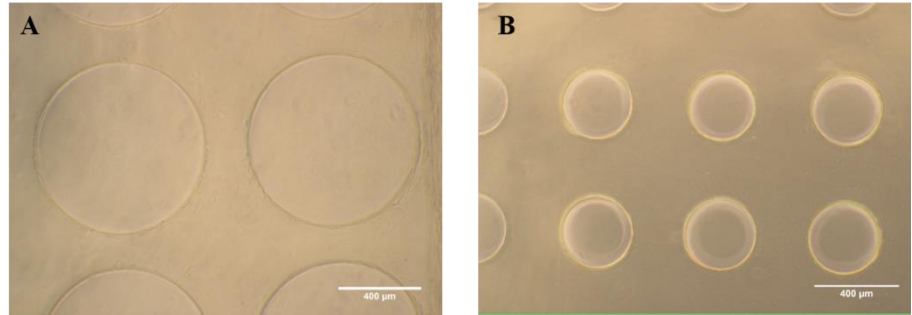
3.4.2.2 Agar jellerin hazırlanması (Sekil 3.3)

1. Otoklavda sterilizasyonu yapılan agar çözeltisi, kalıplar ve küt uçlu pens %70 etil alkol ile dezenfekte edilerek laminar akışlı biyogüvenlik kabinine kabine alındı.
2. Agar solüsyonundan 330 µL alınıp 3D Petri Dish® kalıbının içine konuldu.
3. Agar jelleştikten sonra kalıp ters çevrilerek oluşan jel, küt uçlu pens kullanılarak 24 gözlü kültür kabının içine düşmesi sağlandı.
4. Küt uçlu pens kullanılarak agar jellerin kuyucuklarının çalışana bakacak şekilde konumlandırılması sağlandı.

5. Oluşan agar jeller hücre ekimi yapılmadan şartlandırıldı. Bunun için 1 mL yukarıda tanımlanan büyüme ortamından alınıp jellerin üzerine konuldu ve standart kültür şartlarında 45-60 dk bekletildi.



Şekil 3.4 3D Petri Dish® tekniği kullanılarak agar jellerin hazırlanması.(A,B) Agar solüsyonundan kalıplara konulması (C) Agarın kalıplarda jelleşmesi (D) Kalıpların ters çevrilmesi ile oluşan agar jellerin kültür kabına düşmesi (E) Oluşan agar jeller ve (F) Agar jellerin üzerine ortam eklenmesi.



Şekil 3.5 Agar jellerde oluşan kuyucukların mikroskopik görünümü (A) 800 µm ve (B) 400 µm çapına sahip kuyucuklar. (Olympus, CK-40-SL, Japonya, 4X).

3.5 CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 Hücrelerinin Mikro Doku Oluşturma Yetilerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak olan kemik kanseri kök hücreleri (CD133⁺), tümörojenik olmayan kemik kanseri hücreleri (CD133⁻) ve SaOs-2 hücre dizisinin mikro doku oluşturup oluşturamadığının araştırılması amacıyla tasarlanan deneysel çalışmada her tip hücreden 5x10⁴ hücre/75 µL, 1x10⁵ hücre/75 µL ve 5x10⁵ hücre/75 µL kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda pasaj numarası 18 olan SaOs-2

hücreleri kullanılmıştır. SaOs-2 hücreleri çoğaltıldıktan sonra MACS tekniği kullanılarak CD133⁺ hücreleri ayrıştırıldı. Aşağıda verilen yöntem kullanıldı:

1. SaOs-2 hücreleri tripsinizasyon yöntemi (3.1.2.3) ile kaldırılıp sayıldı.
2. Sayım sonucunda toplam SaOs-2 sayısı 2x10⁸ olarak hesaplandı.
3. MidiMACS seperatörü ve LS kolonu kullanılarak ayırım (3.3) yapıldı.
4. Hücre ayırımından sonra boya almama esaslı tripan mavisi tekniği kullanılarak CD133⁺ ve CD133⁻ hücre sayıları belirlendi. Yapılan sayımda toplamda 6,67x10⁶ CD133⁺ ve 3,6x10⁷ CD133⁻ elde edildiği görüldü.
5. 1 gün önceden (3.4) yukarıda bildirilen yönteme göre hazırlanan agar jellerin üzerindeki besi ortamı çekilerek hücre kültürü hazırlandı. Bu çalışmada 400 µm kuyucuk çapı oluşturmak için kullanılan kalıplar kullanıldı (Şekil 3. 2).
6. Hücreler elde edildikten sonra her hücre tipi için 3 tekrarlı olacak şekilde jel başına 5x10⁴ hücre/75 µL, 1x10⁵ hücre/75 µL ve 5x10⁵ hücre/75 µL konsantrasyonlarında agar jellere ekim yapıldı ve jeller 10 dakika standart kültür koşullarında bekletildi.
7. 10 dakika sonra agar jellerin üzerine %2,5 FBS, 2mM L-glutamin, 0,01 mg/mL gentamisin ve %96,4 DMEM (d-glikoz konsantrasyonu 4,5 g/L) içeriğine sahip büyüme ortamından 600 µL alınıp jellerin üzerine konuldu ve jeller standart kültür koşullarında inkübe edildi.

8. Deney 4 gün devam ettirildi. 4 gün boyunca ters faz kontrast ışık mikroskobu kullanılarak oluşan mikro dokular fotoğraflandı.
9. 4 gün boyunca çekilen fotoğrafların “Image J” programında boyut analizi yapılarak zamanla mikro doku boyutunda meydana gelen değişim grafiğe geçirildi.

3.6 CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 Mikro Dokularının Karakterizasyonu

CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların karakterizasyon işlemlerinin yapılabilmesi amacıyla canlı&ölü analizi, İmmünohistokimya ve RT-PZR yapıldı. Bu çalışmada mikro dokuların karşılaştırılması için standart polistren kültür yüzeylerinde aynı kültür süresi boyunca kültive edilen hücreler kontrol olarak kullanıldı. Yukarıda ifade edilen analiz yöntemleri kontrol gruplarına da uygulandı. Bu analizlere ait yöntemler aşağıda verilmiştir:

3.6.1.1 Gereç

Mikro dokuların karakterizasyonunun yapılması amacıyla tasarlanan çalışmada sırasıyla yukarıda bildirilen (3.1, 3.3, ve 3.4) çalışmalarda kullanılan gereçler kullanıldı. Ayrıca canlı&ölü analizi için aşağıda verilen gereçler kullanıldı.

1. Live/Dead[®] canlılık/sitotoksosite kiti (Invitrogen, İngiltere)
2. Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS (Sigma, ABD)
3. Floresan mikroskop (Leica, Almanya)
4. Vorteks cihazı (Heidolph, Almanya)

3.7.1.2 Yöntem

Mikro dokuların oluşturulması

Mikro doku karakterizasyonu amacıyla RT-PZR, IHK ve canlı&ölü analizleri yapıldı. Bahsi geçen analizlerin yapılmasında kullanılan mikro dokuların oluşturulması aşağıda verilen yöntemle gerçekleştirildi.

1. SaOs-2 hücreleri tripsinizasyon yöntemi ile kaldırılıp sayıldı. Bu amaçla yukarıda verilen (3.1.2.3) yöntem kullanıldı.
2. Sonuçta toplam $2,55 \times 10^8$ SaOs-2 hücresinin var olduğu hesapladı.
3. MidiMACS seperatörü ve LS kolonu kullanılarak ayırım yapıldı. Ayırım işlemi yukarıda (3.3) verilen yöntem kullanılarak yapıldı.
4. Hücre ayırımından sonra boya almama esaslı tripan mavisi tekniği kullanılarak $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücre sayıları belirledi. Yapılan sayımda toplamda $2,1 \times 10^6$ $CD133^+$ ve $1,7 \times 10^7$ $CD133^-$ elde edildiği görüldü.
5. 1 gün önceden yukarıda (3.4) bildirilen yönteme göre hazırlanan agar jellerin üzerindeki besi ortamı çekilerek hücre kültürü aşamasına geçildi. Bu çalışmada 400 μ m kuyucuk çapı oluşturmak için kullanılan kalıplar kullanıldı.
6. Her jelle 1×10^5 hücre/75 μ L ve 3 tekrarlı olacak şekilde agar jellere hücre ekimi yapıldı. Yapılması planlanan tüm analizler için kurulan setlerde bu hücre sayısı kullanıldı.
7. Jeller 10 dakika 37 °C' de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren ortamda (standart kültür koşulları) bekletildi.
8. 10 dakika sonra agar jellerin üzerine %2,5 FBS, 2 mM l-glutamin, 0,01 mg/mL gentamisin ve %96,4 DMEM (d-glikoz konsantrasyonu 4,5 g/L) içeriğine sahip büyüme ortamından 600 μ L alınıp jellerin üzerine konuldu ve jeller standart kültür koşullarında inkübe edildi.
9. Çalışma 4 gün devam ettirildi. 4. gün sonunda analizler yapıldı.
10. 2. ve 4. günde ters faz ışık mikroskobu ile fotoğraflar çekildi.

3.6.1 Mikro dokuların immünohistokimyasal analizi

CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak mikro dokular oluşturuldu. Oluşturulan mikro dokuların karakterizasyonu amacıyla immünohistokimyasal boyama yapılarak *CD133*, *OCT3/4*, *Sox2* ve *Ki-67* belirteçlerin ekspresyonuna bakıldı. Deneme kısıtlı olanaklar nedeniyle çalışma 2 tekrarlı olarak kurgulandı. 4 gün süren kültürden sonra aşağıda verilen yöntem kullanılarak immünohistokimya yapıldı.

Karşılaştırma grubu olarak 2B kültür sistemi kullanıldı. Her gen için her hücre tipiden bir göz olmak kaydıyla kültür başlatıldı ve 4 gün devam etti. 4 gün sonunda aşağıda verilen protokol dikkate alınarak kontrol grubuna immünohistokimya uygulandı.

Deney gruplarına yapılan immünohistokimya analizi yöntemi (3B kültür sistemi)

1. 4.gün sonunda CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 mikro dokularına IHK'nin yapılabilmesi için örnekler fikse edildi. Tespit işlemleri aşağıda verilen yöntemle gerçekleştirildi:
 - İçinde mikro dokular bulunan jeller 3 kez PBS ile yıkandı
 - 4 °C' de bulunan soğuk PFA çözeltisi (%4) jellerin üzerine eklenerek 300 rpm' de çalkalanarak, oda sıcaklığında, 60 dakika fiksasyon yapıldı
 - Örnekler tespit işleminden sonra 3 kez PBS ile yıkandı
 - Yıkama işleminden sonra örnekler içinde %0,1 sodyum azit bulunduran PBS içine alındı.
2. Agar jellerden enine kriyostat aracılığıyla 8 µm kalınlığında kesitler alındı.
3. Örnekler -20°C'de bekletildi ve boyama öncesi 37 °C'de PBS içerisinde 2 değişim olarak yıkandı.

4. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dk hidrojen peroksit çözeltisi (H_2O_2 , %3) uygulandı ve kesitler 5 dk olmak üzere 3 defa PBS ile yıkandı.
5. Bloklama solüsyonu ile 1 saat bloklama yapıldı.
6. Kesitler *CD133*, *OCT3/4*, *Sox2* ve *Ki67* belirteçlerine spesifik primer antikörler ile 12 saat 4 °C’de inkübe edildi.
7. Üç defa PBS ile yıkanan örnekler biotinlenmiş ikincil antikörler ile 30 dk inkübe edildi.
8. PBS ile üç defa 5’er dakika yıkanan örnekler streptavidin hidrojen peroksidaz içinde 30 dk bekletildi.
9. Tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere 5 dakika DAB kromojeni uygulandı.
10. Kesitler Mayer’s hematoksilen ile 1 dakika boyandıktan sonra distile su ile yıkandı ve immünohistokimya kapatma çözeltisi (Merck Millipore-107961, Almanya) ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskobu (Olympus BX-40, Japonya) ile incelendi

Kontrol gruplarına yapılan immünohistokimya analizi yöntemi (2B sistemi)

1. Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besi ortamı çekildi ve hücreler Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS ile üç kez yıkandı.
2. 4 °C’ de bulunan soğuk PFA çözeltisi (%4) yüzeyler üzerine eklendi ve 300 rpm’ deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında, 60 dk fiksasyon yapıldı. Tespit basamağının ardından PFA çekildi ve yüzeyler tekrar Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren sodyum azitli PBS eklenerek analiz başlangıcına kadar saklandı.
3. Analiz başlangıcında saklanan örneklerin üzerindeki sodyum azitli PBS çekilerek, üç defa PBS ile yıkandı. Yıkanan örnekler belirlenen primer antikörlerle 3 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Üç defa PBS ile yıkanan örnekler biotinlenmiş ikincil antikörler ile 30 dk inkübe edildi.

5. PBS ile üç defa 5'er dakika yıkanan örnekler streptavidin hidrojen peroksidaz içinde 30 dk bekletildi.
6. Tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere 5 dakika DAB kromojeni uygulandı.
7. Kesitler Mayer's hematoksilen ile 1 dk boyandıktan sonra distile su ile yıkandı ve immunohistokimya kapatma çözeltisi (Merck Millipore-107961, Almanya) ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskobu (Olympus BX-40, Japonya) ile incelendi.

3.6.2 Mikro dokularda canlı&ölü hücre analizi

Üç hücre grubu kullanılarak oluşturulan mikro dokularda canlı ve ölü hücrelerin belirlenmesi amacıyla canlı&ölü analizi yapıldı. Kısıtlı imkanlar nedeniyle 2 tekrarlı olarak tasarlanan çalışmada jel başına 1×10^5 hücre ekimi gerçekleştirildi. Kültür 4 gün devam ettirildi ve 4. günde aşağıda verilen yöntem kullanılarak canlı&ölü hücre analizi yapıldı.

Kontrol grubu olarak her üç hücre grubundan kısıtlı imkanlar nedeniyle 2 tekrarlı olmak üzere hücreler polistren yüzey üzerinde kültüre edildi. Kültür 4 gün sürdürüldü ve aşağıda verilen yöntem kullanılarak boyama yapıldı.

Canlı&Hücre Analizi

Canlı&ölü analizi amacıyla *Live/Dead*[®] canlılık/sitotoksosite kiti kullanıldı. Kit iki komponentten oluşmaktadır. İlk komponent canlı hücrelerin belirlenmesini sağlayan *Calcein AM*'dir. *Calcein AM* hücre membranından geçebilme özelliğine sahiptir. Normalde non-floresans özellikte olan *Calcein AM* hücre stoplazmasında intraselüler aktivite (esteraz aktivitesi) ile enzimatik hidrolize uğrayarak floresan özellikteki *calcein*'e dönüşür ve böylece floresans mikroskop altında bakıldığında canlı hücre yeşil renkte gözükür. Polianyonik bir molekül olan *Calcein* canlı hücreler tarafından kolayca tutulabilmektedir. İkinci komponent ise ölü hücrelerin belirlenmesini sağlayan *etidyum homodimer-1*' (EthD-1)'dir. Normal şartlarda EthD-1 canlı hücrenin

membranından geçemez. Hücre membran bütünlüğü bozulduğunda yani hücre öldüğünde EthD-1 hücre içine girer ve nükleik asitlere bağlanır. Canlılığını yitirmiş hücreler EthD-1 ile boyandığında floresans mikroskop altında kırmızı renkte görünürler.

Analizin yapılması amacıyla ilk adım olarak çalışma solüsyonunun hazırlanması gerekir. Aşağıda verilen yöntem kullanılarak çalışma solüsyonu hazırlandı.

- Kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildi. Bileşenler eridikten sonra santrifüj edildi.
- 2 mM'lık EthD-1 stok solüsyonundan 20 μ L alınıp 10 mL steril ve hücre kültüründe kullanılabilen PBS içine konuldu.
- Solüsyonun iyice karışması için vortekslendi. Böylece 4 μ M'lık EthD-1 solüsyonu hazırlanmış oldu.
- Hazırlanan EthD-1 solüsyonuna 4 mM'lık calcein AM stok solüsyonundan 5 μ L konuldu ve karışım vortekslendi. Böylece 2 μ M'lık calcein AM içeren 4 μ M'lık EthD-1 çalışma solüsyonu hazırlanmış oldu.

Çalışma solüsyonu hazırlandıktan sonra hem mikro dokular hem de kontrol grubu aşağıda verilen yöntemle boyandı:

1. Hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Hazırlanan çalışma solüsyonundan hücrelerin yüzeyini kaplayacak kadar konuldu.
3. Oda sıcaklığında 30-45 dk inkübasyona bıraktı.
4. İnkübasyondan sonra hücreler PBS ile yıkandı.
5. Hücrelere floresans mikroskopta bakılarak fotoğraf çekildi.
6. Çekilen fotoğraflar "Image J" programı kullanılarak işlendi.

3.6.3 Mikro dokularda RT-PZR ile gen ifade seviyelerinin belirlenmesi

3 hücre grubu kullanılarak mikro dokular oluşturuldu. Bu amaçla daha önce tanımlanmış olan yöntemden yararlanıldı. Jel başına 1×10^5 hücre kullanıldı ve çalışma 3 tekrarlı olarak tasarlandı. Kültür 4 gün devam ettirildi. Yapılan analizde *CD133*, *Oct3/4*, *Sox2*, *nestin* ve *nanog* ifade seviyelerine bakıldı. Ayrıca, karşılaştırma grubu olarak 2B kültür sistemi kullanıldı. Bu amaçla göz başına 1×10^5 hücre ekimi gerçekleştirildi ve çalışma 3 tekrarlı yapıldı.

4. gün sonunda analizin yapılabilmesi amacıyla 2B kültür sisteminde kültüre edilen hücreler tripsinizasyon yöntemiyle polistren yüzeyden kaldırılarak 2 mL hacimli santrifüj tüplerinde toplandı ve santrifüj edilerek hücrelerin pellet olarak çöktürülmesi sağlandı. Santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant dökülerek elde edilen pellet analizin yapılacağı zamana kadar -86°C 'de bekletildi.

3 hücre grubu kullanılarak oluşturulan mikro dokular jellerden hasat edilmeden önce, 4. gün sonunda analize gönderildi. Analizin yapılacağı laboratuvarında (Genmar, İzmir) yukarıda (3.3.2.1) anlatılan yöntem kullanılarak mikro dokularda ve kontrol gruplarında gen ifade seviyeleri belirlendi. Analiz sonunda elde edilen verilerin ortalaması alınarak grafiğe geçirildi.

3.7 CD133^+ ve CD133^- Hücrelerinin Mikro Dokudaki Yerleşim Örüntüsünün İncelenmesi

CD133^+ ve CD133^- hücrelerinin mikro dokulardaki yerleşim örüntüsünün incelenmesi amacıyla Tablo-3.3'de verilen hücre oranları kullanılarak ko-kültür gerçekleştirilmiştir. Mikro dokulardaki hücre yerleşim örüntüsünün incelenmesi için MACS tekniği ile SaOs-2 hücre dizisinden ayrımlanan CD133^+ hücreler kırmızı renkli CellTracker™, CD133^- hücreler

yeşil renkli CellTracker™ ile boyandı. Yapılan çalışmanın detayları aşağıda verildi.

3.7.1 Hücrelerin CellTracker™ ile boyanması

Çalışmada kullanılan hücreleri boyamak amacıyla öncelikle stok solüsyonu daha sonra da çalışma solüsyonu hazırlandı. Solüsyonların hazırlanmasında aşağıda verilen adımlar takip edildi:

3.7.1.1 Stok ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Gereç

Stok solüsyonu ve çalışma solüsyonun hazırlanması için aşağıda verilen gereçler kullanıldı:

1. Liyofilize edilmiş CellTracker™ boyası (Invitrogen, İngiltere)
 - CellTracker™ Red CMTPX, 50 µg
 - CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate), 50 µg
2. DMSO (Sigma, ABD)
3. DMEM (4,5 g/L, Gibco, İngiltere)
4. 2 mL hacimli steril tüpler (LP Italiana SPA, İtalya)

Yöntem

1. Liyofilize edilmiş ve -20 °C de dondurulmuş CellTracker boyası oda sıcaklığına getirildi.
2. Boyanın moleküler ağırlığı dikkate alınarak yapılan hesaplamalar sonucunda 50 µg için 10,7 µL hücre kültüründe kullanılabilen en fazla %0,1 su içeriğine sahip DMSO alınarak boyanın çözünmesi sağlandı.
3. Hazırlanan 10 mM derişime sahip stok solüsyonundan 3 µL alınarak 2 mL hacimli steril tüpe aktarıldı

4. 1997 µL DMEM (d-glikoz konsantrasyonu 4,5 g/L) alınarak içinde boya bulunan tüpe aktarıldı.
5. 15 µM derişimli çalışma solüsyonu kullanılmaya hazır hale getirildi.

Yukarıda verilen yöntem her iki boya türünün hazırlanması için kullanılmıştır.

3.7.1.2 Süspanse haldeki hücrelerin CellTracker™ ile boyanması

CD133⁺ ve CD133⁻ hücreleri beraber kullanılarak oluşturulan mikro dokularda hücre yerleşim örüntüsünün incelenmesi için CD133⁺ hücreleri kırmızı, CD133⁻ hücreleri yeşil renkle boyandı. Bu amaçla aşağıda verilen gereç ve yöntem kullanıldı:

Gereç

Aşağıda listelenen gereçler hücrelerin CellTracker™ ile boyanması amacıyla kullanıldı:

1. CellTracker™ çalışma solüsyonları (Invitrogen, İngiltere)
2. Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ içermeyen PBS (Sigma, ABD)
3. DMEM (d-glikoz konsantrasyonu 4,5 g/L, Gibco, İngiltere)
4. %2,5 FBS (Biochrom, Almanya) içeriğine sahip büyütme ortamı
5. CO₂'li inkübatör (Thermo Scientific, ABD)
6. Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, ABD)
7. 15 mL hacimli santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya)

Yöntem

1. 15 mL hacimli santrifüj tüpünde bulunan hücreler 4 °C 'de 1000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutularak çöktürüldü ve süpernatant döküldü

2. Hücre pelletinin üzerine 2 mL PBS konularak tekrar santrifüj yapılarak hücreler yıkandı. Bu işlem 2 defa tekrarlandı
3. Yıkama işleminden sonra hücrelerin üzerine yukarıda **(3.7.1.1)** bildirilen yöntemle hazırlanmış çalışma solüsyonundan 2 mL konularak pipetleme ile homojenize edildi ve 45 dk standart hücre kültürü koşullarında bekletildi.
4. 45 dk 37 °C’de karanlıkta bekletilen hücreler 4 °C ‘de 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek boyanın hücrelerden uzaklaştırılması sağlandı.
5. 2 mL serumsuz DMEM (d-glikoz konsantrasyonu 4,5 g/L) alınarak hücreler süspanse hale getirildi ve 30 dk standart hücre kültürü koşullarında bekletildi.
6. 30 dk serumsuz ortamda bekletilen hücreler santrifüj edilerek serumsuz ortam uzaklaştırıldı.
7. Hücre pelleti büyütme ortamı ile homojenize edildikten sonra hücreler beraber kültüre edilmeye hazır hale geldi.

3.7.2 3B mikro doku sisteminde CD133⁺ hücre yerleşimin belirlenmesi

3.6.2.1 Gereç

Hücre yerleşim örüntüsünün incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada sırasıyla yukarıda **(3.1.2.4, 3.3, 3.4 ve 3.7.1)** belirtilen çalışmalarda bildirilen gereçler kullanıldı. Bu gereçlere ek olarak mikro dokularda oluşan yerleşim örüntüsünün belirlenmesi amacıyla floresan mikroskop (Leica, Almanya) kullanıldı.

3.7.2.2 Yöntem

1. SaOs-2 hücreleri tripsinizasyon yöntemi ile kaldırılıp sayıldı. Bu amaçla yukarıda verilen **(3.1.2.4)** yöntem kullanıldı.
2. Sayım sonucunda toplam SaOs-2 sayısı $1,3 \times 10^8$ olarak hesaplandı.
3. MidiMACS seperatörü ve LS kolonu kullanılarak ayırım yapıldı. Ayırım işleminde yukarıda **(3.3)** verilen yöntem kullanıldı.

4. Hücre ayırımından sonra boya almama esaslı tripan mavisi tekniği kullanılarak $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücre sayıları belirlendi. Yapılan sayımda toplamda 4.25×10^6 $CD133^+$ ve 3.1×10^7 $CD133^-$ elde edildiği görüldü.
5. Hücreler elde edildikten sonra Tablo 3.3’de yer alan hücre oranları ve hücre sayıları dikkate alınarak hücreler kırmızı ve yeşil floresan boyalarla boyandı.
6. 1 gün önceden hazırlanan agar jellerin üzerindeki besi ortamı çekilerek hücre kültürü hazırlandı.
7. Tablo-3.1’de yer alan oranlar dikkate alınarak 3 tekrarlı olacak şekilde agar jellere hücre ekimi yapıldı ve jeller 10 dakika standart kültür koşullarında bekletildi.
8. 10 dakika sonra agar jellerin üzerine %2,5 FBS, 2 mM L-glutamin, 0,01 mg/mL gentamisin ve %96,4 DMEM (d-glikoz konsantrasyonu 4,5 g/L) içeriğine sahip büyüme ortamından 600 μ L alınıp jellerin üzerine konuldu ve jeller standart kültür koşullarında inkübe edildi.
9. Deney 7 gün devam ettirildi. 7 gün boyunca floresan mikroskobu kullanılarak oluşan mikro dokulardaki hücre yerleşimi fotoğraflandı.
10. 7 gün boyunca çekilen fotoğraflar kullanılarak “Image J” programında boyut analizi yapılarak zamanla mikro doku boyutunda meydana gelen değişim grafiğe geçirildi.
11. 7. gün sonunda örnekler *CD133*, *OCT4*, *Sox2* ve *Ki67* belirteçlerinin immünohistokimyasal boyama ile belirlenmesi amacıyla Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bölümü’ne gönderildi.

3.7.3 Mikro dokuların immünohistokimyasal analiz

Mikro dokulardaki $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücrelerinin yerleşimlerinin görüntülenmesi ve mikro dokularda kanser kök hücre belirteci olarak kullanılan *CD133*, *OCT4*, *Sox2* ve hücre çoğalmasının olup olmadığını gösteren *Ki67* belirteçlerinin ifadelerin analiz edilmesi amacıyla bu

belirteçlere spesifik antikorlar kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Yöntem aşağıdaki gibidir:

- 1- 7 gün boyunca hücre yerleşim örüntüsü floresan mikroskop ile yapılan gözlemlerle takip edilen mikro doku örnekleri 7. gün sonunda IHK'nin yapılabilmesi için fikse edildi. Tespit işlemleri aşağı verilen yöntemle gerçekleştirildi:
 - İçinde mikro dokular bulunduran jeller 3 kez PBS ile yıkandı
 - +4 °C' de bulunan soğuk paraformaldehit (PFA) çözeltisi (%4) jellerin üzerine eklenerek 300 rpm' de çalkalanarak, oda sıcaklığında, 60 dakika tespit edildi.
 - Tespitten sonra jeller 3 kez PBS ile yıkandı
 - Yıkama işleminden sonra örnekler içinde %0,1 sodyum azit bulunduran PBS içine alındı.
- 2- Agar jellerden enine kriyostat aracılığıyla 8 µm kalınlığında kesitler alındı.
- 3- Örnekler -20 °C'de bekletildi ve boyama öncesi 37°C'de PBS içerisinde 2 değişim olarak yıkandı.
- 4- Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dk %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂ solüsyonu, %3) uygulandı ve kesitler 5 dk olmak üzere 3 defa PBS ile yıkandı.
- 5- Bloklama solüsyonu ile 1 saat bloklama yapıldı.
- 6- Kesitler *CD133*, *OCT4*, *Sox2* ve *Ki67* belirteçlerine spesifik primer antikorlar ile 12 saat 4 °C'de inkübe edildi.
- 7- Üç defa PBS ile yıkanan örnekler biotinlenmiş ikincil antikorlar ile 30 dk inkübe edildi.
- 8- PBS ile üç defa 5'er dk yıkanan örnekler streptavidin hidrojen peroksidaz içinde 30 dk bekletildi.
- 9- Tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere 5 dk diaminobenzidin (DAB) kromojeni uygulandı.
- 10- Kesitler Mayer's hematoxilen boyası ile 1 dakika boyandıktan sonra

distile su ile yıkandı ve IHK kapatma çözeltisi (Merck Millipore-107961, Almanya) ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskobu (Olympus BX-40, Japonya) ile incelendi

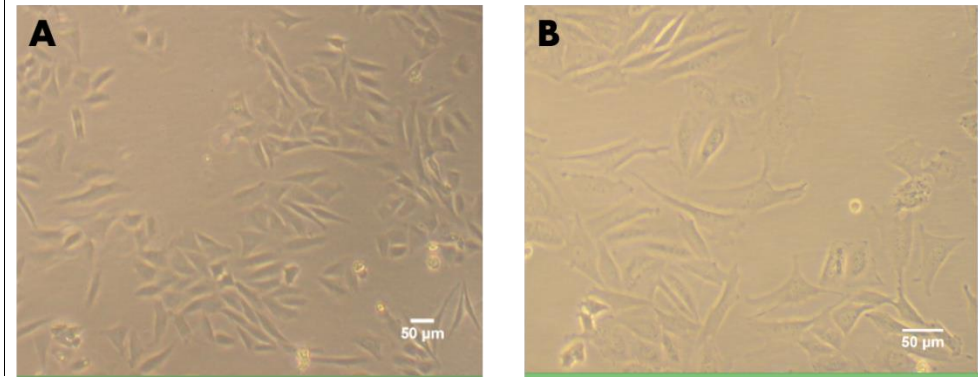
Tablo 3.3 CD133⁺ ve CD133⁻ hücreleri beraber kültüre edilerek mikro dokuların oluşturulmasında kullanılan hücre sayıları ve oranları.

CD133 ⁺ Hücre Oranı	CD133 ⁻ Hücre Oranı	CD133 ⁺ Hücre Yüzdesi (%)	CD133 ⁺ Hücre Sayısı (37,5 µL)	CD133 ⁻ Hücre Sayısı (37,5 µL)	Toplam Hücre Sayısı (75 µL)
1	1	50	0,5x10 ⁵	0,5x10 ⁵	1x10 ⁵
1	3	25	0,25x10 ⁵	0,75x10 ⁵	1x10 ⁵
1	7	12,5	0,125x10 ⁵	0,875x10 ⁵	1x10 ⁵
1	9	10	0,1x10 ⁵	0,9x10 ⁵	1x10 ⁵
1	19	5	0,05x10 ⁵	0,95x10 ⁵	1x10 ⁵
1	39	2,5	0,025x10 ⁵	0,975x10 ⁵	1x10 ⁵

4. BULGULAR

4.1 SaOs-2 Hücre Dizisi Morfolojisi

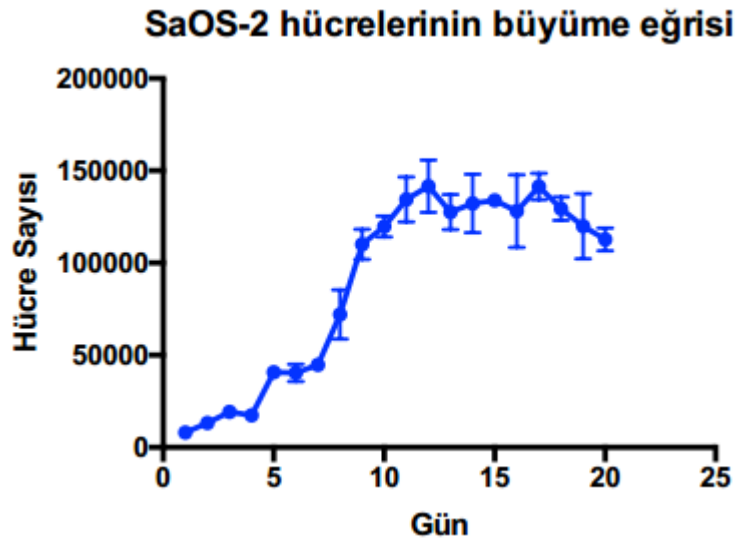
Çalışmada kullanılan insan kaynaklı osteosarkoma kanseri hücre dizisi (SaOs-2) büyütme ortamında kültüre edilmiştir. Kültür şartlarında çoğalmakta olan hücrelerin morfolojik gözlemleri ters faz ışık mikroskobu ile yapılmıştır. Yapılan gözlemler SaOs-2 hücrelerin, kültür kabının yüzeyine tutunarak çoğaldığı ve tutunma gerçekleştikten sonra hücrelerin yayılarak osteoblastik hücre morfolojisi kazandığını göstermiştir. Hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunmasında bipolar uzantıların etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca mikroskobik gözlemler hücre büyüklüğü ve morfolojisi açısından genellikle homojen bir yapının sergilendiğini de göstermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 SaOs-2 Hücrelerinin ters faz kontrast ışık mikroskobu görüntüsü. A) 4X büyütme ve B) 10X büyütmedeki görüntüsü. (Olimpus, CK-40-SL, Japonya) Ölçek çizgisi:50 µm

4.2 Hücre Karakterizasyonu

SaOs-2 hücre dizisinin karakterizasyonu amacıyla %2,5 FBS içeriğine sahip ortamda kültüre alınarak büyüme grafiği çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlar SaOs-2 hücrelerinin 12 gün sonunda durağan faza, 17 gün sonra ise ölüm fazına girdiğini göstermiştir (Şekil 4.2)(Anıl, 2014).



Şekil 4.2 SaOs-2 hücre dizisinin %2,5 FBS ortam bileşimine sahip büyüme ortamındaki büyüme kinetiği verileri (Anıl, 2014).

4.3 CD133⁺ Hücrelerinin MACS ile Ayrılması

Çalışma kapsamında kullanılan *CD133* belirtecini ifade eden ve kök hücre özelliği gösterdiği bilinen hücrelerin elde edilmesi amacıyla SaOs-2 hücre dizisi kullanılmıştır. SaOs-2 hücre dizisinden kök hücre özelliği gösteren hücrelerin ayrılması için MACS tekniği kullanılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda $CD133^{+}$, $CD133^{-}$ ve SaOs-2 hücrelerinin mikro doku oluşturma kabiliyetlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan ayırmada (1 numaralı ayırım) elde edilen $CD133^{+}$ hücre oranı, ayırım için kullanılan toplam SaOs-2 hücre sayısının %3,3'ünü, mikro dokulardaki hücre lokalizasyon örüntüsünün

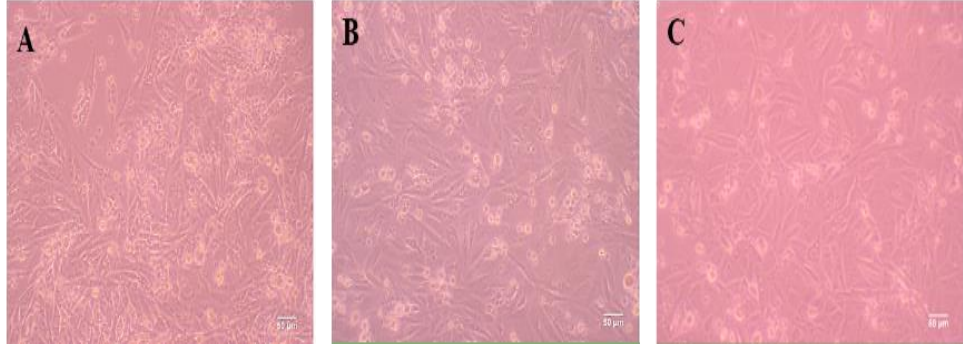
belirlenmesi amacıyla yapılan ayırimda (2 numaralı ayırım) elde edilen CD133⁺ hücre oranı, toplam SaOs-2 hücre sayısının %3,27'sini ve mikro dokuların karakterizasyonu amacıyla yapılan ayırimda (3 numaralı ayırım) elde edilen CD133⁺ hücre oranı, toplam SaOs-2 hücre sayısının %0,84'ünü oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca 1, 2 ve 3 numaralı ayırımlarda sırasıyla %78,6, %72,6 ve %92,4 oranında hücre kaybı meydana geldiği anlaşılmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 MACS ayırımlarında elde edilen CD133⁺ hücre verimleri

Ayırım Numarası	Kullanılan Seperator Tipi	Kullanılan Toplam SaOs-2 Sayısı	Elde Edilen CD133 ⁺ Hücre Sayısı	Elde Edilen CD133 ⁻ Hücre Sayısı	CD133 ⁺ Hücre içeriği (%)	Kolonda Kaybedilen Hücre Miktarı (%)
1	MidiMACS	2x10 ⁸	6,67x10 ⁶	3,6x10 ⁷	3,3	78,6
2	MidiMACS	1,3x10 ⁸	4,25x10 ⁶	3,1x10 ⁷	3,27	72,9
3	MidiMACS	2,51x10 ⁸	2,1x10 ⁶	1,7x10 ⁷	0,84	92,4

4.3.1 CD133⁺ ve CD133⁻ hücre morfolojileri

SaOs-2 hücre dizisinden MACS tekniği kullanılarak elde edilen CD133⁺ ve CD133⁻ hücrelerinin morfolojik gözlemleri kültür süresince ters faz kontrast ışık mikroskobu ile yapılmıştır. CD133⁺ ve CD133⁻ hücrelerinin osteoblastik hücre morfolojisi gösterdiği ve SaOs-2 hücreleri ile kıyaslandığında morfolojik olarak belirgin bir farkın olmadığı ve SaOs-2 hücrelerine benzedikleri görülmüştür. Ayrıca bu hücre gruplarının morfolojik karakterlerini kültür süresi boyunca devam ettirdikleri tespit edilmiştir. Hücre büyüklükleri bakımından da incelendiğinde bu hücre tiplerinin SaOs-2 hücrelerine benzerlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3 CD133⁺(A) ve CD133⁻ (B) hücre morfolojilerinin SaOs-2 (C) hücre morfolojisi ile kıyaslanması. (Olimpus, CK-40-SL, Japonya) Ölçek çizgisi 50 µm

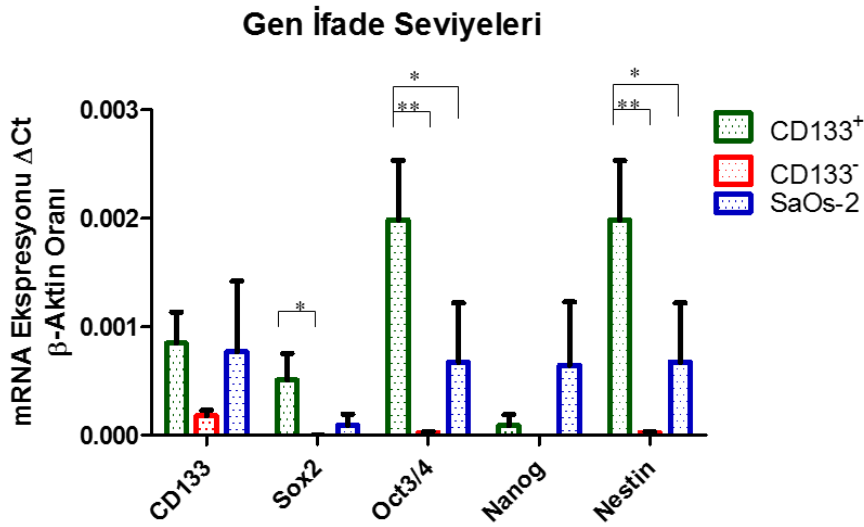
4.3.2 Ayrım sonucunda elde edilen hücre gruplarının gen ifadesi sonuçları

CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücrelerinin mikro doku oluşturma yetilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma için ayırım sonucu elde edilen hücrelerin *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4*, *Nanog* ve *Nestin*'in mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeyinde ifadelerine bakmak amacıyla RT-PZR analizi yapılmıştır. Analiz sonucu elde edilen veriler β -*aktin* referans genine normalize edilerek grafiğe geçirilmiştir. Ayrıca hücre grupları arasında gen ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı tek faktörlü ANOVA testi uygulanarak belirlenmiştir.

Elde edilen veriler *CD133* ifadesi bakımından CD133⁺ ve CD133⁻ hücreleri arasında fark olduğunu ve bu farkın 4,74 kat olduğunu fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir ($P>0,005$). *CD133* gen ifadesi açısından CD133⁺ ve SaOs-2 hücreleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). *Sox2* gen ekspresyon bakımından CD133⁺ ve CD133⁻ hücre grupları arasında tespit edilen farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P<0,05$) fakat CD133⁺ ve SaOs-2 hücre arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($P>0,05$) anlaşılmıştır. *OCT3/4* ve *nestin* gen ifadelerine bakıldığında CD133⁺ hücrelerinde bu genlerin CD133⁻ ve SaOs-2 hücrelerine göre anlamlı olarak daha yüksek ifade edildiği

görülmüştür. *Nanog* gen ifdesi SaOs-2 hücrelerinde en fazla iken $CD133^-$ hücrelerinde oldukça az olduğu ve $CD133^+$ hücrelerinde ise $CD133^-$ hücreleri ile kıyaslandığında daha fazla olduğu görülmüştür. Fakat bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları belirlenmiştir ($P>0,05$) (Şekil 4.4).

Beklendiği üzere, $CD133^+$ hücrelerinde *CD133* ifadesinin $CD133^-$ hücrelere kıyasla daha yüksek olması *CD133* belirteci kullanılarak yapılan ayırımın başarılı olduğunu göstermektedir. Bu başarının diğer bir göstergesi $CD133^-$ hücreleri ile kıyaslandığında *Sox2*, *OCT3/4*, *Nanog* ve *Nestin* gibi köklük genlerinin $CD133^+$ hücrelerinde daha fazla ifade edilmesidir. Bu gen ifade profili MACS tekniği kullanılarak SaOs-2 hücre dizisinden ayrımlanan $CD133^+$ hücrelerinin hedeflediğimiz gibi osteosarkom kanser kök hücreleri olarak tanımlanabileceği sonucuna varmamızı sağlamıştır.



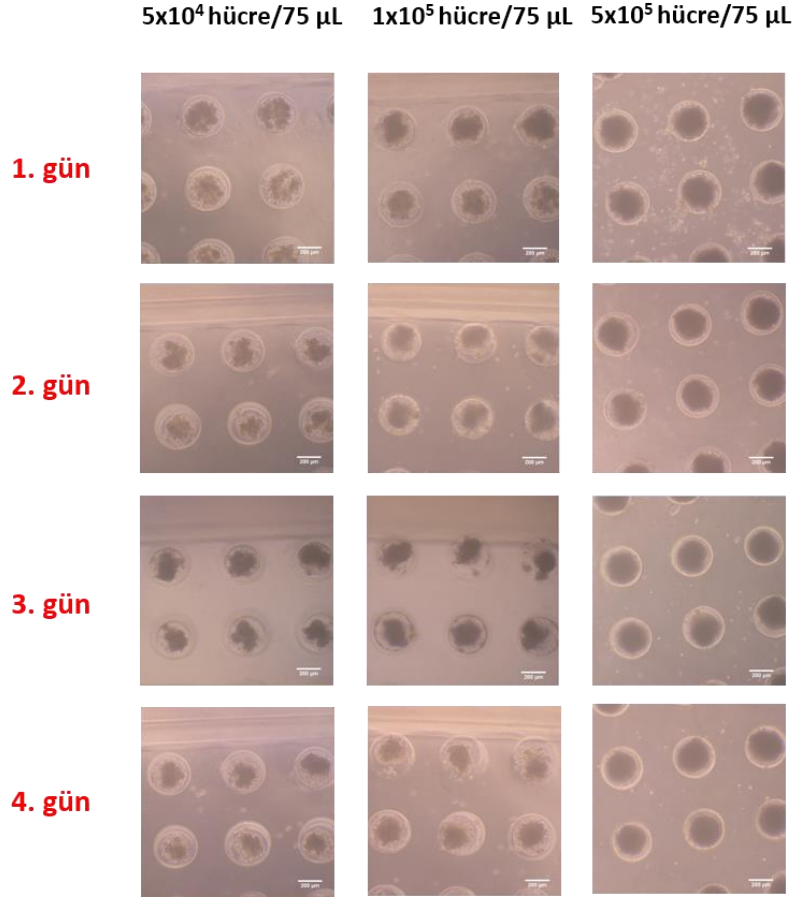
Şekil 4.4 MACS ayırımı sonunda elde edilen hücre gruplarının mRNA düzeyinde gen ifade seviyeleri (** $P<0,01$, * $P<0,05$)

4.4 CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 Hücrelerinin Mikro Doku Oluşturma Yetilerinin Belirlenmesi

5×10^4 hücre/75 μ L, 1×10^5 hücre/75 μ L ve 5×10^5 hücre/75 μ L olmak üzere üç farklı sayıda hücre miktarı kullanılarak CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücrelerinin mikro doku oluşturma kabiliyeti belirlenmeye çalışılmıştır.

4.4.1 CD133⁺ hücrelerinin mikro doku oluşturma yetisi

CD133⁺ hücreleri kullanılarak kurulan deney setinde tüm hücre sayılarında mikro dokuların oluştuğu ve bu sürecin kültürün 1. gününden itibaren başladığı ve 2. 3. ve 4. gün devam ettiği görülmüştür. Mikro dokuların oluşturulması için kullanılan 96 kuyucuklu agar jelin tüm kuyucuklarında mikro dokuların oluştuğu ve oluşan mikro dokuların morfolojik olarak birbirlerine benzedikleri gözlemlenmiştir. 5×10^4 hücre/75 μ L ve 1×10^5 hücre/75 μ L kullanarak oluşturulan mikro dokuların tam bir küre şeklini oluşturamadıkları, daha dağınık yapıda kaldıkları 5×10^5 hücre/75 μ L kullanılarak oluşturulan mikro dokuların ise tam bir küre oluşturdukları görülmüştür. Elde edilen diğer önemli bir sonuç da tüm deney gruplarında zamanla kuyucuk içindeki hücrelerin kendiliğinden bir araya gelmesi sonucu mikro dokuda kaynaşma meydana gelmesidir. Bu sonuç mikro dokuyu oluşturan hücreler arasında etkileşimin varlığını, dolayısıyla hücre canlılıklarının da devam ettiğini kanıtlamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 1

Şekil 4.5 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133⁺ hücre mikro dokuların 1. 2. 3. ve 4. günkü ışık mikroskobu görüntüleri. (Olimpus, CK-40-SL, Japonya) Ölçek çizgisi 200 µm

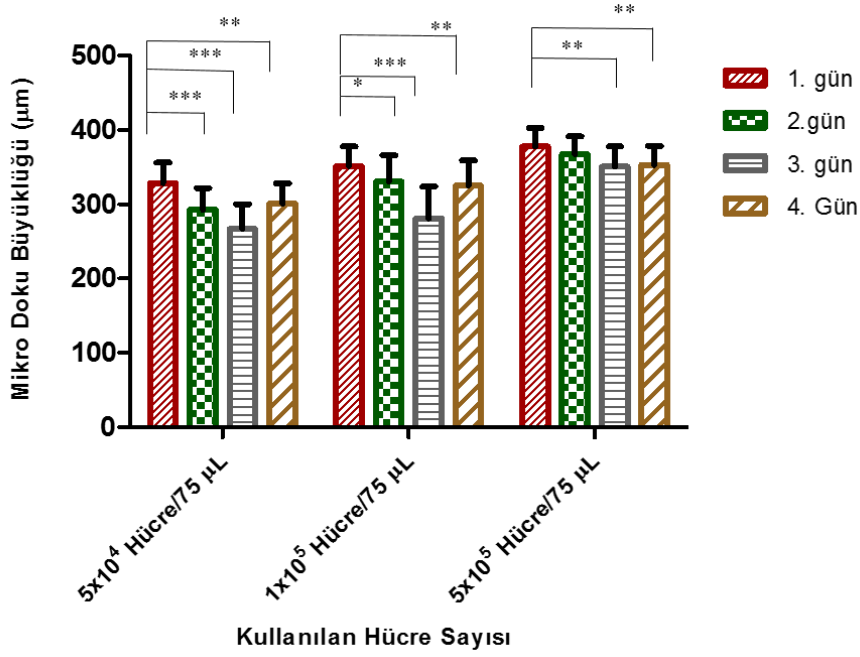
5×10^4 hücre/75 µL, 1×10^5 hücre/75 µL ve 5×10^5 hücre/75 µL kullanılarak oluşturulan mikro dokuların büyüklüğünde zamanla meydana gelen değişimin belirlenmesi için Image J ile yapılan analiz sonucu ($n = 30$) elde edilen veriler grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.6). Grafikten de anlaşılacağı üzere, tüm hücre gruplarında kültürün ilk üç gününde ölçüsel olarak bir azalış meydana gelmiştir. Üçüncü günden sonra 5×10^4 hücre/75 µL ve 1×10^5 hücre/75 µL hücre grupların büyüklüklerinde bir miktar artış olmuştur. Tablo

4.2’de tüm hücre gruplarına ait mikro doku ortalama çapı verilmiştir. Bu veriler beklendiği gibi hücre sayısı arttıkça mikro doku büyüklüğünün de arttığını kanıtlamıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 CD133⁺ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların ortalama çapı

Zaman (Gün)	Kullanılan Hücre Sayıları ve Ortalama Mikro Doku Çapı (μm)		
	5x10 ⁴	1x10 ⁵	5x10 ⁵
1	328±27	351±26	377±24
2	292±28	330±35	367±24
3	266±33	280±43	350±27
4	300±27	325±34	353±25

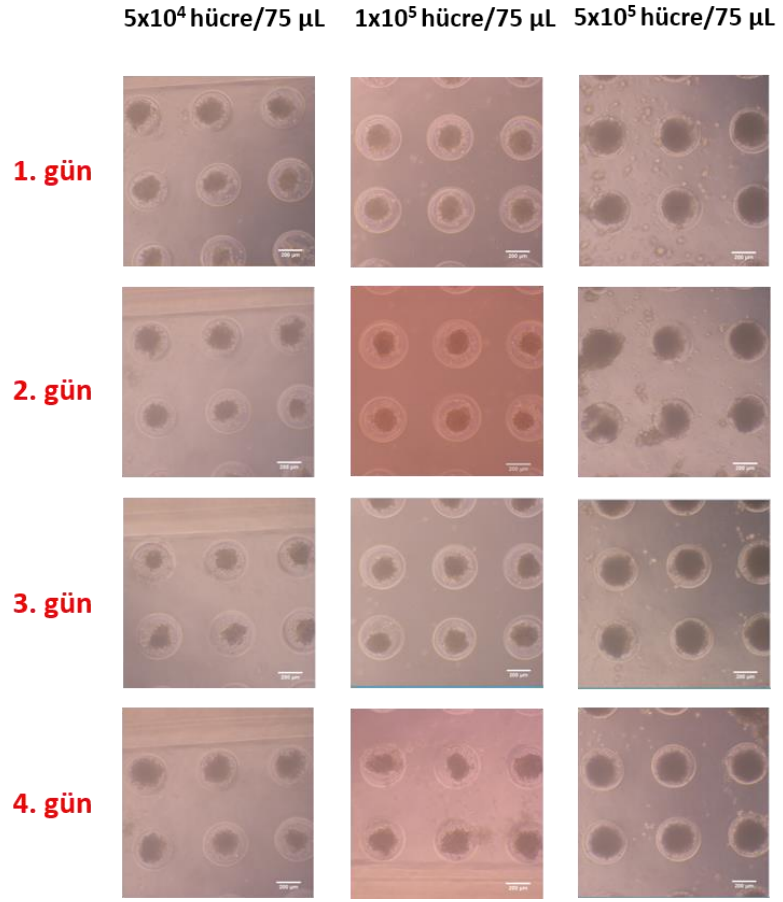
5x10⁴ ve 1x10⁵ hücre kullanılarak oluşturulan mikro dokuların boyutları 1. günle ile kıyaslandığında 2. 3. ve 4. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. 2. gün ölçülen mikro doku boyutu 1. güne, 3. gün ölçülen mikro doku boyutu ise 2. güne göre azalış göstermiş ve 4. günde ölçülen mikro doku boyutu 3. güne göre artış göstermiştir. 5x10⁵ hücre kullanılarak oluşturulan mikro dokuların boyutları 1. gün ile kıyaslandığında 2 günde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmazken 3. ve 4. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmektedir. Günlere göre mikro doku boyutunda meydana gelen boyut değişim profili 5x10⁴ ve 1x10⁵ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların profiline benzerlik göstermektedir (Şekil 4.6)



Şekil 4.6 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133⁺ hücre mikro dokularında meydana gelen ölçüsel değişimin süreye bağlı değişimi (*** P<0,001, ** P<0,01, *P<0,05)

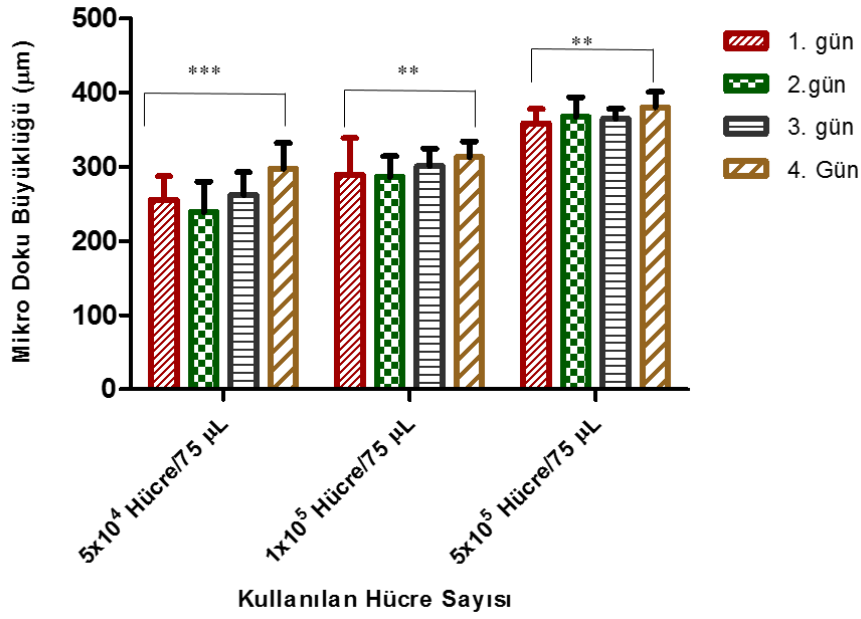
4.4.2 CD133⁻ hücrelerinin mikro doku oluşturma yetisi

CD133⁻ hücreleri kullanılarak kurulan deney setinde de CD133⁺ deney grubunda olduğu gibi tüm hücre sayılarında mikro dokuların oluştuğu ve bu sürecin kültürün 1. gününden itibaren başladığı ve 2. 3. ve 4. gün devam ettiği görülmüştür. Mikro dokuların oluşturulması için kullanılan 96 kuyucuklu agar jelin tüm kuyucuklarında mikro dokuların oluştuğu ve oluşan mikro dokuların morfolojik olarak bir birlerine benzedikleri gözlemlenmiştir. Aynı şekilde, 5x10⁴ hücre/75 µL ve 1x10⁵ hücre/75 µL kullanarak oluşturulan mikro dokuların tam bir küre şeklini oluşturamadıkları, 5x10⁵ hücre/75 µL kullanılarak oluşturulan mikro dokuların ise tam bir küre oluşturdukları görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133⁺ hücre mikro dokuların 1. 2. 3. ve 4. günkü ışık mikroskobu görüntüleri. (Olimpus, CK-40-SL, Japonya) Ölçek çizgisi 200 µm

Mikro doku büyüklüklerinin analizi sonucunda 5x10⁴ hücre/75 µL ve 1x10⁵ hücre/75 µL gruplarında kültürün ikinci gününden itibaren ölçüsel olarak artış meydana geldiği görülmüştür. Bu gruptaki tüm hücre konsantrasyonlarında dördüncü gündeki mikro dokular birinci günle kıyaslandıklarında daha büyüktür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan CD133⁺ hücre mikro dokularında meydana gelen ölçüsel değişimin süreye bağlı değişimi (** P<0,001, *** P<0,01)

Tablo 4.3’de tüm CD133⁺ hücre grupları kullanılarak oluşturulan mikro dokuların zaman parametresi göz önünde bulundurularak hesaplanan ortalama çapları verilmiştir. Bu grupta da hücre sayısının artması ile oluşan mikro doku çapının da arttığı sonucuna varılmıştır (Tablo 4.3). Ancak CD133⁺ grubunda olduğu gibi ilk üç günde çap azalması izlenmemektedir.

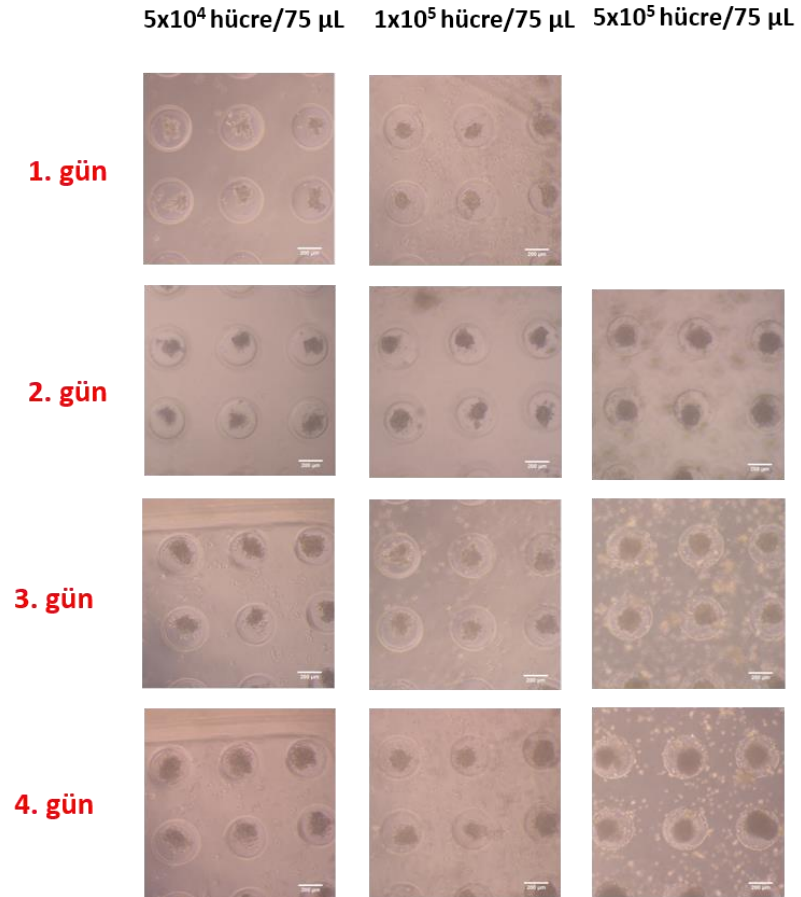
Tablo 4.3 CD133⁺ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların ortalama çapı.

Zaman (Gün)	Kullanılan Hücre Sayıları ve Ortalama Mikro Doku Çapı (µm)		
	5x 0 ⁴	1x10 ⁵	5x10 ⁵
1	255±31	289±49	358±19
2	239±40	287±27	367±26

3	262±30	301±23	364±13
4	297±34	313±21	380±20

4.4.3 SaOs-2 hücrelerinin mikro doku oluşturma yetisi

SaOs-2 hücreleri kullanılarak kurulan deney setinde de diğer iki grupta olduğu gibi tüm hücre sayılarında mikro dokuların oluştuğu ve bu sürecin kültürün 1. gününden itibaren başladığı, 5×10^4 hücre/75 μ L ve 1×10^5 hücre/75



Şekil 4.9 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan SaOs-2 hücre mikro dokuların 1. 2. 3. ve 4. günkü ışık mikroskobu görüntüleri. (Olimpus, CK-40-SL, Japonya) Ölçek çizgisi 200 μ m

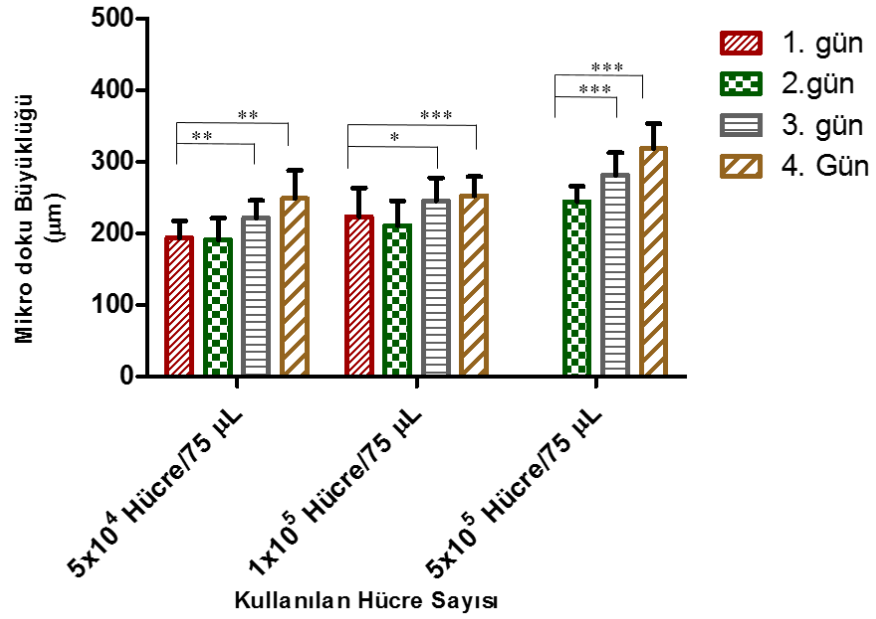
μL kullanarak oluşturulan mikro dokuların tam bir küre şeklini oluşturamadıkları görülmüştür. CD133^+ grubunda görülen kaynaşmaya bağlı zamanla çap azalması bu grupta gözlenmemiştir (Şekil 4.9).

Mikro dokuların zamanla büyüklüklerinde meydana gelen değişimin belirlenmesi için Image J ile yapılan analiz sonucu ($n = 30$) tüm hücre konsantrasyonlarında kültürün ikinci gününden itibaren çap artışı meydana gelmiştir (Şekil 4.10).

Tablo 4.4’de tüm SaOs-2 hücre grupları kullanılarak oluşturulan mikro dokuların zaman parametresi göz önünde bulundurularak hesaplanan ortalama çapları verilmiştir. Beklendiği gibi başlangıçta ekilen hücre sayısına paralel olarak mikro doku çapları da büyümüştür (Tablo 4.4).

Tablo 4.4 SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların ortalama çapı.

Zaman (Gün)	Kullanılan Hücre Sayıları ve Ortalama Mikro Doku Çapı (μm)		
	5×10^4	1×10^5	5×10^5
1	194 $\pm$ 23	223 $\pm$ 40	-
2	191 $\pm$ 30	210 $\pm$ 34	244 $\pm$ 21
3	221 $\pm$ 24	245 $\pm$ 32	281 $\pm$ 31
4	248 $\pm$ 39	252 $\pm$ 26	318 $\pm$ 35



Şekil 4.10 Çeşitli hücre konsantrasyonları ile oluşturulan SaOs-2 hücre mikro dokularında meydana gelen ölçüsel değişimin süreye bağlı değişimi (*** P<0,001, ** P<0,01, *P<0,05)

4.5 CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 Mikro Dokularının Gen ve Protein İfadelerinin Karakterizasyonu

Mikro doku oluşturma yetileri ve mikro dokudaki mikro çevresi belirlenen CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 mikro dokularının gen ifade karakterizasyonlarının yapılması amacıyla tasarlanan çalışmada 1x10⁵ hücre/75 µL hücre kullanılarak 400 µm çaplı kuyucukları olan agar jellerde mikro dokular oluşturulmuştur. İmmünohistokimyasal boyama ile mikro dokularda *CD133*, *OCT3/4*, *Sox2* ve *Ki-67* ifadeleri, RT-PZR ile mikro dokularda *CD133*, *OCT3/4*, *Sox2*, *nanog* ve *nestin* ifadeleri incelenmiştir. Hücrelerin 3B kültürde gösterdiği gen ve protein ifadeleri 2B kültür koşullarındaki ifadeleri karşılaştırılmıştır.

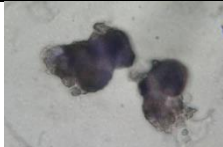
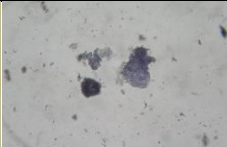
4.5.1 Mikro dokuların immünohistokimya boyama analizi sonuçları

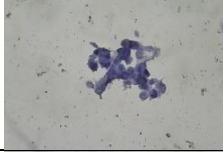
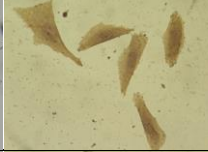
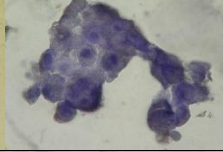
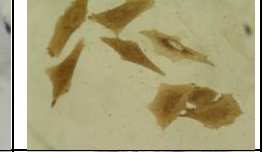
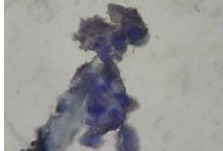
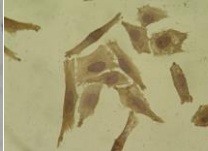
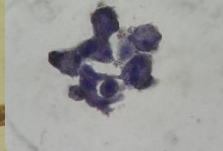
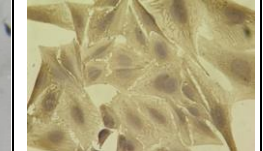
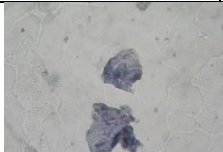
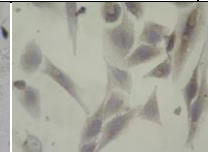
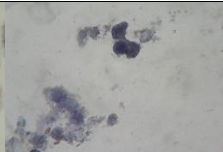
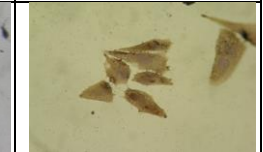
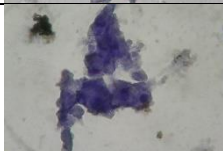
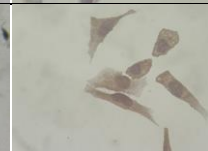
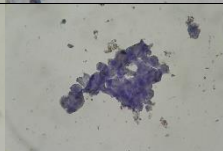
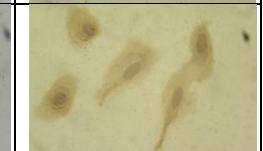
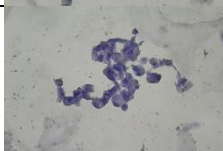
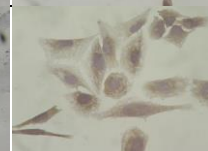
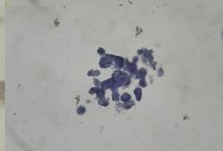
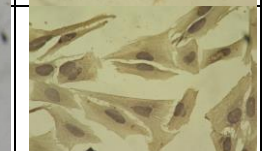
CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokuların karakterizasyonlarının yapılması amacıyla *CD133*, *OCT3/4*, *Sox2* ve *Ki-67* dağılımlarına immünohistokimyasal olarak bakılmıştır. Karşılaştırmalı olarak standart 2B kültür koşullarında kültüre edilen hücreler kullanılmıştır. Yapılan immünohistokimya analizi sonuçları Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Yapılan gözlemler CD133⁺ hücrelerinde 3B kültür sisteminde *CD133*, *OCT3/4* ve *Ki-67* ifadelerinin düşük seviyede var olduğunu, 2B kültürde çoğaltılan hücrelerde ise *CD133* ve *OCT3/4* ifadesinin daha düşük seviyede olduğunu *Ki-67* ifadesinin ise 3B grubuna oranla daha fazla olduğu görülmüştür. *Sox2* bakımından incelendiğinde ise CD133⁺ hücreleri mikro dokularında ekspresyonun olmadığı 2B kültürü yapılan hücrelerin ise ekspresyonunun çok düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir.

CD133⁻ hücreleri 3B kültür sisteminde *CD133* ve *Sox2* ifadesi negatif iken, *OCT3/4* ve *Ki-67* belirteç ekspresyonlarını düşük seviyede yer yer gösterdiği izlenmiştir. 2B kültür sisteminde *CD133*, *OCT3/4*, *Ki-67* ve *Sox2* ifadelerinin hepsinin olduğu fakat *OCT3/4* ifadesinin diğer belirteçlere nazaran daha fazla olduğu saptanmıştır.

SaOs-2 mikro dokularının 3B kültür sisteminde *CD133* ve *Sox2* ifadesi negatif iken, *OCT3/4* ve *Ki-67* ifadelerinin yer yer pozitif olduğu görülmüştür. 2B kültür sisteminde ise *CD133*, *OCT3/4*, *Sox2* ve *Ki-67* belirteç ekspresyonlarının hepsi düşük seviyede ifade edilmektedir.

Tablo 4.5 2B ve 3B kültür sisteminde kültüre edilen hücrelerin immünreaktivite sonuçları

Gruplar	CD133		OCT3/4	
	3B	2B	3B	2B
CD133 ⁺				

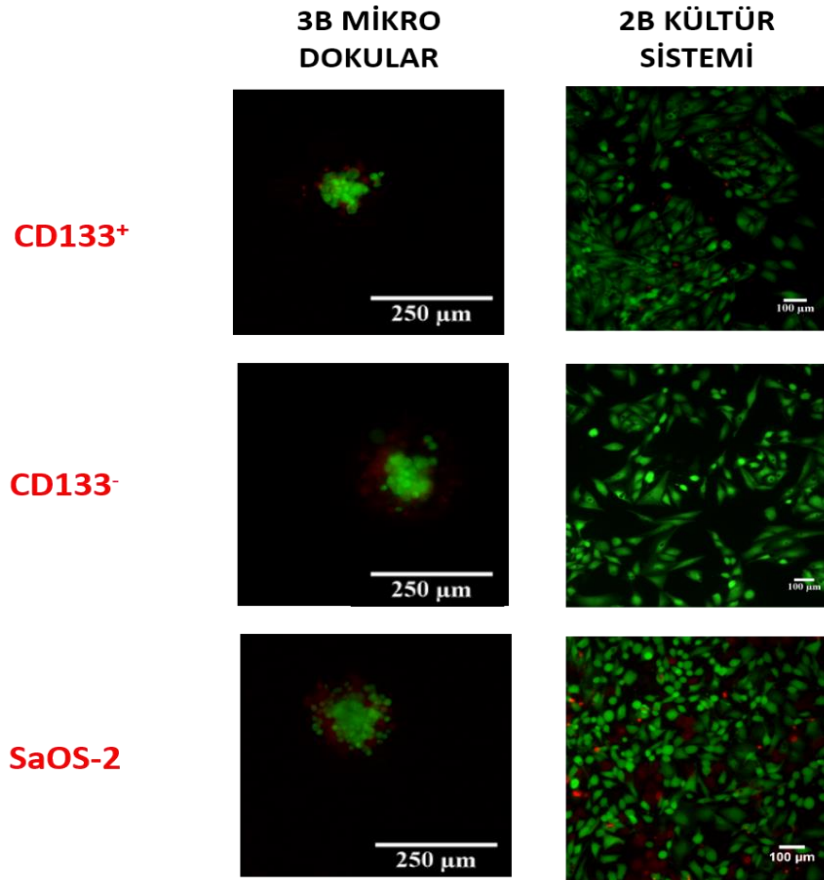
CD133 ⁻				
SaOs-2				
Gruplar	Sox2		Ki-67	
	3B	2B	3B	2B
CD133 ⁺				
CD133 ⁻				
SaOs-2				

4.5.2 Mikro dokuların canlı&ölü analiz sonuçları

CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak 3B mikro dokular ve 2B kültür sistemlerindeki canlı hücreler *calcein AM* ile yeşile ve ölü hücreler *etidiumhomodimer-1* ile kırmızıya boyanarak belirlenmiştir.

Floresan mikroskopta yapılan mikroskobik gözlemler sonucunda 2B kültür sisteminde CD133⁺ ve CD133⁻ hücrelerinde ölü hücre tespit edilmemiş, SaOs-2 grubunda çok az miktarda ölü hücre olduğu tespit edilmiştir. 2B sistemlerde ölü hücreler besi ortamı değişimi sırasında ortamdan uzaklaştırıldıkları için, kullanılan canlı&ölü hücre analizi tekniği ile 2B sistemlerde bu sonucun alınması normaldir. 3B mikro dokularda canlı hücreler hücre-hücre etkileşimleri nedeniyle çoğunlukla merkezde konumlanırken ölü hücreler çeperde toplanmıştır. Ölü hücrelerin mikro

dokunun çevresinde bulunmasının sebebi olarak canlı hücrelerin sahip oldukları adesif ve kohesif kuvvetleri oluşturacak hücresel bileşenleri bulundurmamaları olduğu düşünülmüştür. Mikro dokuları oluşturan hücrelerin canlılıklarını korudukları ve kendiliğinden bir araya gelme yetisinde oldukları ve canlılık fonksiyonlarını sürdürdükleri sonucuna varılmıştır (Şekil 4.11). Kullanılan tekniğin özelliği sebebiyle 2B ve 3B kültür sistemlerinin ölü hücre içeriği bakımından kıyaslanması doğru değildir.



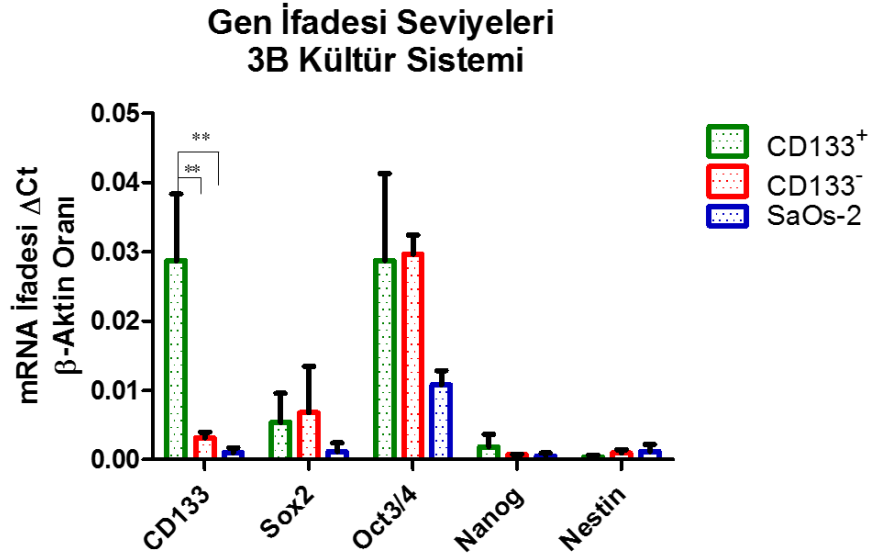
Şekil 4.11 CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan 3B mikro dokularda ve 2B kültür sisteminde kültüre edilen hücrelerin canlı&ölü analizi. (Leica, Almanya) Ölçek çizgileri; 250 µm, 100 µm

4.5.3 Mikro dokuların RT-PZR analiz sonuçları

Mikro dokulardaki *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* gen ifade seviyeleri incelendiğinde, tüm hücre gruplarında 4 günlük kültür süresi

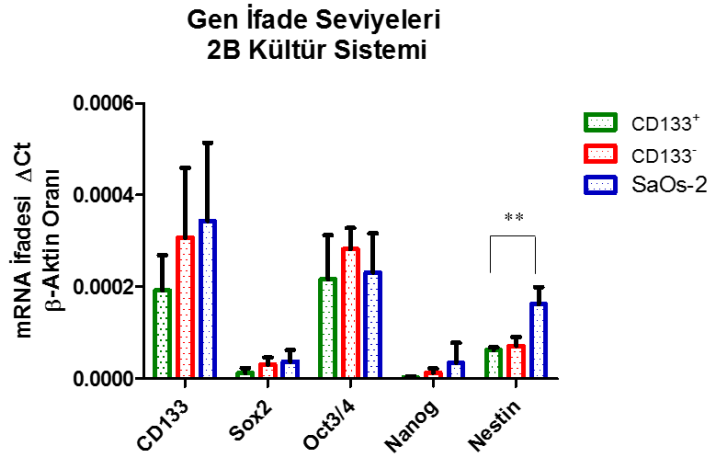
sonunda β -aktin genine göre normalize edilen değerler grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.13).

CD133 geninin $CD133^+$ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokularda $CD133^-$ ve SaOs-2 mikro dokularına göre daha yüksek ifade edildiği görülmüştür. Bu farkın ortalama değerler ($n=3$) göz önünde bulundurulduğunda $CD133^-$ hücrelerine göre 9,66 kat, SaOs-2 hücrelerine göre 2,9 kat ve bu farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. *Nanog* ifade seviyeleri de $CD133^+$ hücrelerinden oluşturulan mikro dokularda diğer iki hücre tipine göre daha yüksektir. Fakat *Sox2* ve *OCT3/4* ve gen ifadelerinde, $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücrelerinde benzer değerlerde ve SaOs-2 hücrelerinden yüksek seviyede gen ifadesi görülmektedir. *Nestin* ifadesinde ise hücre grupları arasında bir fark görülmemektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 $CD133^+$, $CD133^-$ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak oluşturulan 3B mikro dokularda gen ifade seviyeleri.

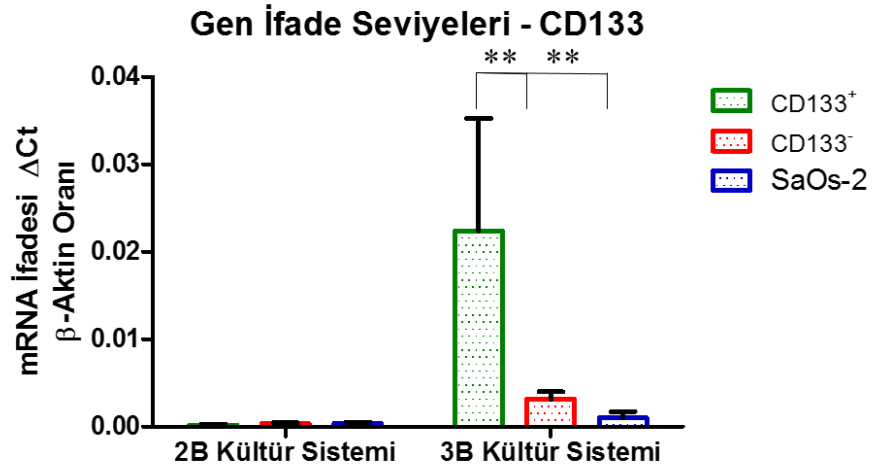
CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri standart 2B hücre kültürü sisteminde kültüre alındıklarında hücrelerin gen ifade seviyeleri Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Grafik okunduğunda *CD133* ekspresyon seviyesinin beklenin aksine SaOs-2 hücrelerinde en yüksek, CD133⁺ hücrelerinde ise en düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* gen ekspresyonlarının da CD133⁺ hücrelerinde en düşük olduğu anlaşılmaktadır. *Sox2*, *nanog* ve *nestin* gen ekspresyon seviyeleri en yüksek SaOs-2 hücrelerinde görülürken *OCT3/4* gen ekspresyonu en yüksek CD133⁻ hücrelerinde görülmektedir. Fakat bu farkların istatistiksel olarak sadece *nestin* gen ifadesinde anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$) (Şekil 4. 15).



Şekil 4.13 CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücrelerinin 2B hücre kültürü sisteminde kültüre edildiklerinde elde edilen gen ifade seviyeleri

CD133 gen ekspresyon seviyesinin 3B ve 2B kültür sistemleri için kıyaslanması Şekil 4.14'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde 2B hücre kültürü sistemine göre 3B kültür sisteminde *CD133* ekspresyonunun belirgin bir biçimde yüksek olduğu görülmektedir. Ortalama ekspresyon değerleri ($n=3$) dikkate alındığında CD133⁺ hücrelerinde 3B kültür sistemi ile 2B kültür sistemi arasında 112 kat fark olduğu belirlenmiştir. Aynı fark CD133⁻

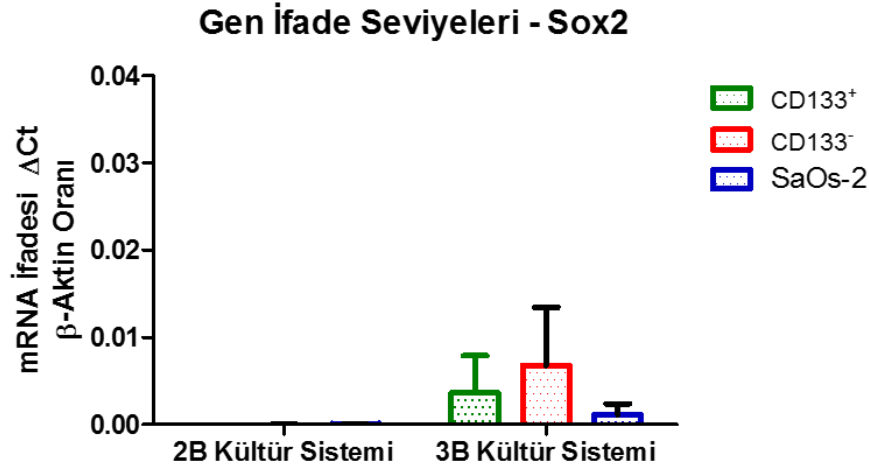
hücreleri için 10 kat ve SaOs-2 için 3,33 kat olarak hesaplanmıştır. Ayrıca istatistiksel analiz sonucunda 3B hücre kültürü sisteminde yapılan $CD133^+$ hücreleri ile $CD133^-$ ve SaOs-2 hücreleri arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenirken 2B kültür sisteminde bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar kanser kök hücrelerinin ($CD133^+$) karakterlerinin korunması ve devam ettirmesi için 3B mikro doku tekniğinin başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir (Şekil 4.14)



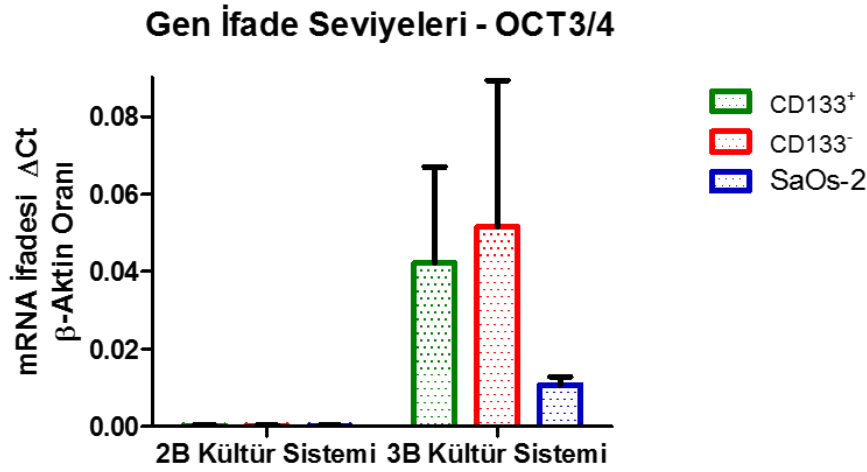
Şekil 4.14 *CD133* gen ifadesi bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması

Şekil 4.15’de *Sox2* gen ekspresyonu bakımından 2B ve 3B hücre kültür yöntemleri kıyaslanmıştır. Yapılan kıyaslanma sonucunda *Sox2* gen ifadesi bakımından da, yani hücrelerin köklüklerini koruma ve devam ettirmesinde 3B mikro doku tekniğinin başarılı olduğu belirlenmiştir. $CD133^+$ hücrelerinin *Sox2* ifadesinde 3B kültür sistemi ile 2B kültür sistemi arasında 361 kat fark olduğu belirlenmiştir. Aynı fark $CD133^-$ hücreleri için 226 kat ve SaOs-2 için 29 kat olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.15).

OCT3/4 gen ifade profili bakımından oluşan tablo *Sox2* gen ekspresyonuna benzerlik göstermektedir (Şekil 4. 16). $CD133^+$ hücrelerinde 3B kültür sistemi ile 2B kültür sistemi arasında 210 kat, $CD133^-$ hücreleri için 172 kat ve SaOs-2 için 54 kat fark hesaplanmıştır (Şekil 4.16).

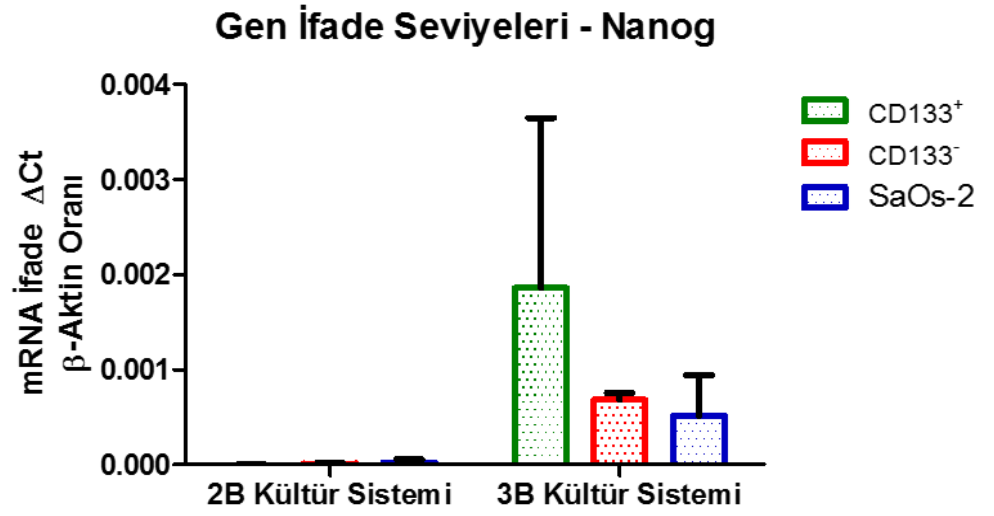


Şekil 4.15 *Sox2* gen ekspresyonu bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması

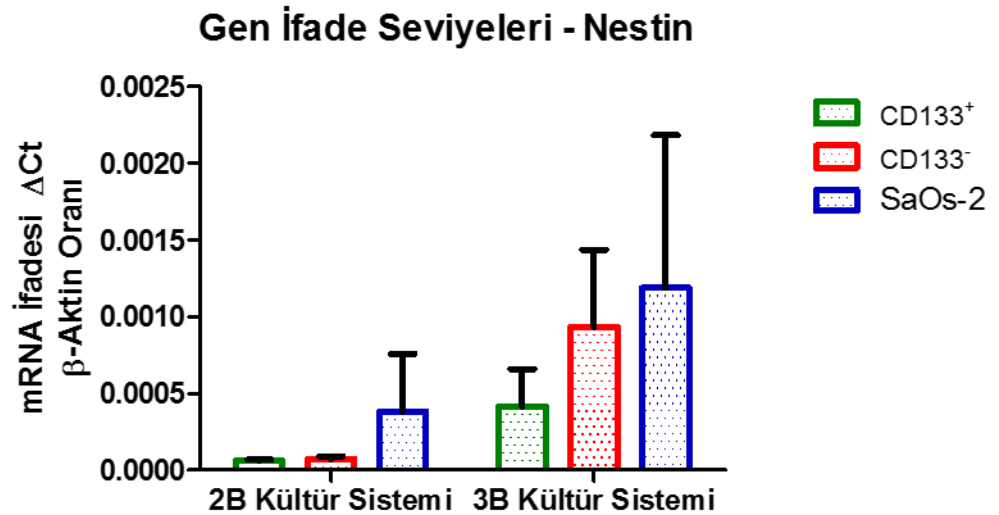


Şekil 4.16 *OCT3/4* gen ifadesi bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması.

Nanog (Şekil 4.17) ve *nestin* (Şekil 4.18) gen ekspresyonları bakımından 2B ve 3B kültür sistemleri kıyaslandığında *Nanog* için CD133⁺ hücrelerinde 3B kültür sistemi ile 2B kültür sistemi arasında 620 kat, CD133⁻ hücreleri için 76 kat ve SaOs-2 için 25 kat fark hesaplanmıştır. *Nestin* için de CD133⁺ hücrelerinde 7 kat, CD133⁻ hücreleri için 13 kat ve SaOs-2 için 3 kat fark görülmektedir.



Şekil 4.17 *Nanog* gen ifadesi bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması.



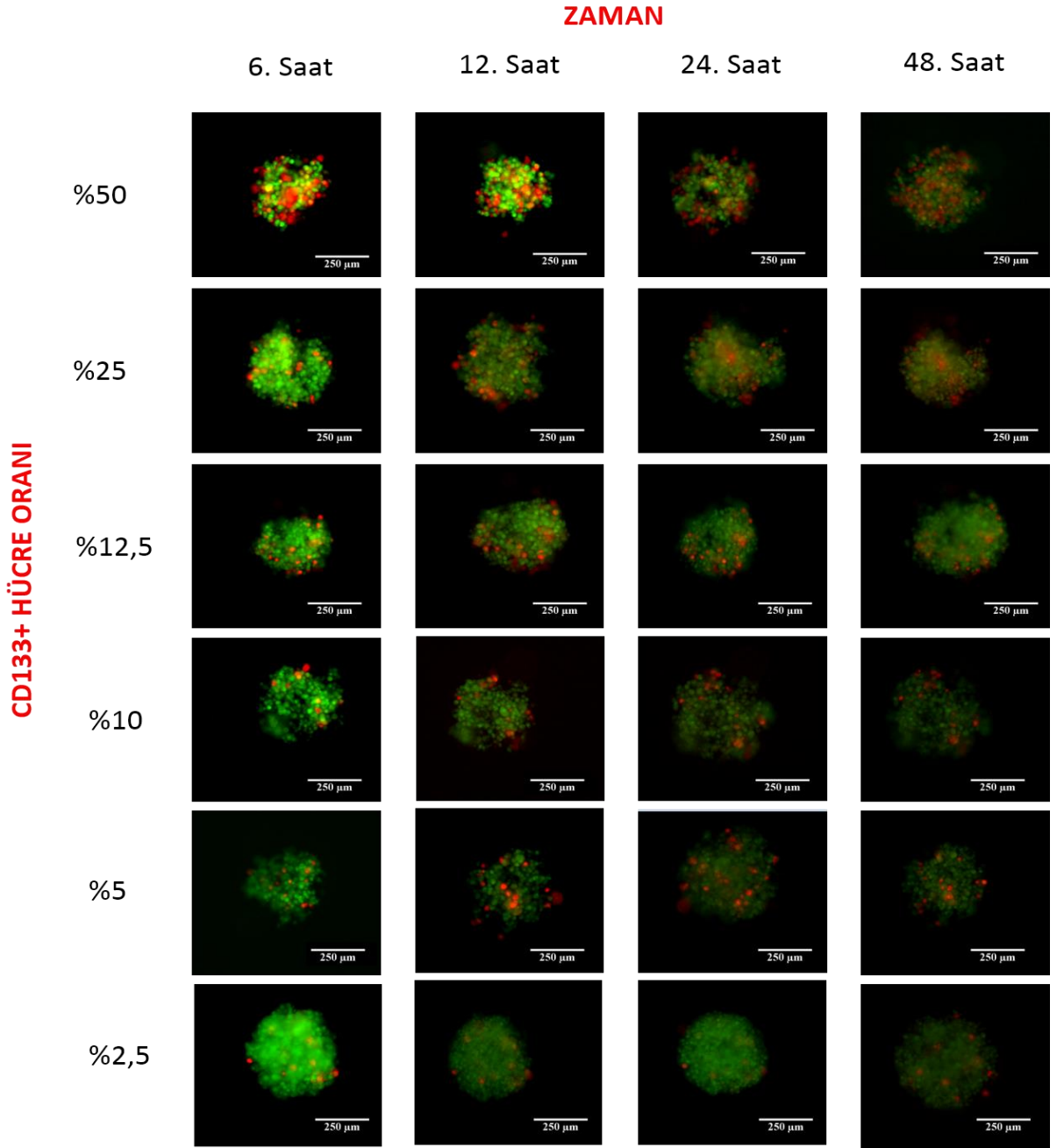
Şekil 4.18 *Nestin* gen ifadesi bakımından 2B ve 3B kültür sistemlerinin karşılaştırılması

4.6 CD133⁺ ve CD133⁻ Hücrelerinin Mikro Dokudaki Lokalizasyon Örüntüsünün İncelenmesi

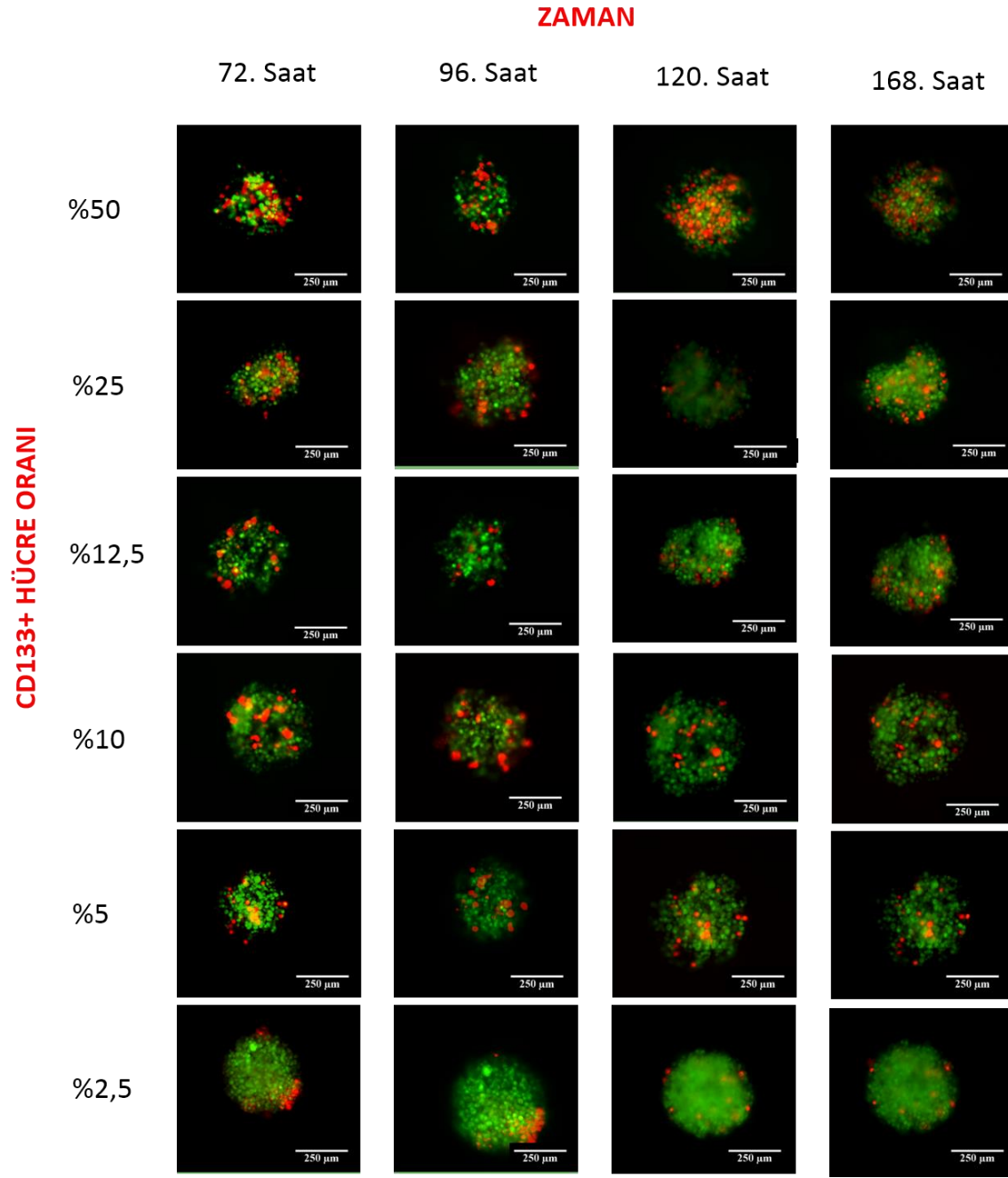
4.6.1 3B mikro doku sisteminde floresan görüntüleme yöntemi ile CD133⁺ hücre yerleşiminin belirlenmesi

Bir önceki çalışmada CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücrelerinin 3B *in vivo* tümör benzeri mikro doku oluşturup oluşturmadıkları incelenmiş ve yapılan çalışmada üç hücre grubunun da mikro doku oluşturma yeteneğine sahip olduğu anlaşılmıştır. Bir sonraki aşamada oluşan 3B mikro doku yapısında CD133⁺ hücre lokalizasyon örüntüsünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı oranlarda kırmızı CellTracker ile boyanan CD133⁺ ve yeşil CellTracker ile boyanan CD133⁻ hücreleri agar jellerde beraber kültüre edilmiştir.

Floresan mikroskopta yapılan gözlem sonucunda 168. saate kadar yapılan tüm gözlemlerde kullanılan bütün hücre oranları için hücre yerleşim örüntüsünün spesifik bir yapı göstermediği, hücrelerin düzensiz bir dağılım sergilediği görülmüştür (Şekil 4.19).



Şekil 4.19a 3B mikro dokularda CD133⁺ hücre yerleşim örüntüsünün kullanılan hücre miktarı ve zamanla değişimi. (Leica, Almanya) Ölçek çizgisi 250 µm Ölçek çizgisi 250 µm



Şekil 4.19b 3B mikro dokularda CD133⁺ hücre yerleşim örüntüsünün kullanılan hücre miktarı ve zamanla değişimi. (Leica, Almanya) Ölçek çizgisi 250 µm

4.6.2 Mikro dokularda hücre lokalizasyon örüntüsünün IHK boyama ile belirlenmesi

3B mikro dokuda $CD133^+$ hücre lokalizasyon örüntüsünün araştırılması amacıyla floresan mikroskop gözlem çalışmasına ek olarak %50, %25, %12,5, %10, %5 ve %2,5 $CD133^+$ oranları kullanılarak oluşturulan mikro dokularda *CD133*, *OCT3/4* ve *Ki-67* dağılımlarına bakılmıştır. Yapılan çalışmada 7 gün sonunda mikro dokular fikse edilerek antikor boyamaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.6’de gösterilmiştir.

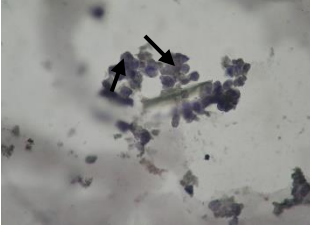
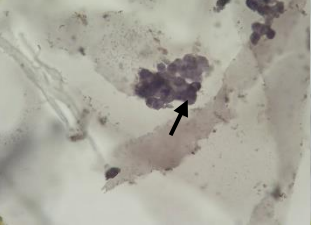
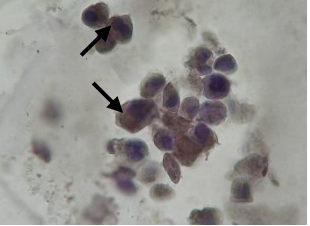
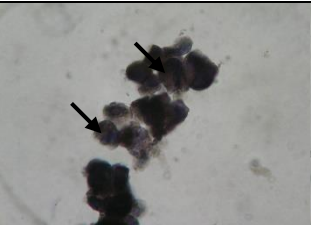
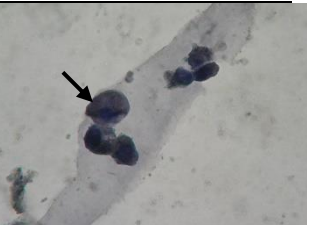
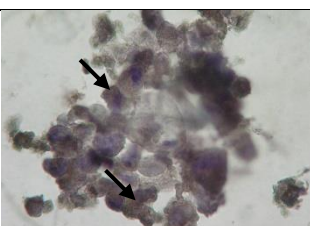
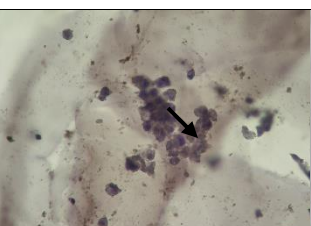
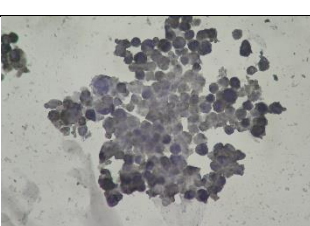
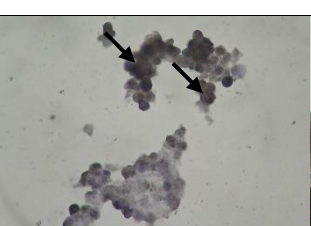
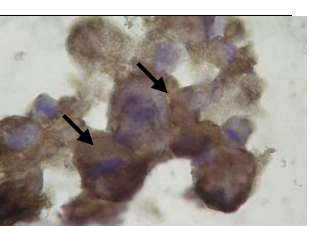
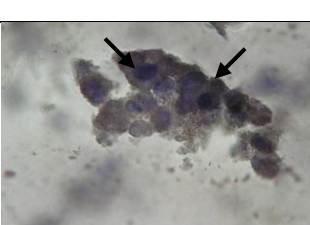
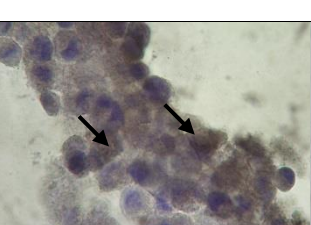
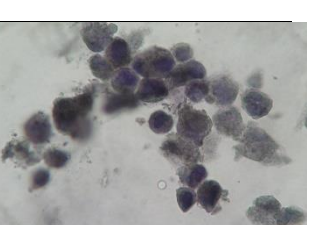
İmmünohistokimya sonucunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde tüm deney gruplarında hücre çoğalmasının göstergesi olan *Ki-67* immunoreaktivitesinin $CD133^+$ %5 lik örnek dışında diğer tüm gruplarda olduğu görülmüştür. Bununla beraber *Ki-67* pozitif hücrelerin mikro dokuda belirgin bir yerleşim göstermedikleri saptanmıştır (Tablo 4.6).

Deney grupları *CD133* immunoreaktivite dağılımı bakımından incelendiğinde %10 $CD133^+$ olan grupta negatif olduğu diğer gruplarda farklı şiddetlerde pozitif olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte *CD133* immunoreaktivitesinin %2,5 ve %50 $CD133^+$ gruplarda şiddetinin %5, %12,5, %25 $CD133^+$ olan gruplara nazaran daha az olduğu izlenmiştir. *CD133* immunoreaktivitesi negatif olan hücrelerin olması özellikle kültür işleminde $CD133^-$ hücreleri ile birlikte kültüre edildiği göz önünde bulundurulduğunda beklenen bir sonuçtur. Hücre yerleşimi bakımından incelendiğinde *CD133* pozitif hücrelerin özel bir örüntü göstermediği, rastgele yer edindikleri saptanmıştır (Tablo 4.5).

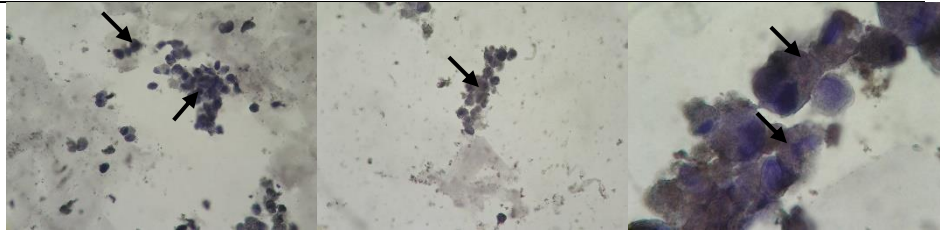
Bilindiği üzere *OCT3/4* belirteci kök hücre belirteci olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada elde edilen mikro dokularda 7 gün sonunda *OCT3/4* immunoreativitesinin tüm gruplarda pozitif olduğu görülmüştür. Bununla birlikte %25 lik grup dışındaki örneklerde *OCT3/4* immunoreaktivitesinin yer yer bazı hücrelerde negatif olduğu gözlenir iken, özellikle %25 lik grupta hemen hemen tüm hücrelerde pozitif olduğu ve

immunoreaktivite şiddetinin diğer gruplara nazaran daha fazla olduğu saptanmıştır. (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 İmmünreaktivite analizine göre farklı CD133⁺ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokulardaki hücre yerleşimi

Gruplar	CD133	OCT4	Ki-67
%50 CD133 ⁺			
%25 CD133 ⁺			
%12.5 CD133 ⁺			
%10 CD133 ⁺			
%5 CD133 ⁺			

%2,5
CD133
+



5. TARTIŞMA

Kanser kök hücre teorisi son zamanlarda kanserlerin kendini tekrarlamak, kimyasal ve ışın tedavilerine yanıt vermeme nedenlerini açıklama noktasında önem kazanmıştır. Literatürde son dönemde yapılan çalışmalar ile KKH temelli yeni modeller öne sürülmüş ve meme, kolon, prostat, kemik, beyin ve pankreas gibi birçok kanser türünde KKH varlığı gösterilmiştir (Singh et al., 2003; Barker et al., 2007; Di Fiore et al., 2009; Gibbs et al., 2005). KKH'lerin tümör oluşum sürecinde başlatıcı rol üstlendikleri, tümördeki hücre alt popülasyonlarının oluşumu ile heterojen bir hücre havuzunun oluşumuna neden oldukları bilinmektedir (O'Connor et al., 2014).

Tümör spesifik KKH izolasyonu sıklıkla doku spesifik belirteç ekspresyonları dikkate alınarak yapılmaktadır. KKH'lerin saflaştırılması için sıklıkla kullanılan belirteçler arasında *CD133*, *CD24*, *CD44*, *CD29*, *CD90*, epitel spesifik antijen (ESA) ve aldehit dehidrojenez (ALDH) gibi hücre yüzey belirteçleri bulunmaktadır (Z. Yu et al., 2012). Fakat izolasyon için kullanılan belirteçlerin çoğunun normal kök hücrelerde de ifade edildiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra belirteç spesifitesi kanser türüne, tümördeki hücre alt popülasyonuna ve tümörün alındığı hastaya göre değişiklik göstermektedir (Hermann, et al., 2010). Dolayısı ile kanser kök hücre izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan belirteçlerin tümör spesifik oldukları yapılacak çalışmalarla desteklenmelidir.

Osteosarkoma çok sık görülmesine de en çok çocuk ve ergen dönemdeki bireyleri etkileyen kemik tümörleridir ve çocuk yaşta teşhis edilen osteosarkomların %30'u ölümle sonuçlanmaktadır (van Driel and van Leeuwen, 2014) ve bu yüksek ölüm oranının ana nedeninin bu tümörün yüksek kemodirenci ve metastaz yeteneği olduğu düşünülmektedir (M. Xu et al., 2014). Bu da osteosarkom tedavilerinde KKH hedeflemesinin önemini açıkça ortaya koymaktadır. Osteosarkomada KKH özelliği gösterdiği belirlenen hücre alt popülasyon varlığı bildirilmiştir (Di Fiore et al., 2009;

Tirino et al., 2011; Tirino et al., 2008; Kelly et al., 2010). Yapılan çalışmalarda dünya çapında ulaşma kolaylığı, iyi karakterize edilmeleri ve kısa sürede çok miktarda elde edilebilmeleri sebebiyle sıklıkla tercih edilen hücre tipi SaOs-2'dir (Hausser and Brenner, 2005). SaOs-2 osteoblastik hücre morfolojisine sahip bir hücre hattıdır (Rodan et al., 1987). Yapılan tez çalışmasında ters faz kontrast ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik gözlemler, kullanılan SaOs-2 hücrelerinin morfolojik yapısının osteoblastik olduğunu göstermiş ve bu noktada literatür verileriyle paralellik gösterdiği anlaşılmıştır. Rodan ve ark. yaptıkları çalışmada %10 FBS içeriğine sahip büyüme ortamında SaOs-2 hücrelerinin 7 gün boyunca logaritmik fazda büyüdüklerini göstermişlerdir (Rodan et al., 1987). Bu tez kapsamında yapılan denemelerde SaOs-2 hücreleri, %2,5 FBS içeriğine sahip büyüme ortamında kültüre edilerek büyüme grafikleri çıkarılmış ve hücrelerin 12 gün sonunda durağan faza geçtiği anlaşılmıştır. Hücrelerin durağan faza geçme süresinin literatür verileri ile kıyaslandığında daha fazla olmasının sebebi kullanılan büyüme ortamının FBS içeriğinin daha az oluşu olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği üzere FBS hücrelerin çoğalması ve canlılıklarını devam ettirmesi için gerekli büyüme faktörleri, aminoasitler ve hormon gibi önemli bileşenleri içinde barındırmaktadır (Gstraunthaler, 2003). FBS içeriğinin azaltılmasının hücre çoğalmasında yavaşlamaya neden olabileceği, dolayısı ile daha uzun logaritmik fazda kaldıkları düşünülmektedir. Hausser ve ark. SaOs-2 hücrelerinin geç pasajlarda genellikle yüksek çoğalma hızlarına sahip olduklarını belirtmişlerdir (Hausser and Brenner, 2005). Çalışma süresince 16-18 pasaj aralığındaki SaOs-2 hücreleri kullanılmış ve yapılan gözlemler ile hücrelerin yavaş çoğaldığı anlaşılmıştır. Hücrelerin yavaş çoğalmasının sebebi olarak erken pasajların kullanılması olduğu düşünülmüştür.

SaOs-2 hücrelerinden KKH özelliği gösterdiği belirlenen ve CD133 hücre yüzey belirtecini ifade eden hücrelerin ayrılmanması için MACS tekniği kullanılmıştır. Çalışma süresince 3 farklı ayırım gerçekleştirilmiş ve ayırımlarda MidiMACS seperatörü kullanılmıştır. Ayırım sonunda elde edilen

CD133⁺ hücre sayıları dikkate alınarak ayırımın verimi hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.1). Yapılan hesaplamalar sonucu ayırım verimi ve dolayısı ile SaOs-2 hücrelerinin CD133⁺ hücre içeriği %0,84 - 3,3 aralığında bulunmuştur. Anıl, 2014 yaptığı tez çalışmasında SaOs-2 hücre hattından CD133⁺ hücrelerinin ayrılması için MACS tekniği kullanmış ve SaOs-2 hücrelerinin %0,3 – 4,4 aralığında CD133⁺ ihtiva ettiğini göstermiştir (Anıl 2014). Ayrıca Tirino ve ark. FACS tekniğini kullanarak bu oranı %3 - 5 (Tirino et al., 2008) ve Kelly ve ark. %10,86 ± 6,8 (Kelly et al., 2010) olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada da %0,84 - 3,3 arasında bulunan SaOs-2 hücrelerindeki KKH verimi literatürle benzer düzeylerde . MidiMACS ayırım için kullanılan başlangıç hücre miktarının 10⁸ civarında olması sonucu kolonda hücre kümelerinin oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, kolonda %92,4 - %78,6 aralığında hücrenin kalmış olmasının da bu durumu açıklayabileceği düşünülmektedir (Bkz. 4.1). Son olarak hücrelerin pasajlanmasının hücre yüzey belirteç ekspresyonlarını etkileyebileceği ifade edilmiştir (Basu-Roy et al., 2013). Dolayısı ile ayırım için ihtiyaç duyulan hücre miktarına ulaşmak için hücrelere 4 defa pasajlama işlemi uygulanmış ve bu pasajlanma işlemlerinin hücrelerdeki CD133 belirteçlerinin ifade edilmesini etkileyebileceği, bunun da ayırım verimine yansıdığı düşünülmektedir.

Al Hajj ve ark. meme kanseri kök hücreleri ile ilgili yayınladıkları çalışmalarında KKH hücre morfolojisinin tümörojenik olmayan hücre morfolojisi ile benzerlik gösterdiğini ifade etmişlerdir (Al-Hajj et al., 2003). Bu bulgu yapılan çalışmada elde edilen bulgu ile örtüşmektedir. SaOs-2 hücrelerinden MACS ile ayırımı yapılan CD133⁺ ve CD133⁻ hücrelerinin morfolojik gözlemleri ters faz kontrast ışık mikroskobu ile yapılmış ve her iki hücre grubunun osteoblastik hücre morfolojisine sahip olduğu görülmüştür (Bkz. 4.3).

Yapılan çeşitli çalışmalar osteosarkoma hücre dizisinden CD133 belirteci kullanılarak izole edilen hücrelerin OCT3/4 ve *nanog* gibi embriyonik kök hücre belirteçlerini ifade ettiklerini göstermiştir (Gibbs et al.,

2005). Bu çalışmada MACS tekniği ile SaOs-2 hücrelerinden ayırım sonucu elde edilen $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücrelerinin mRNA düzeyinde *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* ifadelerinin araştırılması için RT-PZR analizi yapılmıştır. *CD133* ekspresyonu bakımından incelendiğinde $CD133^+$ hücrelerinde $CD133^-$ hücrelerine göre 4,74 kat SaOs-2 hücrelerine göre 1,11 kat fark olduğu görülmüştür. Bu veri *CD133* belirteci kullanılarak yapılan ayırımın başarılı olduğunu göstermiştir. Bu veriyi destekleyen diğer önemli bir veri de $CD133^+$ hücrelerinde *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* gibi köklük genlerinin daha fazla ifade edilmesidir (Bkz. Şekil 4.4).

MACS ile ayırım yapıldıktan hemen sonra elde edilen hücre fraksiyonlarının RT-PZR analizi sonuçları $CD133^-$ hücrelerinde de *CD133* ekspresyonu olduğunu göstermiştir. Bu sonucun elde edilmesi tam anlamıyla SaOs-2 hücre dizisinden $CD133^+$ hücrelerinin ayrılamadığını göstermesi bakımından önemlidir. *CD133* ifade eden hücrelerin $CD133^-$ 'e spesifik mikro taneciklerle tam olarak etkileşime giremediği ya da mikro taneciklerin bozunmaya uğradığı gibi nedenlerin bu sonucun oluşmasında önemli olabileceği düşünülmektedir.

Çeşitli gruplarca yapılan çalışmalarda $CD133^+$ hücrelerinin sfer oluşturabildikleri vurgulanmıştır (Gibbs et al., 2005; Tirino et al., 2008; Tirino et al., 2011). Bu çalışmada da 5×10^4 , 1×10^5 ve 5×10^5 hücre kullanılarak $CD133^+$ hücrelerinin mikro doku oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Yapılan gözlemler tüm hücre gruplarında mikro dokuların oluştuğunu göstermiştir. Beklendiği üzere kullanılan hücre sayısına göre oluşan mikro doku boyutu değişmiştir. En büyük boyuta sahip mikro dokular hücre sayısının 5×10^5 olduğu grupta en küçük boyuta sahip mikro dokular hücre sayısının en az olduğu (5×10^4 hücre) grupta görülmüştür. Tüm gruplarda mikro dokuların morfolojik görünimleri benzerlik göstermiştir; fakat 5×10^5 hücre kullanılarak oluşturulan mikro dokuların daha düzgün küre morfolojisi sergilediği görülmüştür. Bunun sebebinin kullanılan agar jellerde oluşan kuyucukların hücrelerce tamamen doldurulması olduğu düşünülmektedir.

CD133⁺ mikro dokularının boyut analizi Image J programı kullanılarak yapılmıştır. Boyut analizi sonuçları tüm gruplarda CD133⁺ mikro doku boyutunun 3 gün boyunca azaldığı ve 4. günde artmaya başladığını göstermiştir. 3 günlük kültür süresinde meydana gelen azalmanın mikro dokuyu oluşturan hücreler arası etkileşimlerin devam ettiği anlamına gelebileceği düşünülmektedir. 4. günde meydana gelen boyutsal artış göz önünde bulundurulduğunda hücre-hücre etkileşimlerinin dokulaşmanın oluşmasını sağladığı dolayısı ile hücrelerin karşılıklı iletişim haline geçerek daha hızlı bölünmeye başladıkları yorumu yapılabilir. Sonuç olarak meydana gelen hızlı bölünme boyut artışına yansımıştır.

5×10^4 , 1×10^5 ve 5×10^5 olmak üzere 3 farklı sayıda CD133⁻ hücreleri kullanılarak bu hücrelerin mikro doku oluşturma yetileri araştırılmıştır. Yayınlanan bilimsel raporlarda CD133⁻ fenotipine sahip hücrelerin sfer oluşturmadağı belirtilmiştir (Gibbs et al., 2005). Bu çalışmada ilginç bir şekilde tüm gruplarda mikro dokuların oluştuğı gözlemlenmiştir. Meydana gelen bu olayın dinamik kanser kök hücre modeli ile açıklanabileceğı düşünülmektedir. Dinamik kök hücre modeli KKH'lerin tümörojenik olmayan farklılaşmış kanser hücrelerinden kaynaklanabildiğini savunmaktadır (O'Connor et al., 2014; Chaffer et al., 2011; Auffinger et al., 2014). Mikro dokularda hücreler arasındaki uzaklığın oldukça az olması hücre-hücre etkileşimlerinin daha kolay olmasını sağlamaktadır. Bu da hücreler arası karşılıklı iletişimlerin daha hızlı olmasını ve hücrelerin *in vivo* benzeri bir mikro çevrede çoğalmalarını sağlamaktadır. Bu bakımdan düşünüldüğünde mikro dokuyu oluşturan CD133⁻ hücreleri arasındaki yakın etkileşimlerin CD133⁻ hücrelerin CD133⁺ hücrelere dönüşmesine neden olabileceğı düşünülmektedir. Dolayısı ile mikro doku oluşumun CD133⁻ kaynaklı CD133⁺ hücrelerden ileri gelmiş olabileceğı düşünülmektedir. Bu düşüncayı 1×10^5 hücre kullanılarak oluşturulan mikro dokuların RT-PZR sonuçları desteklemektedir. Yapılan çalışmada 4 gün kültürü devam eden CD133⁻ mikro dokuları *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* köklük genleri

bakımından incelendiğinde CD133⁻ mikro dokularının *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* gen ekspresyonları gösterdikleri belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.13).

CD133⁻ hücrelerinin mikro doku oluşturmalarının diğer bir açıklaması da, ayırım esnasında SaOs-2 hücrelerinden CD133⁺ hücrelerin tamamının ayrılmasında başarısız olunabileceğidir. Fakat bu senaryonun Şekil 4.4 incelendiğinde olası olamayacağı anlaşılmaktadır. Şekil 4.4 incelendiğinde ayırım sonunda elde edilen CD133⁻ hücrelerinde *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* gibi köklük ile ilişkilendirilen gen ekspresyonlarının neredeyse hiç olmadığı anlaşılmaktadır. Bu sonuç zamanla mikro dokudaki CD133⁻ hücrelerinin farklılaşarak CD133⁺ karakteri kazanabileceği hipotezini desteklemektedir.

Riman ve ark. SaOs-2 hücre dizisinin de içinde bulunduğu 3 farklı osteosarkoma hücre serisini 3B kültürde (asılı damla metodu) kültüre ederek mikro doku oluşum süreçlerini incelemiş ve tüm hücre gruplarının mikro doku oluşturduğunu göstermiştir (Rimann et al., 2014). Ayrıca Wang ve ark. da OS99-1, SaOs-2, MG-63 ve HuO9 hücre dizilerinin sarkosfer oluşturdıklarını göstermiştir (Wang et al., 2009). Bu çalışma kapsamında 5×10^4 , 1×10^5 ve 5×10^5 hücre sayıları kullanılarak SaOs-2 hücrelerinin mikro doku oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda hücre sayısından bağımsız olarak SaOs-2 hücrelerinin mikro doku oluşturduğu anlaşılmıştır. Riman ve ark. asılı damla metodu ile damla başına 2500 hücre kullanmış ve 4 gün sonra SaOs-2 mikro dokuların oluştuğunu ifade etmişlerdir. Oluşan SaOs-2 mikro dokuların 21 gün boyunca stabilitelerini korudukları ve zamanla boyutsal artış meydana geldiğini ifade etmişlerdi. Bu çalışmada jel başına 50.000 hücre kullanılmış ve mikro dokuların 24 saat sonra oluştuğu belirlenmiştir. Bu veri mikro doku oluşum sürecinin hızlanmasında başlangıç hücre sayısının ne denli önemli olduğunu kanıtlar niteliktedir. Ayrıca, tüm gruplarda oluşan mikro dokuların boyutlarının zamanla artmaya başladığı da tespit edilmiştir. Tüm deney

gruplarında zamanla boyutsal artışın meydana gelmesi mikro dokuyu oluşturan hücrelerinin canlılıklarını devam ettirdiğini işaret etmektedir.

Tümör hücrelerinin sfer oluşturma yetisinin KKH varlığının bir nedeni olabileceği birçok çalışmada vurgulanmıştır (Mannelli and Gallo, 2012; Ishizawa et al., 2010; Yuan et al., 2004; Dalerba et al., 2007; Shackleton, 2010). Ayrıca, sfer oluşturma yetisi KKH'lerin ayrışması için kullanılan standart bir teknik haline almıştır (Wang, et al., 2009). Bu çalışmada SaOs-2 hücrelerinin mikro doku oluşturdıkları gösterilmiştir. Bu oluşum SaOs-2 hücrelerinde tümör başlatıcı hücre varlığını kanıtlar niteliktedir. Ayrıca SaOs-2 mikro dokularında EKH'lerde ploropotensi ve kendiliğinden yenilenmede önemli görevleri olduğu bilinen *OCT3/4* ve *nanog* ekspresyonlarının yanı sıra *Sox2* ve *nestin* gen ekspresyonlarının RT-PZR ile gösterilmesi SaOs-2 hücre dizisinin KKH içerdiğini gösterir niteliktedir.

CD133⁺ hücrelerin mikro dokuda yerleşimlerinin belirlenmesinin bu çalışmada ulaşılması hedeflenen amaçlar arasında olduğu daha önce ifade edilmişti. Bu kapsamda CD133⁺ ve CD133⁻ hücreleri 3D Petri Dish® tekniği kullanılarak oluşturulan agar jellerde beraber kültüre edilmiştir. Yapılan beraber kültür çalışmasında CD133⁺ hücre yerleşiminin hücre sayısından etkilenip etkilenmeyeceğinin anlaşılması amacıyla %50, %25, %10, %5 ve %2,5 oranlarında CD133⁺ hücreler kullanılmıştır. Bu oranlar belirlenirken SaOs-2 hücrelerinin CD133⁺ hücre içeriğinin %3-5 veya $10,86 \pm 6,8$ olduğu bilgisi dikkate alınmıştır (Tirino et al., 2008; Kelly et al., 2010). Hücre yerleşiminin takibi için beraber kültüre alınmadan önce CD133⁺ hücreleri kırmızı, CD133⁻ hücreleri yeşil renkte boyanmıştır. 7 gün süren kültür süresince tüm deney gruplarında CD133⁺ hücrelerinin özel bir yerleşim sergilemedikleri, rastgele bir dizilim gösterdikleri anlaşılmıştır. Ayrıca, kullanılan hücre sayısının bu lokalizasyon örüntüsüne belirgin bir etkisinin olmadığı da görülmüştür (Bkz. Şekil 4.11a, 11b).

Elde edilen bu veriler $CD133^+$ hücrelerinin yerleşiminin 3B mikro dokularda hücre sayısından etkilenmediği, kültürün 6. saatindeki lokalizasyon örüntü şeklinin 168 saat sonunda da değişmediğini göstermiştir. Ayrıca, bu sonuçlar kök hücre temelli 3B *in vitro* osteosarkoma modelinde KKH özelliği gösteren $CD133^+$ hücrelerin mikro çevreleri hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. $CD133^+$ hücrelerin tüm deney gruplarında mikro dokuların içine dağıldığı dolayısı ile mikro dokuyu oluşturan farklılaşmış tümör hücreleri ($CD133^-$) ile karşılıklı etkileşim göstererek bir mikro çevre oluşturdıkları düşünülmektedir. Bu lokalizasyon örüntü biçiminin KKH'lerin canlılıklarını devam ettirebilmek için ikinci bir faktör olarak $CD133^-$ hücrelere ihtiyaç duyduklarını önerme noktasında önemli göstergeler sunabileceği vurgulanmalıdır. Ayrıca, mikro çevrenin mikro dokuyu oluşturan hücre popülasyonunda bulunan kanser kök hücre sayısına göre değişiklik göstermediği açık bir şekilde anlaşılmıştır.

Bu sonuçlara ek olarak $CD133^+$ hücrelerinin gösterdiği bu yerleşme biçimi bu hücrelerin adesif ve kohesif kuvvetleri hakkında da bilgi sağlamaktadır. Bilindiği üzere adesif ve kohesif kuvvetleri yüksek olan hücreler 3B mikro dokunun merkezinde yer edinirken bu kuvvetlerin zayıf olduğu hücreler mikro dokunun çeperlerinde yerleşme eğilimi göstermektedir (Napolitano et al., 2007b). Bu bilgi dikkate alındığında yapılan bu çalışma sonucunda $CD133^+$ ve $CD133^-$ hücrelerinin adesif ve kohesif kuvvetlerinin birbirine benzer oldukları sonucuna varılabileceği düşünülmektedir. Bu verilerin desteklenmesi için daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmalıdır.

Mikro dokuda $CD133^+$ yerleşiminin anlaşılması amacıyla yapılan diğer bir çalışma mikro dokuların ihtiva ettiği hücrelerin *CD133*, *OCT3/4* ve hücre proliferasyon belirteci olan *Ki-67* ifadesinin immünohistokimya ile incelenmesidir. Yapılan incelemeler sonucunda tüm deney gruplarında *CD133*, *OCT3/4* ve *Ki-67* ifadelerinin protein seviyesinde görüldüğü anlaşılmıştır. Fakat bu profilin tüm hücreler tarafından gösterilmediği, bazı

hücrelerde bahsi geçen belirteçlerin ifade edilmediği tespit edilmiştir. Bunun da yapılan beraber kültür sisteminde CD133⁻ hücrelerin kullanılmasının doğal bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen veriler mikro dokuları oluşturan hücrelerin KKH özelliklerini devam ettirdikleri ve çoğalma kapasitesinde olduklarını göstermiştir. Bu da mikro doku tekniğinin kök hücre özelliklerinin idame ettirilmesinde başarılı olduğunu gösterir niteliktedir.

Immunohistokimya sonucu elde edilen hücre yerleşim şeklinin floresan mikroskop çalışması ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Tablo 4.5 incelendiğinde CD133 ve OCT3/4 ifade eden hücrelerin belirgin bir yerleşme şekli göstermedikleri anlaşılmaktadır. Bu da hücrelerin oluşturduğu yerleşim biçiminin “**rastgele**” olduğu tespitini oldukça kuvvetlendirmiştir. Fakat Gibbs ve ark. yaptıkları çalışmada OCT3/4 ekspresyonu gösteren hücrelerin sferin çeperinde yerleşim gösterdiği ifade edilmiştir Bu lokalizasyon şekli sadece CD133 ekspresyon ifadesi gösterdiği belirlenen hücreler kullanılarak oluşturulan mikro dokularda gözlemlenmiştir (Gibbs et al., 2005). Dolayısı ile yapılan çalışmada OCT3/4 ve CD133 ifade eden hücrelerin hem mikro dokunun merkezinde hem de çeperlerinde yerleşim göstermesi yapılan CD133⁻ ve CD133⁺ beraber kültürünün bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. Tümorojenik olan ve olmayan hücrelerin mikro dokuda karşılıklı etkileşimlerinin bu lokalizasyon örüntüsünün oluşmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

CD133⁺ hücre miktarının değişimi ile gözlemlenen Ki67, Oct4 ve CD133 immünreaktivite sonuçları değişmektedir (Bkz. Tablo 4.5). Bu da beklendiği gibi kullanılan CD133⁺ profiline sahip hücre miktarının immünreaktivite sonucuna yansımaya neden olmuştur. Fakat oluşan farklılığın gruplar arasında üç belirteç bakımından benzerlik göstermediği anlaşılmıştır. Ki-67 ifadesi %5 CD133⁺ kullanılan grupta gözlenmezken diğer tüm gruplarda gözlenmiştir. Aynı şekilde %10 CD133⁺ hücre kullanılan grupta CD133 immünreaktivitesi görülmezken diğer tüm gruplarda görülmüştür. OCT3/4 bakımından ise tüm gruplar pozitif sonuç vermiş fakat

en fazla %25 CD133⁺ grubunda görülmüştür. Bu sonuçlar immunohistokimyasal boyamaların tekrarlanması gerektiğini göstermektedir.

Mikro dokuların karakterizasyon çalışması kapsamında CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak mikro dokular oluşturulmuş ve 4. günde kültür sonlandırılarak mikro dokulara canlı&ölü analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda tüm hücre gruplarında mikro dokuda canlı ve ölü hücreler olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.12). Liu ve ark. sfer yapısında sadece KKH özelliği gösteren hücrelerin canlılıklarını devam ettirdiğini, tümörojenik olmayan hücrelerin ise canlılıklarını yitirdiğini ifade etmiştir (Liu et al., 2011). Yapılan çalışmada tüm hücre grupları mikro dokularında ölü hücrelerin oluşu CD133⁻ hücre varlığını gösterir niteliktedir. CD133⁺ hücrelerinin oluşturduğu mikro dokularda görülen ölü miktarının CD133⁻ ve SaOs-2 mikro dokularına göre daha az oluşu kültüre edilen CD133⁺ hücrelerinin KKH özelliği gösterdiğini destekler niteliktedir. Ayrıca bilindiği üzere CD133⁺ hücreleri farklılaşarak tümördeki CD133⁻ hücre varlığına kaynaklık yapmaktadır (Tirino et al. 2008; Tirino et al. 2011). Dolayısı ile CD133⁺ hücreleri kullanılarak oluşturulan mikro dokularda ölü hücrelerin yani CD133⁻ hücrelerin oluşu CD133⁺ hücrelerin zamanla farklılaştığı anlamına gelebilir. Daha önce de belirtildiği gibi dinamik KKH modeline göre tümörojenik özellik gösteren hücreler tümörojenik olmayan hücrelere dönüşebilmektedir. Dolayısı ile CD133⁻ hücre mikro dokularının merkezinde yer alan hücrelerin canlı olması bu hücrelerin CD133⁺ olabileceğini düşündürmektedir. SaOs-2 hücrelerinde beklendiği üzere hem CD133⁺ hem de CD133⁻ hücre bulunmalıdır. Yapılan canlı&ölü hücre analizi SaOs-2 mikro dokusunda hem canlı hem de ölü hücre olduğunu göstermiştir.

Çeşitli bilimsel raporlarda KKH özelliği gösterdiği kanıtlanan hücre fraksiyonlarının 3B kültür sisteminde 2B kültür sistemine göre gen ekspresyon profilleri bakımından önemi farklar gösterdikleri ve köklük özelliklerin daha iyi idame ettiği ifade edilmiştir (J. Li et al., 2013; Tirino et al., 2008; Kelly et al., 2010). Bu çalışmada CD133⁺, CD133⁻ ve SaOs-2 hücreleri paralel olarak

hem 3B mikro doku kültür sisteminde hem de standart 2B hücre kültürü sisteminde 4 gün boyunca kültüre edilmiş ve 4 gün sonunda *CD133*, *Sox2*, *OCT3/4*, *nanog* ve *nestin* ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Yapılan analizler 3B sistemde kültüre edilen hücrelerin 2B sistemde kültüre edilen hücrelere göre taranan tüm gen ekspresyonları bakımından daha yüksek değerler göstermiştir. Bu farkın hücrelerin 2B kültür sisteminde ekspresyon profillerini değiştirerek farklılaştığı ve hücrelerin köklük özelliklerini yitirmelerinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca 3B kültürlerde hücre-hücre, hücre-hücre dışı matriks etkileşimleri nedeniyle hücrelerin *in vivo* özelliklerini devam ettirmelerinin daha kolay olduğu vurgulanmıştır (Bates et al., 2000). Bu kapsamda değerlendirildiğinde, 3B mikro dokularında $CD133^+$ hücrelerinin karşılıklı etkileşimlerinin daha güçlü olması nedeniyle köklük ve *CD133* ifadelerinin 2B'ye göre belirgin bir fark göstermesi beklenen bir durumdur.

Mikro dokuların protein ifadelerinin karakterizasyonu amacıyla $CD133^+$, $CD133^-$ ve SaOs-2 hücreleri kullanılarak 3B mikro dokular oluşturulmuş ve mikro dokular 4 gün sonunda fikse edilerek protein seviyesinde *CD133*, *OCT3/4*, *Sox2* ve *Ki-67* ifadelerine bakılmıştır. Karşılaştırma grubu olarak hücreler 2B kültür sisteminde kültüre edilmiştir. Yapılan immünreaktivite analiz sonuçları $CD133^+$ hücrelerinin *CD133* ve *OCT3/4* ifadelerinin 3B kültür koşulunda 2B kültüre göre daha başarılı olduğunu göstermiştir. Ancak *Ki-67* bakımından 2B kültür koşulları ekspresyon seviyesi bakımından daha yüksek sonuçlar vermiştir. Bunun sebebi olarak kullanılan 3B kültür sistemi metodunda hücreler arası mesafenin oldukça az olması nedeniyle hücreler arası karşılıklı etkileşimlerin daha rahat olması düşünülmektedir. Bilindiği üzere 2B kültür sistemlerinde KKH özelliği uzun süre idame ettirilmemekte zamanla hücrelerin köklükleri kayba uğramaktadır (Tirino, et al., 2008). $CD133^+$ hücre grubu için elde edilen verilerin bu bilginin doğruluğunu kanıtlama noktasında işlev görebileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu sonuçlar 3B kültür sisteminin KKH özelliğinin gösterilmesi bakımından 2B kültür sistemine göre daha başarılı

olduğunu göstermektedir. Fakat 3B kültür sistemi aynı başarıyı CD133⁺ hücre grubunda gösterememiştir. 2B kültür sisteminde *CD133*, *OCT3/4*, *Ki-67* ve *Sox2* ekspresyonları tespit edilmişken 3B kültür sisteminde ise CD133 ve Sox2 ifadesinin negatif olduğu tespit edilmiştir. Aynı ekspresyon profili SaOs-2 hücrelerinde de gözlemlenmiştir. Fakat bilindiği üzere 2B kültür sistemlerinde doku yapısı, hücre-hücre etkileşimi, hücre-ekstraselüler matris etkileşimi, mekanik özellikler ve biyokimyasal ağlar gibi doku ve tümörlerde görülen fizyolojik parametreler değişikliklere uğramaktadır (Dolznig, H., et al., 2011). Ancak çalışmada elde edilen veriler 2B kültür sisteminde hücrelerin KKH özelliği bakımından *CD133* ve *Sox2* gibi oldukça önem arz eden belirteçlerin ekspresyonunda daha başarılı olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak 2B kültür sisteminde transkripsiyon ve translasyona süreçlerinin daha kısa ve etkili olduğu 3B kültür sisteminde ise 4 günlük süresinin bahsi geçen süreçlerin meydana gelmesi için yeterli olmadığı düşünülmektedir. 2B kültür sisteminde kültüre edilen hücrelerin gerçek zamanlı PZR sonuçları incelendiğinde bu durumun olabileceği anlaşılmaktadır. 2B için elde edilen veriler incelendiğinde *CD133* ve *Sox2* ekspresyonlarının CD133⁺ ve SaOs-2 hücrelerinde daha fazla olduğu görülmektedir. Bu da bu hücre gruplarında *CD133* ve *Sox2* belirteçlerinin ifadesinden sorumlu yol izinde transkripsiyonun daha iyi olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 4.14).

İmmünreaktivite ve gerçek zamanlı PZR sonuçları irdelendiğinde sonuçların örtüşmediği görülmektedir. PZR sonuçları 3B kültür sisteminin kök hücre özelliklerinin devam ettirilmesinde 2B kültür sistemine göre oldukça başarılı olduğunu gösterirken immünohistokimya sonuçları *CD133*, *OCT3/4* ve *Sox2* ifadeleri bakımından aynı sonucu verememiştir. Bunun sebebi olarak mRNA seviyesinde olan ekspresyonunun tamamının transkripsiyonel modifikasyonlar nedeniyle translasyona yansımaması düşünülmektedir. Ayrıca diğer bir sebep olarak kullanılan büyütme ortamında bu süreci tetikleyecek büyüme faktörleri ve insülin gibi faktörlerin yetersiz olması olarak düşünülmüştür.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada SaOs-2 hücre dizisinden MACS tekniği kullanılarak CD133⁺ hücreleri ayrılmıştır. Fakat çalışma süresince yapılan ayrımların verimleri kıyaslandığında MACS tekniğinin aynı sonuçları vermediği görülmüştür. Dolayısı ile **daha sofistike, daha az sayıda hücre ile çalışılabilen FACS tekniğinin kullanılması** önerilmektedir.

Literatürdeki benzeri çalışmalarda CD133⁺ hücreleri bileşiminde putresin ve progesteron gibi mitojenik ve hücre çoğalmasını sağlayan bileşenlerin bulunduğu ortamlar kullanılmış, FBS kullanımından kaçınılmıştır. Bu çalışmada ise bileşiminde %2,5 FBS bulunduran ortam kullanılmıştır. İleride yapılacak olan çalışmalarda **serumsuz besi ortamı kullanılarak CD133⁺ ve CD133⁻ hücrelerin mikro doku oluşturma kapasitelerine bakılması ve gen ekspresyon profillerinin çıkarılması** önerilmektedir. Ayrıca, mikro dokuda CD133⁻ hücrelerinin CD133⁺ hücrelerine dönüşümlerinin desteklenmesi amacıyla **CD133⁻ mikro dokularının pasajlanıp elde edilen hücrelerin tekrar mikro doku oluşturup oluşturamadıklarına bakılması ve zamanla hücrelerde meydana gelen genetik değişimler incelenmelidir.**

SaOs-2 hücrelerinden izole edilen ve mikro doku oluşturdıkları belirlenen CD133⁺ hücrelerin tümörojenitelerinin belirlenmesi amacıyla **in vivo transplantasyon çalışmalarının yapılması** gerektiği düşünülmektedir.

Mikro dokuda CD133⁺ hücre yerleşiminin aydınlatılması ve oluşan mikro çevrenin anlaşılmasına yönelik daha detaylı analizlerin yapılması önerilmektedir. Bu çalışmada elde edilen veriler her ne kadar mikro dokuda oluşan mikro çevre hakkında bilgi sağlamış ise de **hücre-hücre etkileşiminin daha detaylı analizlerle gösterilmesi** gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbott, A.**, 2003, Cell Culture: Biology's New Dimension. Nature 424 (6951). Nature Publishing Group: 870–72pp.
- Ablett, M.P., Jagdeep, K.S., and Robert, Clarke.**, 2012, Stem Cells in Breast Tumours: Are They Ready for the Clinic?, European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990) 48 (14): 2104–16. doi:10.1016/j.ejca.2012.03.019.
- Achilli, T., Stephanie, M., Julia, M., Anubhav, T., Morgan. J.**, 2014, Multilayer spheroids to quantify drug uptake and diffusion in 3D, Molecular Pharmaceutics, dx.doi.org/10.1021/mp500002y | Mol. Pharmaceutics
- Achilli, T., Stephanie, M., Anubhav, T., and Morgan. J.**, 2011, Quantification of the kinetics and extent of self-sorting in three dimensional spheroids, Tissue Engineering Part C: Methods, 18:4, 302–309pp.
- Al-Hajj, M., Becker, M.W., Wicha, M., Weissman, I., and Clarke, M.F.**, 2004, “Therapeutic implications of cancer stem cells, Current Opinion in Genetics & Development, 14 (1): 43–47pp.
- Al-Hajj, M., and Clarke, M.F.**, 2004, Self-Renewal and solid tumor stem cells, Oncogene 23 (43): 7274–82pp.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F.**, 2003, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, PNAS, 100 (11): 3983–88pp.
- Anıl, M.**, 2014, CD133 (+) Kanser Kök Hücreleri İle Bakteriyel Selüloz Doku İskelesi Üzerinde Üç Boyutlu Osteosarkom Modeli Oluşturulması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 139s.
- Anonim**, (2010): Türkiye Büyük Millet Meclisi, Kanser Hastalığı Konusunun Araştırılarak Alınması Gereken Önlemlerin Belirlenmesi Amacıyla Kurulan Meclis Araştırması Komisyonu Raporu, TBMM, Dönem: 23 Yasama Yılı: 5 (s. sayısı: 648).
- Auffinger, B., Tobias, A.L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M.S., Ahmet, A.U.**, 2014, Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy, Cell Death and Differentiation, 1–13pp. doi:10.1038/cdd.2014.31.
- Bao, B., Lai, C.P., Naus, C.C., and Morgan, J.**, 2012, Pannexin1 drives multicellular aggregate compaction via a signaling cascade that remodels the actin cytoskeleton, The Journal of Biological Chemistry 287(11): 8407–16pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bao, B., Jiang, J., Yanase, T., Nishi, Y., and Morgan, J.,** 2011, Connexon-Mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly, *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (1): 255–64pp.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., egthel, H., and Peters, P.J.,** 2007, Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *lgr5*, *Nature* 449 (7165). Nature Publishing Group: 1003–7pp.
- Basu-Roy, U., Basilico, C., and Mansukhani, A.,** 2013, Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma.” *Cancer Letters* 338 (1): 158–67pp.
- Bates, R.C., Edwards N.S., and Yates, J.D.,** 2000. “Spheroids and cell survival, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 36: 61–7pp.
- Bianco, P., and Robey, P.G.,** 2001, Stem cells in tissue engineering, *Nature* 414 (6859). Nature Publishing Group: 118–21pp.
- Bingle, L., Lewis, C.E., Corke, K.P., Reed, M.W.R., and Brown, N.J.,** 2005, Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo, *British Journal of Cancer* 94 (1), Nature Publishing Group: 101–7pp.
- Bjerkvig, R., K Steinsvåg K., and Didrik Laerum, O.D.,** 1986, Reaggregation of fetal rat brain cells in a stationary culture system 1: methodology and cell identification.” In *Vitro Cellular & Developmental Biology* 22 (4), Springer: 180–92pp.
- Bonnet, D., and Dick, J.E.,** 1997, Human acute myeloid leukemias is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nature*, 3 (7): 730–37pp.
- Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P., Rodrigues, L.O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., Arendt, L.M., Kuperwasser, C., Bieri, B., Weinberg, R.A.,** 2011, Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (19): 7950–55pp.
- Chen, Lei C., Xiao, Z., Meng, Y., Zhao, Y., Han, J., Su, G., Chen, B., and Dai, J.,** 2012, The enhancement of cancer stem cell properties of mcf-7 cells in 3d collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs, *Biomaterials* 33 (5). Elsevier: 1437–44pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chen, S., and Huang, E.H.**, 2014, The colon cancer stem cell microenvironment holds keys to future cancer therapy, *Journal of Gastrointestinal Surgery : Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 18 (5): 1040–48pp.
- Chong, Y.K., Toh, T.B., Zaiden, N., Poonepalli, A., Siew Hong Leong, S.H., Catherine Ee Ling Ong, C.E., Yiting Yu, Y., Tan, P.B., See, S.J., and Ng, W.H.**, 2009, Cryopreservation of neurospheres derived from human glioblastoma multiforme.” *Stem Cells*, 27 (1), Wiley Online Library: 29–39pp.
- Clarke, M.F., and Fuller, M.**, 2006, Stem cells and cancer: two faces of eve, *Cell*, 124 (6): 1111–15pp.
- Collins, A.T., Berry, P., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland. N.J.**, 2005, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Research*, 65 (23): 10946–51pp.
- Çay, H.F., ve Sezer, N.**, 2002, Kemik yapısı ve kemik döngüsü üzeri ne bir derleme”, *Fiziksel Tıp*, 5 (3): 177–84s.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.K., Liu, R., Wang, X., W Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., and Simeone, D.M.**, 2007, Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (24), National Acad Sciences: 10158–63pp.
- Dean, D.M, Rago, A.P., and Morgan. J.**, 2009, Fibroblast elongation and dendritic extensions in constrained versus unconstrained microtissues, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66 (3): 129–41pp.
- Del D., Danny, Werbowetski, T., and Del Maestro, R.F.**, 2004, Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion, *Journal of Neuro-Oncology* 67 (3), Springer: 295–303pp.
- DeLaney, T.F., Lily Park, L., Saveli I Goldberg, S.I., Eugen B Hug, E.B., Liebsch, N.J., Munzenrider, J.E., and Suit, H.D.**, 2005, Radiotherapy for local control of osteosarcoma, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 61 (2): 492–98pp.
- Deliloğlu Gürhan, S.İ., Özgün, M.Ö., Sözer, P., ve Lüleci İ.**, 2008, Kök hücreler ve doku mühendisliği, *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1 (5): 143–68s.
- Deschaseaux, F., Sensébé, L., and Heymann, D.**, 2009, Mechanisms of bone repair and regeneration, *Trends in Molecular Medicine*, 15 (9): 417–29pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Desoize, B., and Jardillier, J.,** 2000, Multicellular Resistance : a paradigm for clinical resistance ?, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 36: 193–207p.
- Di Fiore, R., Guercio, A., Puleio, R., Di Marco, P., Drago-Ferrante, R., D’Anneo, A., De Blasio, A.,D., Di Bella, D., Pentimalli, F., Forte, I.M., Giordano, A., Tesoriere, G., Vento, Renza.,** 2012, Modeling human osteosarcoma in mice through 3ab-os cancer stem cell xenografts.” *Journal of Cellular Biochemistry*, 113 (11): 3380–92pp.
- Di Fiore, R., Santulli, A., Ferrante, R.G., Giuliano, M., De Blasio, A., Messina, C., Pirozzi, G., Tirino, V., Tesoriere, G., and Vento, R.,** 2009, Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-stem cells by long-term 3-aminobenzamide treatment, *Journal of Cellular Physiology*, 219 (2): 301–13pp.
- Dinshaw, K., Ngoma, T., and Ashton, L.P.,** 2008, Dünya kanser raporu 2008, 509pp.
- Dolznic, H., Walzl, A., NKramer, N., Rosner, M., Garin-Chesa, P., and Hengstschl ger, M.,** 2011, Organotypic spheroid cultures to study tumor–stroma interaction during cancer development, *Drug Discovery Today: Disease Models*, 8 (2-3): 113–19pp.
- Downey, P.A., and Siegel, M.I.,** 2006, Bone biology and the clinical implications for osteoporosis.” *Journal of Physical Therapy*, 86 (1): 77–91pp.
- Dubessy, C., Merlin, J.L., Marchal, C., and Guillemain, F.,** 2000, Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy, *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 36 (2), Elsevier: 179–92pp.
- Ducy, P.,** 2000, The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance.”*Science*, 289 (5484): 1501–4pp.
- Duguay, D., Foty, R.A., and Steinberg, M.S.,** 2003, Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants, *Developmental Biology*, 253 (2), Elsevier: 309–23pp.
- Eramo, A.F.L., Sette, G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticelli, C.,Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R.,** 2007, Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population.” *Cell Death & Differentiation* 15 (3), Nature Publishing Group: 504–14pp.
- Esguerra, M., Fink, H., Laschke, M.W., Jeppsson, A., Delbro, D., Gatenholm, P., Mich Menger, M.D., and Risberg, B.,** 2010, Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93 (1), 140–49pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Fennema, E., Rivron N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C., and de Boer J.**, 2013, spheroid culture as a tool for creating 3d complex tissues, *Trends in Biotechnology* 31 (2), 108–15pp.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Freddie Bray, F., David Forman, D., Colin Mathers, C., and DParkin, D.M.**, 2010, "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 127 (12): 2893–2917pp.
- Di Fiore, R., Drago-ferrante, R., D Anneo, A., De Blasio, A., Santulli, A., Messina, C., Carlisi, D., Tesoriere, G., and Vento, R.**, 2013, Differentiation of human osteosarcoma 3ab-os stem-like cells in derivatives of the three primary germ layers as a useful in vitro model to develop several purposes, *Stem Cell Discovery*, 3 (3): 188–201pp.
- Freshney, R.I.**, 2005, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Wiley, New York 1994.
- Friedrich, J., Ebner, R and Kunz-Schughart. L.A.**, 2007, Experimental anti-tumor therapy in 3-d: spheroids-old hat or new challenge?" *International Journal of Radiation Biology*, 83 (11-12), 1 849–71pp.
- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., and Kunz-Schughart. L.A.**, 2009, Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach, *Nature Protocols* ,4(3), 309–24pp.
- Fukuda, J., Sakai Y., and Nakazawa, K.**, 2006, Novel hepatocyte culture system developed using microfabrication and collagen/polyethylene glycol microcontact printing, *Biomaterials*, 27(7): 1061–70pp.
- Gangopadhyay, S., Nandy, A., Hor, P., and Mukhopadhyay, A.**, 2013, Breast cancer stem cells: a novel therapeutic target, *Clinical Breast Cancer*, 13 (1), 7–15pp.
- Gibbs, C., Kukekov, V.G., Reith, J.D., Tchigrinova, O., Suslov, O.N., Scott, E.W., Ghivizzani, S.C., Ignatova, T.N., and Steindler, D.A.**, 2005, Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis, *Neoplasia*, 7 (11), 967–76pp.
- Gill, J., Ahluwalia, M.K., Geller, D., and Gorlick. R.**, 2013, Pharmacology & therapeutics new targets and approaches in osteosarcoma, *Pharmacology & Therapeutics*, 137, 89–99pp.
- Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., C Kleer, C.G., and Liu, S.**, 2007, ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome, *Cell Stem Cell*, 1 (5), 555–67pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Grützkau, A., and Radbruch, A.,** 2010, Small but mighty: how the macs-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years, *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(7): 643–47pp.
- Gstraunthaler, G.,** 2003, Alternatives to the use of fetal bovine serum:serum-free cell culture, *ALTEX* 20, 4(03), 275-281pp.
- Gupta, P.B., Onder, T.T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R.A., and Lander, E.S.,** 2009, Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening, *Cell*, 138 (4), 645–59pp.
- Han, M.E., Jeon, T.Y., Hwang, S.H., Lee, Y.S., Kim, H.J., Shim, H.E.,Yoon, S., Baek, S.B., Kim, B.S., and Kang, C.D.,** 2011, Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68 (21), 3589–3605pp.
- Hannig, M., Figulla, H.F., Sauer, H., and Wartenberg, M.,** 2010, Control of leucocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14 (1-2), 303–12pp.
- Hausser, H.J., and Brenner, R.E,** 2005, Phenotypic instability of saos-2 cells in long-term culture, *Biochemical and Biophysical Research Communications* ,333 (1), 216–22pp.
- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M.B., and Kornblum, H.I.,** 2003, Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (25), 15178–83pp.
- Henkel, K.O., Gerber, T., Dörfling, P., Gundlach, K.K..H., and Bienengräber, V.,** 2005. “Repair of bone defects by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 33 (1), 45–49pp.
- Hermann, P.C, Bhaskar, S., Cioffi, M., and Heeschen, C.,** 2010, Cancer stem cells in solid tumors, *Seminars in Cancer Biology* 20 (2), 77–84p.
- Hermann, P.C., S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C.,** 2007, Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer, *Cell Stem Cell*, 1 (3), 313–23pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.,** 2010, Multicellular Tumor Spheroids: An Underestimated Tool Is Catching up Again, *Journal of Biotechnology*, 148 (1). 3–15pp.
- Ho, V.H.B., Müller, K.H., Barcza, A., Chen, R., and Slater, N.K.H.,** 2010, Generation and manipulation of magnetic multicellular spheroids, *Biomaterials*, 31 (11), 3095–3102pp.
- Hoemann, C.D., Gabalawy, H., and McKee, M.D.,** 2009, In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization, *Pathologie-Biologie*, 57 (4), 318–23pp.
- Hoffmann, T.K., Schirlau, K., Sonkoly, E., Brandau, S., Lang, S., Pivarsci, A., Balz, V., Müller, A., Homey, B., and Boelke E.,** 2009, A novel mechanism for anti-egfr antibody action involves chemokine-mediated leukocyte infiltration, *International Journal of Cancer*, 124 (11), 2589–96pp.
- Horning, J.L., K Sahoo, S.K., Vijayaraghavalu, S., Dimitrijevic, S., Vasir, J.K., Jain, T.K., Panda, A.K., and Labhasetwar, V.,** 2008, 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs, *Molecular Pharmaceutics*, 5 (5), 849–62pp.
- Hsiao, A.Y., Torisawa, Y.T., Tung, Y.C., Sud, S., Taichman, R.S., Pienta, K.J., and Takayama, S.,** 2009, Microfluidic system for formation of pc-3 prostate cancer co-culture spheroids., *Biomaterials*, 30 (16), 3020–27pp.
- Ishizawa, K., Rasheed, Z., Karisch, R., Wang, Q., Kowalski, J., Susky, E., Pereira, K.,** 2010, Tumor-initiating cells are rare in many human tumors, *Cell Stem Cell*, 7 (3), 279–82pp.
- Ito, M., Yang, Z., Andl, T., Cui, C., Kim, N., Millar, S.E., and Cotsarelis, G.,** 2007, Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding, *Nature*, 447 (7142), 316–20pp.
- Jakab, K., Neagu, A., Mironov, V., Markwald, R.R., and Forgacs, G.,** 2004, Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (9), 2864–69pp.
- Janardhanan, Sathyanarayana, Martha O Wang, and John P Fisher.** 2012. “Coculture Strategies in Bone Tissue Engineering: The Impact of Culture Conditions on Pluripotent Stem Cell Populations.” *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 18 (4): 312–21. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0681.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jemal, A., Bray, F., and Ferlay, J.**, 2011, Global cancer statistics, *A Cancer Journal for Clinicians*, 61 (2), 69–90pp.
- Joo, K.M., Kim, S.Y., Jin, X., Song, S.Y., Kong, D.S., Lee, J. Jeon, J.W., Kim, M.H., Kang, B.G., and Jung, Y.**, 2008, Clinical and biological implications of cd133-positive and cd133-negative cells in glioblastomas, *Laboratory Investigation*, 88 (8), 808–15pp.
- Jotzu, C., J., Alt, E., Welte, G., JBryan, J.L., Hennessy, T., Devarajan, E., Krishnappa, S., Pinilla, S., Droll, L., and Song, Y.H.**, 2009, adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors, *Analytical Cellular Pathology*, 33 (2), 61–79pp.
- Kaplan, R.N., Psaila, B., and Lyden, D.**, 2007, Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells, *Trends in Molecular Medicine*, 13 (2), 72–81p.
- Kelly, S.E., Di Benedetto, A., Greco, A., Howard, C.M., Sollars, V.E., Primerano, D., Valluri, J.V., and Claudio, P.P.**, 2010, Rapid selection and proliferation of cd133+ cells from cancer cell lines: chemotherapeutic implications, *PloS One* 5 (4).
- Kelm, J.M., and Fussenegger, M.**, 2010, Scaffold-free cell delivery for use in regenerative medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (7-8), 753–64pp.
- Kelm, J.M., Lorber, V., Snedeker, J.G., Schmidt, D., Broggini-Tenzer, A., Weisstanner, M., Odermatt, B., Mol, A., Zünd, G., and Hoerstrup, S.P.**, 2010., A novel concept for scaffold-free vessel tissue engineering: self-assembly of microtissue building blocks, *Journal of Biotechnology*, 148(1), 46–55pp.
- Kievit, F.M., Florczyk, S.J., Leung, M.C., Veiseh, O., Park, J.O., Disis, M.L., and Zhang, M.**, 2010, Chitosan–alginate 3d scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment, *Biomaterials*, 31 (22), 5903–10pp.
- Konur, A., Kreutz, M., Knüchel, R., Krause, S.W., and Andreessen. R.**, 1998, Cytokine repertoire during maturation of monocytes to macrophages within spheroids of malignant and non-malignant urothelial cell lines, *International Journal of Cancer*, 78 (5), 648–53pp.
- Kreso, A., and Dick. J. E.**, 2014, Review evolution of the cancer stem cell model.” *Cell Stem Cell*, 14, 275–91pp.
- Krueger, S., Kalinski, T., Wolf, H., Kellner, U., and Roessner, A.**, 2005, Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture—regulation of cathepsin b expression and invasiveness, *Cancer Letters*, 223:(2), 313–22pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kunz-Schughart, L.A., Freyer, J.P., Hofstaedter, F., and Ebner, R.,** 2004, "The use of 3-d cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model, *Journal of Biomolecular Screening*, 9 :(4), 273–85pp.
- Kunz-Schughart, L.A., Kreutz, M., and Knuechel, R.,** 1998, multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology, *International Journal of Experimental Pathology*, 79: (1),1–23pp.
- Langer, R., and Tirrell, D.A.,** 2004, Designing materials for biology and medicine." *Nature*, 428 (6982), 487–92pp.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E.,** 1994, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into scid mice, *Nature*, 367,645–48pp.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su,Q., NM Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., and Zhang, W.,** 2006, Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bfgf and egf more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines, *Cancer Cell*, 9 (5), 391–403pp.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.,** 1998, Genetic instabilities in human cancers, *Nature*, 396, 643–49pp.
- Levy, V., Lindon, C., Harfe, B.D., and Morgan, B.A.,** 2005, Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis." *Developmental Cell*, 9 (6), 855–61pp.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M.,** 2007, Identification of pancreatic cancer stem cells, *Cancer Research*, 67 (3), 1030–37pp.
- Li, J., Zhong, X.Y., u Li, Z.Y., Cai, J.F., Zou, L., Li, J.M., Yang, T., and Liu, W.,** 2013, CD133 expression in osteosarcoma and derivation of CD133+ cells, *Molecular Medicine Reports*, 7 (2), 577–84pp.
- Li, L., and Xie, T.,** 2005, Stem cell niche: structure and function." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 21, 605–31pp.
- Liu, B., Ma, W., Jha, R.K., and Gurung. K.,** 2011, Cancer stem cells in osteosarcoma: recent progress and perspective, *Acta Oncologica*, 50 (8), 1142–50pp.
- Loessner, D., Stok, K.S., Lutolf, M.P., Hutmacher, D.W., Clements, J.A., and Rizzi, S.C.,** 2010, Bioengineered 3D platform to explore cell–ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells." *Biomaterials*, 31(32), 8494–8506pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Luetke, A., Meyers, P., Lewis, I., and Juergens, H.,** 2014, Osteosarcoma treatment - where do we stand? a state of the art review, *Cancer Treatment Reviews*, 40 (4), 523–32pp.
- Maley, C.C., Galipeau, P.C., Finley, J.C., Wongsurawat, V.J., Li, X., Sanchez, C.A., Paulson, T.G., Blount, P.L., Risques, R.A., Rabinovitch, P.S. Reid, B.J.,** 2006, Genetic Clonal Diversity Predicts Progression to Esophageal Adenocarcinoma, *Nat Genet*, 38 (4), 468–73pp.
- Mannelli, G., and Gallo, O.,** 2012, Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers, *Cancer Treatment Reviews*, 38 (5), 515–39pp.
- Mattix, B.M., Olsen, T.R., Casco, M., Reese, L., Poole, J.T., Zhang, J., Visconti, R.P., Simionescu, A., Simionescu, D.T., Alexis, F.,** 2014, Janus magnetic cellular spheroids for vascular tissue engineering, *Biomaterials*, 35 (3), 949–60pp.
- Mattix, B., Olsen, T.R., Gu, Y., Casco, M., Herbst, A., Simionescu, D.T., Visconti, R.P., Kornev, K.G., and Alexis, F.,** 2014, Biological magnetic cellular spheroids as building blocks for tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 10, 623–29pp.
- Mavrogenis, A.F., Angelini, A., Vottis, C., Palmerini, E., Rimondi, E., Rossi, G., Pappagelopoulos, P.J., and Ruggieri, P.,** 2014, State-of-the-Art Approach for bone sarcomas, *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology: Orthopedie Traumatologie*, May. doi:10.1007/s00590-014-1468-2.
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A.,** 1990. “High gradient magnetic cell separation with MACS1, *Cytometry*, 238, 231–38pp.
- Mizuno, H.,** 2009. “Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review, *J Nippon Medical School*, 76 (2), 56–76pp.
- Mueller-Klieser, W.,** 1997, Three-Dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273 (4), 1109–23pp.
- Mutsaers, A.J., and Walkley, C.R.,** 2014, Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cell?, *Bone*, 62, 56–63pp.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S.,** 2008, Generation of induced pluripotent stem cells without myc from mouse and human fibroblasts, *Nat Biotech*, 26(1), 101–6pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Napolitano, A.P., Chai, P., Dean, D.M., and Morgan, J.,** 2007a. “Dynamics of the Self-Assembly of Complex Cellular Aggregates on Micromolded Nonadhesive Hydrogels.” *Tissue Engineering* 13 (8).
- Norotte, C., Marga, F.S., Niklason, L.E., and Forgacs, G.,** 2009, Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting, *Biomaterials*, 30 (30), 5910–17pp.
- O’Brien, C., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E.,** 2007, A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice, *Nature*, 445 (7123), 106–10pp.
- O’Connor, M.L., Xiang, D., Shigdar, S., Macdonald, J., Li, Y., Wang, T., Pu, C., Wang, Z., Qiao, L., and Duan, W.,** 2014, Cancer stem cells: a contentious hypothesis now moving forward, *Cancer Letters* 344(2), 180–87pp.
- Otsuka, H., Hirano, A., Nagasaki, Y., Okano, T., o Horiike, Y., and Kataoka. K.,** 2004, Two-dimensional multiarray formation of hepatocyte spheroids on a microfabricated peg-brush surface, *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 5 (6), 850–55pp.
- Ottaviani, G., and Jaffe, N.,** 2010, The epidemiology of osteosarcoma.” in pediatric and adolescent osteosarcoma, *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, 3–13pp.
- Oudar, O.,** 2000, Spheroids: relation between tumour and endothelial cells, *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 36(2), 99–106pp.
- Ozturk, S., Mehmet Ozgun Ozen, M.O., Müjde Kivanc. M., Vatansever, S., and Sendemir-Urkmez, A.,** 2013. “Comparison of in vitro three-dimensional (3d) microtissue forming potential of different cell types for regenerative medicine applications, XIX. International BIOMED Symposium, 85pp.
- Öztürk, Ş., Aydın, K.V., Karakuzu, B., ve Şendemir-Ürkmez, A.,** 2014, 3 boyutlu mikro-dokularda hücre lokalizasyon örüntüsünün incelenmesi, 18. Ulusal Biyomedikal Toplantısı; BIYOMUT, 1–4s.
- Paduch, R., and Niedziela, P.,** 2009, tgf- β 1 influence on tnfrs production and tnfrs shedding in a coculture of colon carcinoma cell spheroids with normal cells, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 45 (7), 371–77pp.
- Pece, S., Tosoni, D., Confalonieri, S., Mazzarol, G., Vecchi, M., Ronzoni, S., Bernard, L., Viale, G., Pelicci, P.G., and Di Fiore, P.P.,** 2010, Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content, *Cell*, 140, (1), 62–73pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Perkins, S.M., Shinohara, E.T., DeWees, T., and Frangoul, H.,** 2014, Outcome for children with metastatic solid tumors over the last four decades, *PloS One*, 9 (7): e100396.
- Pittenger, M.F., and Martin, B.J.,** 2004, Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circulation Research*, 95(1), 9–20pp.
- Rago, A.P., Napolitano, A.P., Dean, D.M., Chai, P.R., and Morgan. J.,** 2008, Miniaturization of an anoikis assay using non-adhesive micromolded hydrogels, *Cytotechnology*, 56 (2), 81–90pp.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman. I.L.,** 2001, Stem cells, cancer, and cancer stem cells, 414, 105–11pp.
- Rimann, M., Laternser, S., Gvozdenovic, A., Muff, R., Fuchs, B., Kelm, J.M., and Graf-Hausner. U.,** 2014, An in vitro osteosarcoma 3d microtissue model for drug development, *Journal of Biotechnology*, 189, 129–35pp.
- Rodan, S.B., Imai, Y., Thiede, M.A., Wesolowski, G., Thompson, D., Barshavit, Z., Shull, S., Mann, K., and Rodan, G.A.,** 1987, Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with Osteoblastic Properties, *Cancer Research*, 47, 4961–66pp.
- Sahin, E., and DePinho, R.A.,** 2010, Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing, *Nature*, 464(7288). 520–28pp.
- Santini, M.T., Rainaldi, G., Romano, R., Ferrante, A., Clemente, S., Motta, A., and Indovina, P.L.,** 2004, MG-63 human osteosarcoma cells grown in monolayer and as three-dimensional tumor spheroids present a different metabolic profile: A ¹H NMR Study, *FEBS Letters*, 557 (1-3), 148–54pp.
- Sawyers, C.L., Cory Abate-Shen, C., Kenneth C Anderson, K.C., Anna Barker, A., Jose Baselga, J., Nathan Berger, N., and Foti, M.,** 2013, AACR Cancer Progress Report 2013, *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19, S4–98pp.
- Seidl, P., Huettinger, R., Knuechel, R., and Kunz-Schughart L.A.,** 2002, Three-dimensional fibroblast–tumor cell interaction causes downregulation of RACK1 mRNA expression in breast cancer cells in vitro, *International Journal of Cancer*, 102 (2), 129–36pp.
- Shackleton, M.,** 2010, Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different, *Seminars in Cancer Biology*, 20(2), 85–92pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Shimizu, K., Ito, A., and Honda. H.,** 2007, Mag-Seeding of rat bone marrow stromal cells into porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104 (3), 171–77pp.
- Shmelkov, S.V., Butler, J.M., Hooper, A.T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., Clair, R.S., et al.** 2008, CD133 expression is not restricted to metastatic colon cancer cells initiate tumors, *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (6), 2111–20pp.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal. A.,** 2012, Cancer Statistics, 2012.” *Cancer Journal for Clinicians*, 62, 10-29pp.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., VBonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B.,** 2003, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.” *Cancer Research*, 63, 5821–28pp.
- Sipe, J.D.,** 2002, Tissue engineering and reparative medicine.” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961(1), 1–9pp.
- Sneddon, J.B., and Werb, Z.,** 2007, Location, location, location: the cancer stem cell niche, *Cell Stem Cell*, 1 (6), 607–11pp.
- Sommerfeldt, D.W., and Rubin, C.T.,** 2001, Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton, *European Spine Journal*, 86–95pp.
- Son, M.J., Woolard, K., Nam, D.H., Lee, J., and Fine, H.A.,** 2009, SSEA-1 Is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma, *Cell Stem Cell*, 4 (5), 440–52pp.
- Sutherland, R.M., Inch, W.R., McCredie, J.A., and Kruuv, J.,** 1970, A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model.” *International Journal of Radiation Biology*, 18 (5), 491–95pp.
- Szot, C.S., Buchanan, C.F., Gatenholm, P., Rylander, M.N., and Freeman, J.W.,** 2011, Investigation of cancer cell behavior on nanofibrous scaffolds.” *Materials Science and Engineering: C*, 31 (1), 37–42pp.
- Takahashi, K.,** 2007, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 131, 861–72pp.
- Tamari, K., Hayashi, K., Ishii, H., Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Fukusumi, T., and Hasegawa S.,** 2014, Identification of chemoradiation-resistant osteosarcoma stem cells using an imaging system for proteasome activity, *International Journal of Oncology*, 45 (6), 2349–54pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tan, B.T., Park, C.Y., Ailles, L.E., and Weissman, I.L.,** 2006, The cancer stem cell hypothesis: a work in progress.” laboratory investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology, 86(12), 1203–7pp.
- Tian, J., Li, X., Si, M., Liu, T., and Li. J.,** 2014, CD271+ osteosarcoma cells display stem-like properties, PloS One, 9(6), e98549.
- Tirino, V., Desiderio, V., d’Aquino, R., De Francesco, F., Pirozzi, G., Graziano, A., Galderisi, U., et al.** 2008, Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours, PloS One, 3(10), e3469.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., Fazioli, F., Pirozzi, G., and Papaccio, G.,** 2011, Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo, FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 25 (6), 2022–30pp.
- Torisawa, Y., Chueh, B., Huh, D., Ramamurthy, P., Roth, T.M., Barald, K.F., and Takayama. S.,** 2007, Efficient formation of uniform-sized embryoid bodies using a compartmentalized microchannel device, Lab on a Chip, 7 (6), 770–76pp.
- Tung, Y.C., Hsiao, Y.H., Allen, S.G. Torisawa, Y., Ho, M., and Takayama, S.,** 2011. “High-Throughput 3D Spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array, Analyst, 136 (3), 473–78pp.
- Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J.V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J.J., and Stassi, G.,** 2012, Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details, Nature Reviews Cancer, 12 (11), 767–75pp.
- Van Driel, M., and van Leeuwen, J.P.T.M.,** 2014. Cancer and Bone: A Complex Complex, Archives of Biochemistry and Biophysics, 561, 159–66pp.
- Visvader, J.E.,** 2011, Cells of origin in cancer, Nature, 469(7330), 314–22p.
- Wang, L., Park, P., and Lin, C.,** 2009, Characterization of stem cell attributes in human osteosarcoma cell lines, 543–52pp.
- Whatley, B.R, Li, X., Zhang, N., and Wen, X.,** 2014, magnetic-directed patterning of cell spheroids, Journal of Biomedical Materials Research. Part A, 102 (5), 1537–47pp.
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., and Bockamp, E.,** 2008, Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair, Cell, 135 (6), 1118–29pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Xu, F., and Burg, K.J.L** 2007, Three-dimensional polymeric systems for cancer cell studies, *Cytotechnology*, 54 (3), 135–43pp.
- Xu, M., Jin, H., Xu, C.X., Bi, W.Z., and Wang, Y.,** 2014, MiR-34c inhibits osteosarcoma metastasis and chemoresistance, *Medical Oncology*, 31(6), 972pp.
- Yamada, K.M., and Cukierman, E.,** 2007, Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D, *Cell*, 130 (4), 601–10pp.
- Yasko, A.W.,** 2010, Surgical Management of Primary Osteosarcoma, *Cancer Treatment and Research*, 6 , 152pp.
- Yılmaz, H.H., Yazıhan, N., Tunca, D., Sevinç, A., Olcayto E., Özgül, N., and Tuncer, M.,** 2011, Cancer Trends and incidence and mortality patterns in Turkey, *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 41(1), 10–16pp.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., et al.,** 2007, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, 318(5858), 1917–20pp.
- Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P., and Pestell. R.G.,** 2012. “Cancer stem cells, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44, 2144–51pp.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Daniel L Farkas, D.L., Keith L Black, K.L., and Yu J.S.,** 2004, Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme, *Oncogene*, 23(58), 9392–9400pp.
- Yuhas, J.M., Li, A.P., Martinez, A.O., and Ladman. A.J.,** 1977. “A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids, *Cancer Research*, 37 (10), 3639–43pp.
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M.W., Lai, H.C., Matei, D., Schilder, J.M., Yan, P.S., Huang, T.H.M., and Nephew, K.P.,** 2008, Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors, *Cancer Research*, 68 (11), 4311–20pp.
- Zou, Y., Cheng, C., Omura-Minamisawa, M., Kang, Y., Hara, T., Guan, X., and Inoue T.,** 2010, The suppression of hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor by siRNA does not affect the radiation sensitivity of multicellular tumor spheroids.” *Journal of Radiation Research*, 51(1), 47–55pp.