

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ KÖK HÜCRE HATTI ÜRETİMİ

SİBEL AZİZENUR ÖZTÜRK

**TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

İZMİR 2016

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970062

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ KÖK HÜCRE HATTI ÜRETİMİ

TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ

SİBEL AZİZENUR ÖZTÜRK

Danışman Öğretim Üyesi: PROF. DR. MEHMET ALİ ÖZCAN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2013.KB.SAG.030 no'lu proje ile desteklenmiştir

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970062

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı,
Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Şibel Azizenur ÖZTÜRK
‘KRONİK MYELOİD LÖSEMİ KÖK HÜCRE HATTI ÜRETİMİ’ konulu
Doktora tezini 15 Mart 2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü


Prof. Dr. Nur OLGUN

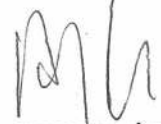
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü


Doç. Dr. Aydan ÇELEBİLER

ÜYE

İzmir Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı


Doç. Dr. Zekiye ALTUN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü

Prof. Dr. İlhan ÖZTOP

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü

Doç. Dr. A. Gülden DİNİZ ÜNLÜ

YEDEK ÜYE

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma
Hastanesi, Patoloji Bölümü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİLLER ve GRAFİKLER	iv
TABLolar	vi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Kronik Myeloid Lösemi	7
2.1.1. Tanımı, Etiyoloji ve Epidemiyoloji	7
2.1.2. Patogenez ve Moleküler Mekanizması	7
2.1.3. Klinik	12
2.1.4. Tanı	13
2.1.5. Tedavi	13
2.2. Kanser Kök Hücreleri.....	15
2.2.1. Lösemik Kök Hücreleri.....	15
2.2.2. Tarihçe.....	16
2.2.3. Heterojenite Modelleri	17
2.2.4. KKH'lerin Kökeni.....	19
2.2.2. KKH'lerin Özellikleri	20
<i>2.2.2.1. Yüzey Belirteçleri.....</i>	<i>21</i>
<i>2.2.2.2. İlaç Direnci.....</i>	<i>22</i>
<i>2.2.2.3. Sinyal Yolaklar</i>	<i>23</i>
<i>2.2.2.4. Mikroçevresi.....</i>	<i>25</i>
2.3. Kök Hücre İzolasyon Yöntemleri.....	26
<i>2.3.1. Akım Sitometrik Analiz ile Hücre İzolasyonu.....</i>	<i>27</i>
<i>2.3.2. Manyetik Boncuklar ile Hücre İzolasyonu</i>	<i>29</i>
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	31
3.1. Araştırmanın Tipi.....	31

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	31
3.3. Araştırmanın Evreni ve Çalışma Grupları	31
3.4. Çalışma Materyali	31
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	32
3.6. Veri Toplama Araçları.....	32
3.6.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	32
3.6.1.1. Kullanılan Cihazlar	32
3.6.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri	33
3.6.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.6.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması	34
3.6.2.1. RPMI-1640 Besiyerlerinin Hazırlanması	34
3.6.2.2. Diferansiye Edici Besiyerinin Hazırlanması	34
3.6.2.3. Diferansiye Etmeyen Besiyerinin Hazırlanması.....	35
3.6.2.4. Lösemik Kök Hücre Ekspanse Edici Besiyerinin Hazırlanması.....	35
3.6.2.5. Alkalen Fosfataz Deneyi için %4'lük Fikzatif Hazırlanması	35
3.6.2.6. Manyetik Hücre Ayırma Deneyi için İzolasyon Tamponu Hazırlama.....	35
3.6.2.7. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) Hazırlama.....	35
3.6.3. Hücre Kültürü	35
3.6.3.1. Hücrelerinin Pasajlanması.....	35
3.6.3.2. Hücrelerin Dondurulması	36
3.6.3.3. Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi	37
3.6.3.4. Hücrelerin Sayımı ve Hücre Canlılık Testi	37
3.6.3.5. Hücre Kültüründe Mikoplazma Kontaminasyonunun Aranması.....	38
3.6.4. Akım Sitometrik Analiz	39
3.6.4.1. CD Paneli Analizi.....	39
3.6.4.2. Hücre Siklus Analizi	39
3.6.5. Akım Sitometri ile Hücre Ayırma Metodu.....	41
3.6.6. Manyetik Partiküller ile Hücre Ayırma Metodu	42
3.6.6.1. Negatif Seçim Yöntemi.....	42
3.6.6.2. Pozitif Seçim Yöntemi	43
3.6.7. Alkalen Fosfataz Boyaması.....	45
3.6.8. Telomeraz ve BCR/ABL Gen İfadelerinin Analizi.....	45
3.6.8.1. Hücre Kültüründen Total RNA Eldesi	45

3.6.8.2. <i>Komplementer DNA (cDNA) Sentezi</i>	46
3.6.8.3. <i>Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı</i>	47
3.6.8.4. <i>Gen İfadelerinin Real Time PCR ile Bakılması</i>	47
3.6.8.5. <i>Light Cycler (LC) Deney Programı</i>	47
3.6.9. T���rojenite Deneyi	48
3.7. Araştırma Planı	49
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	51
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	51
3.10. Etik Kurul Onayı	51
4. BULGULAR	52
4.1. FACS ve MACS Yöntemlerin Karşılaştırılması	52
4.2. Hücre Siklus Analizi.....	55
4.3. K562 ve K562/IMA-3 Lösemik Kök Hücre Kültürleri	56
4.4. CD Paneli.....	58
4.5. T���rojenite Deneyi.....	60
4.6. Kantitatif Real Time PCR Deneyi.....	60
4.6.1. <i>BCR-ABL mRNA Miktarının ��l��lmesi</i>	60
4.6.1. <i>Telomeraz mRNA Miktarının ��l��lmesi</i>	61
4.7. Alkalen Fosfataz Deneyi.....	62
4.8. Mikoplazma Kontaminasyon Varlığının Gösterilmesi	63
5.TARTIşMA	64
5. SONUÇ ve ��NER��LER	74
6.KAYNAKLAR	75
7.EKLER	83
7.1. EK 1	83
7.2. EK 2	84
7.3. EK 3	85
7.4. ��ZGE��M��ř	86

ŞEKİL ve GRAFİKLE

Sayfa

Şekil 1: Philadelphia kromozomu	8
Şekil 2: BCR ve ABL genlerinin kırılma noktaları.....	9
Şekil 3: BCR/ABL proteinin sinyal ileti yollarına etkisi	11
Şekil 4: Kronik myeloid lösemnin klinik evrelerinin şematik gösterimi.....	12
Şekil 5: İmatinib Mesilat'ın etki mekanizması	14
Şekil 6: Kronik myeloid lösemide direnç mekanizmaları.....	15
Şekil 7: Kemik iliğinde diğr hücre serileride Kronik myeloid lösemi oluşumu	16
Şekil 8: (A) KKH ve (B) Klonal Evrim Modelleri	18
Şekil 9: KKH ve Klonal Evrim Modellerinin birlikteliğı	19
Şekil 10: Kök hücrelerinin kökenine yönelik hipotezler.....	20
Şekil 11: Kansr kök hücrelerinde etkili olan sinyal yolları	23
Şekil 12: Kansr kök hücre sinyal iletim yolları	25
Şekil 13: Lösemik kök hücre regölasyonu ve mikroçevre.....	26
Şekil 14: Floresanla aktive edilmiş hücre ayırşma (FACS) işlemin	28
Şekil 15: Manyetik olarak aktive edilen hücre ayırım (MACS) sisteminin şeması.....	30
Şekil 16: Flow Sitometri Hücre Siklus analizinin histogram görüntüsü.....	40
Şekil 17: Manyetik partiküller ile ayırımında kullanılan magnet	42
Şekil 18: Projenin genel akış şeması.....	50
Şekil 19: K562 hücrelerinin FACS sonuçları.....	52
Şekil 20: K562/IMA-3 hücrelerinin FACS sonuçları	52
Şekil 21: K562 hücrelerinin MACS sonrası yapılan Flow sitometri sonuçlar.....	53
Şekil 22: K562/IMA-3 hücrelerinin MACS sonrası yapılan Flow sitometri sonuçları.....	53

Şekil 23: K562 ve K562/IMA-3 hücre hatlarından izole edilen CD34+ lösemik kök hücrelerinin FACS ve MACS yöntemlerine göre % oranlarının grafiği.....	54
Şekil 24: K562 ve K562/IMA-3 hücre hatlarından izole edilen CD34+/CD38-/CD123+ lösemik kök hücrelerinin FACS ve MACS yöntemlerine göre % oranlarının grafiği.....	55
Şekil 25: Sırasıyla, K562 CD34- ve CD34+ hücrelerin histogramları.....	55
Şekil 26: Sırasıyla, K562/IMA-3 CD34- ve CD34+ hücrelerin histogramları.....	56
Şekil 27: Sırasıyla, K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin RPMI-1640 kültür ortamındaki morfolojik görüntüsü (10X).....	56
Şekil 28: Sırasıyla, K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin diferansiye edici kültür ortamındaki morfolojik görüntüsü (10X)	57
Şekil 29: Sırasıyla, (10X) K562 ve (20X) K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin diferansiye etmeyen kültür ortamındaki morfolojik görüntüsü.....	57
Şekil 30: Sırasıyla, K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin lösemik kök hücre ekspanse edici kültür ortamındaki morfolojik görüntüsü (10X)	58
Şekil 31: K562 ve K562/IMA-3; K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücreleri; K562 ve K562/IMA-3 diferansiye olmuş lösemik kök hücrelerinin toplu CD paneli	59
Şekil 32: Sırasıyla, K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin immün defisit-NUDE farelere xenotransplantasyonu. Farelerin ense kısmındaki tümör, yaklaşık 2-3 hafta içinde gelişmiştir	60
Şekil 33: K562 ve K562/IMA-3; K562 kök ve K562/IMA-3 kök hücrelerinde translokasyon varlığını gösteren BCR-ABL mRNA miktar tayini.....	61
Şekil 34: K562 ve K562/IMA-3; K562 kök ve K562/IMA-3 kök lösemik hücrelerinde Telomeraz mRNA miktar tayini	61
Şekil 35: Alkalen Fosfataz boyama ile K562 lösemik hücrelerin görünüşü.....	62
Şekil 36: Alkalen Fosfataz boyama ile K562 lösemik kök hücrelerin görünüşü.....	62
Şekil 37: Alkalen Fosfataz boyama ile K562/IMA-3 lösemik hücrelerin görünüşü.....	63
Şekil 38: Alkalen Fosfataz boyama ile K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerin görünüşü.....	63

TABLÖLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo1: Kanser kök hücrelerinin hücre yüzey fenotipleri	22
Tablo 2: RT-PCR tepkime karışımı	47
Tablo 3: Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program	47
Tablo 4: Real-Time PCR tepkime karışımı	47
Tablo 5: Telomeraz ve BCR-ABL genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı	48

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

BCR/ABL	: Breakpoint Cluster Region / ABelson murine Leukemia virus
CD	: Cluster of differentiation
DPI	: DNA Ploidy İndeksi
FACS	: Floresans ile aktive hücre ayırma (= Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FSC	: İleri saçılım kanal dedektörü
HKH	: Hematopoetik kök hücre
HPH	: Hematopoetik projenitör hücre
LKH	: Lösemik kök hücre
kD	: Kilo dalton
KKH	: Kanser kök hücresi
KML	: Kronik miyeloid lösemi
LKH	: Lösemik kök hücre
MACS	: Manyetik aktive edilen hücre ayırımı (= Magnetic-Activated Cell Sorting)
NOD/SCID	: Non Obese Diabetic:NOD / Severe Combined Immune-Deficient: SCID
PCR	: Polimeraz zincir tepkimesi (Polymerase Chain Reaction)
Ph	: Philadelphia kromozomu
SSC	:Yana saçılım kanal dedektörü

TEŞEKKÜR

Tüm doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince mesleki bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve doktoramın her aşamasında olumlu desteğini, yardımlarını ve dostluğunu benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın tüm aşamalarında bilgi ve deneyimini benimle paylaşan, desteğini, yardımlarını ve dostluğunu benden esirgemeyen, mesleki bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yetişmemde büyük emeği olan ve manevi danışman hocam olarak kabul ettiğim Sayın Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda hücre hatlarını bize temin ederek tezime büyük katkıda bulunan ve desteğini, tecrübesini ve dostluğunu esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yusuf BARAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Yine tezimin pratik çalışmalarındaki her türlü emeği ve yardımlarından dolayı Araştırma Görevlisi Sayın Dr. Ayşe Pınar ERÇETİN ve doktora öğrencisi Sayın Duygu DURSUN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince mesleki bilgi, tecrübelerinden yararlandığım, her türlü yardım ve desteklerinden dolayı, başta Enstitü Müdürü Sayın Prof. Dr. Nur OLGUN olmak üzere tüm Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsünün değerli öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tüm enstitü yüksek lisans öğrencilerine manevi destek ve her türlü yardımlarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ve tüm hayatım boyunca sevgi ve destekleriyle hep yanımda olan, bütün eğitim süresi boyunca maddi, manevi yardımlarını benden esirgemeyerek bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem Sayın Bilge ÖZTÜRK'e ve sevgili babam Sayın Murat ÖZTÜRK'e gösterdikleri anlayış, özveri ve sabırlarından dolayı sonsuz şükranlarımı sunarım.

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ KÖK HÜCRE HATTI ÜRETİMİ

Dr. Sibel Azizenur Öztürk

Yazışma Adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji
Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZET

Amaç: BCR/ABL füzyon proteiniyle karakterize Kronik myeloid lösemi (KML), pluripotent hematopoetik kök hücrelerin malign transformasyonu sonucu gelişen klonal bir lösemi kök hücre (LKH) hastalığıdır. Bu projenin amacı, KML LKH'lerinin kültür ortamında birçok tümör serilerine farklılaşma mekanizmalarına karşı kuvvetli bir protokol geliştirerek gelecekteki çalışmalar için uygun kalite ve standartlarda in-vitro KML LKH hattı üretimidir.

Yöntem: Bu çalışmada, K562 ve K562/IMA-3 (imatinibe dirençli) insan KML hücrelerinde, FACS ve MACS yöntemleriyle CD34+/CD38-/CD123+ and CD34+/CD38- LKH altpopülasyonlarının izolasyonu sonrasında LKH'lerin davranışları, farklı kültür şartlarına maruz bırakılarak gözlemlendi. LKH'leri, akış sitometriyle hücre siklusu; tümörojeniteyle tümör oluşturma potansiyeli; kantitatif gerçek-zamanlı PCR'la telomeraz aktivitesinin ve BCR/ABL'ın ekspresyon düzeyleri; alkalen fosfataz (AF) boyamayla farklılaşma; ve mikoplazma testiyle kontaminasyon varlığı incelenmiştir. Ayrıca, CD paneli (CD34+, CD38+, CD34+/CD38-, CD34+/CD38/CD123+ altpopülasyonları), KML hücrelerinde, LKH'lerinde ve farklılaşmış LKH'lerinde akış sitometriyle incelenmiştir.

Bulgular: K562 ve K562/IMA-3 lösemi hücrelerinin, sırasıyla % 0,4 ve % 5,3 oranlarında LKH'leri içerdiklerini bulduk. Diferansiye etmeyen ortamda LKH'lerin çoğalmaksızın fenotipini koruduğu ve LKH ekspanse edici ortamda LKH'lerin çoğunluğunun LKH olarak çoğaldığı gözlemlendi. Bununla beraber, diferansiye edici ve RPMI-1640 ortamlarında LKH'lerinin, lösemi hücrelerine dönüşerek çoğaldığı gözlemlendi. K562/IMA-3

LKH'lerinin daha hızlı tümör oluşumuna neden olmasının yanı sıra, her iki hücre hattının LKH'leri, atimik nude farelerde tümör oluşturdu. Her iki hücre hattının LKH'lerinde AF pozitif bulundu. Telomeraz aktivitesi ekspresyon düzeyi, K562/IMA-3 LKH'lerinde artmış bulunurken, K562 LKH'lerinde azalmış bulundu. BCR-ABL ekspresyon düzeyi her iki hücre hattının LKH'lerinde azalmış olmakla birlikte korunmuştur. LKH'lerde mikoplazma kontaminasyonu görülmedi. CD panelinde tüm popülasyonların en yüksek seviyeleri, LKH'lerinde görüldü.

Sonuç: Bu çalışma sonucunda KML LKH hattı üretiminin zor, ama olası olduğu saptandı.

Anahtar sözcükler: Kronik myeloid lösemi, Lösemi kök hücre, Hücre hattı

CHRONIC MYELOID LEUKEMIA STEM CELL LINE PRODUCTION

ABSTRACT

Objective: Chronic myeloid leukemia (CML), characterized with BCR/ABL fusion protein is a clonal leukemia stem cell (LSC) disorder developing as a result of malignant transformation of pluripotent hematopoietic stem cells. The aim of this project is to produce in vitro CML LSC line in appropriate quality and standards for future work by developing a strong protocol against the differentiation mechanism to many tumors series of its in culture medium of CML LSC.

Method: In this study, behaviors of LSCs were observed by exposure to different culture conditions after isolation of LSC subpopulations of CD34+/CD38-/CD123+ and CD34+/CD38- by FACS and MACS methods in K562 and K562/IMA-3 (imatinib-resistant) human CML cells. LSCs were analyzed cell cycle by flow cytometry; potential of forming tumor by tumorigenicity; expression levels of telomerase activity and BCR/ABL by quantitative real-time PCR; differentiation by alkaline phosphatase (AF) staining; and presence of contamination by mycoplasma test. Also, CD panel (subpopulations of CD34+, CD38+, CD34+/CD38- and CD34+/CD38-/CD123+) were analyzed by flow cytometry in CML cells, LSCs and differentiated LSCs.

Results: We found that K562 and K562/IMA-3 cells contained LSCs in 0,4% and 5,3% ratios, respectively. It was observed that LSCs maintained the phenotype without proliferation in dedifferentiated medium, and that the majority of LSCs proliferated as LSCs in LSC expanded medium. However, it was observed that LSCs proliferated by transforming into leukemia cells in mediums of differentiated and RPMI-1640. In athymic nude mice, LSCs of both cell lines generated tumor as well as causing to faster tumorigenicity of K562/IMA-3 LSCs. It was found AP positive in LSCs of both cell lines. Expression level of telomerase activity was found to increased in K562/IMA-3 LSCs, while to decreased in K562 LSCs.

BCR/ABL expression level was maintained although decreased in LSCs of both cell lines. Mycoplasma contamination was not seen in LSCs. The highest levels of all populations in CD panel were seen in LSCs.

Conclusion: In result of this study, the production of CML LSC line was found to be possible, but to be difficult.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, Leukemia stem cell, Cell line



1.GİRİŞ ve AMAC

Kronik myeloid lösemi (KML), diferansiyasyonun her basamağındaki myeloid elemanların proliferasyonu, adhezif özelliklerinin kaybı, apoptozun azalması ve özgül kromozomal defekt olan t(9:22) resiprokal translokasyonu sonucu BCR/ABL onkoproteininin varlığı ile karakterize, klonal bir hematopoetik kök hücre (HKH) malignitesidir (1, 2). KML, onkolojide kromozomal anomali ile ilişkilendirilerek tanımlanan ilk kanser modelidir (3). KML tedavisinde allojenik HKH nakli, KML hastalarının tedavisinde tek küratif yaklaşım olarak kabul edilmektedir, ancak tedavi için uygun donör bulunmasında zorluklar yaşanmaktadır (4, 5). Son yıllarda hedefe yönelik tedavi olan imatinib mesilat (Glivec, Gleevec, STI571)'ın keşfi, önemli ölçüde sağkalımın iyileştirilmesi nedeniyle KML yönetiminde bir devrim niteliğindedir. Bununla beraber bu ve buna benzer ilaçlara karşı en önemli engel, tedaviye karşı primer ya da sekonder gelişen dirençlerdir (6, 7). Bu direncin, BCR/ABL bağımlı ya da bağımsız ek mutasyonlardan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (8, 9). Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu kanserin başlaması ve ilerlemesinden sorumlu tutulan ve tümör dokusunda çok sayıdaki farklılaşmış hücre topluluğunu oluşturan lösemik kök hücre (LKH)'lerinin, tedavilere gelişen direnç ve nükslerden sorumlu olduğu düşünülmektedir (10, 11). Bu sebeple, kan ve kemik iliğinde ilkel hücrelerin birikmesi ile sonuçlanan direnç problemini aşmak için hala pek çok çalışmalar yürütülmekle birlikte, kanser relapsını efektif olarak önleyebilecek tedavilerin geliştirilebilmesi için araştırmalar, kanser kök hücre (KKH)'leri üzerinde yoğunlaşmaktadır (12, 13).

KKH'lerinin oluşma ve kanser oluşturma mekanizmaları ve multimodal tedavi stratejilerinde hedef alınmaları güncel bilimsel konulardan birisidir. Şimdiki kansere karşı terapötik stratejiler, sıklıkla tedavi başarısızlığına yol açan ciddi sınırlamalara sahiptir. Birçok malignensilerdeki tedavi başarısızlığının yaygın bir nedeni, kemoterapi ve radyoterapiye dirençdir. İlaveten, KKH'lerine karşı yeterli ölçüde seçici olmayan birçok stratejinin sağlıklı dokulara toksik olabilmesi ve birçok tedavinin KKH'lerini elimine etmemesi nedeniyle, hastalar nüks ve metastaz riski ile karşı karşıya gelmektedir. Bu nedenle KKH'lerinin eliminasyonu, malign hastalıkların tedavisinde çok önemlidir (14, 15, 16).

KML'de LKH'ler normal hematopoezde olduğu gibi kendini yenileyebilmekte ve olgunlaşmış hematopoetik hücreleri oluşturabilen ilgili progenitor hücrelere diferansiye

olabilmektedir. Bu yakın benzerlik yüzey belirteçlerinde de olduğu için KML kök hücrelerini *in vitro* ortamda incelemek, HKH'lerle ayırmadaki güçlük nedeniyle zor olmaktadır (17, 18, 19). Ayrıca kanser hücre ve KKH hattının ülkemizde üretim ve pazarlaması yoktur. Bu konuda dışa bağımlılık söz konusudur ve ulaşılabilen kaynaklarda KML kök hücre hattı bulunmamaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada, hem imatinib duyarlı hem de imatinib dirençli KML hücre hatlarından izole edilen LKH'lerinin, kültür ortamında birçok tümör serilerine farklılaşma mekanizmasına karşı güçlü bir protokol geliştirerek, gelecekteki çalışmalar için uygun kalite ve standartlarda *in vitro* olarak KML kök hücre hattı üretilmesi amaçlanmıştır. Böylece hematolojik onkolojide tedavi sorunları yaşanan çok önemli bir hastalık grubunda yeni ilaç ve tedavi seçenekleri geliştirmek için önemli bir biyolojik materyal eldesinin sağlanması ile birlikte, *in vitro* KKH hattı ile yapılacak araştırmaların devamı olarak hayvan deneyleri ve faz çalışmalarına da geçilebilecektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Myeloid Lösemi:

2.1.1. Tanım, Etyoloji ve Epidemiyoloji

KML, pluripotent HKH'de gelişen malign transformasyon sonucu, kötü huylu gelişim gösteren klonal bir bozukluktur. Değişikliğe uğrayan kök hücreler, normal hematopoezin yerine geçen ve total myeloid kitlenin büyük miktarda artmasına neden olan bir diferensiyel hücre popülasyonunu oluşturur (9, 10, 20).

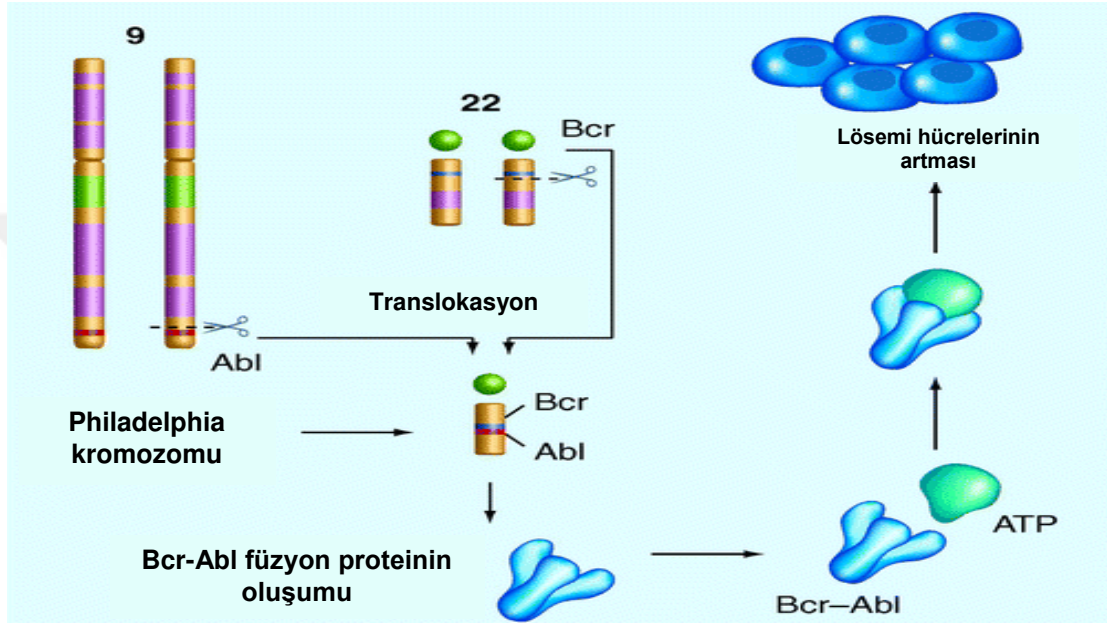
KML myeloproliferatif hastalıkların en sık görülenidir. İnsidansı yılda 1-2/100.000 olup, tüm erişkin lösemilerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (20-22). Her yaşta görülmekle birlikte, insidansı yaş ilerledikçe belirgin olarak artmakta ve hastalara sıklıkla 5. ve 6. dekatlarda tanı konulmaktadır. Hastalık erkeklerde kadınlara kıyasla (1,5/1) hafifçe daha fazla görülme eğilimindedir (20-23). Çok yüksek doz iyonizan radyasyona maruz kalma bilinen tek risk faktörüdür (24) ve normal popülasyona kıyasla KML görülme sıklığını arttırabilmektedir (20, 22).

2.1.2.Patogenez ve Moleküler Mekanizması

KML, HKH'de kazanılmış bir genetik değişiklik sonucu, özgün sitogenetik bozukluk ile ilişkisi tespit edilen ilk malign hastalıktır (20-22). İlk defa 1960 yılında, Peter Nowel ve David Hungerford tarafından KML'li hastalarda anormal bir kromozom olarak tanımlanmıştır. Bu kromozom, insanda kanser ilişkili ilk kromozomal bozukluk olup, bulunduğu şehrin adına istinaden Philadelphia kromozomu (Ph) olarak anılmaya başlanmıştır (Şekil 1) (25).

1980'lerde Ph kromozomunun, 9. kromozomun q34 bandına yerleşik ABL geninin, 22. kromozomun q11 bandındaki BCR genine t(9;22) resiprokal translokasyonu sonucu, BCR/ABL füzyon geninin oluşumu ile ortaya çıktığı ispatlanmıştır (Şekil 1). 1984'te farklı KML hastalarında kromozom 22'deki genomik kırılma noktalarının nispeten küçük (5.8 kb) bir bölgede kümeleşmiş olduğu bulundu ve bu bölgeye 'kırılma noktaların küme bölgesi' (Breakpoint Cluster Region) (BCR) adı verildi. ABL geni, ABelsan murine Leukemia virus tarafından taşınan *v-abl* onkogenin insandaki eşdeğeri ve bir nonreseptör tirozin kinaz

kodlar. Hastaların %10'unda Ph kromozomu dışında ilaveten iki farklı kromozomu kapsayan kompleks translokasyonlar görülür. Bunlar; t(5;12) (q33;p13) TEL-PDGFRB ve t(8;13) (p11;q12) ZNF198-FGFR1'dir. Her iki translokasyonun oluşturduğu füzyon proteinlerinin bir kısmı reseptör tirozin kinaz kodlamaktadır. Bu translokasyonlar BCR-ABL onkoproteini tarafından aktive edilen yollara benzeyen sinyal iletim yollarını aktive ederek KML gelişmesine neden olurlar (8, 26-28).

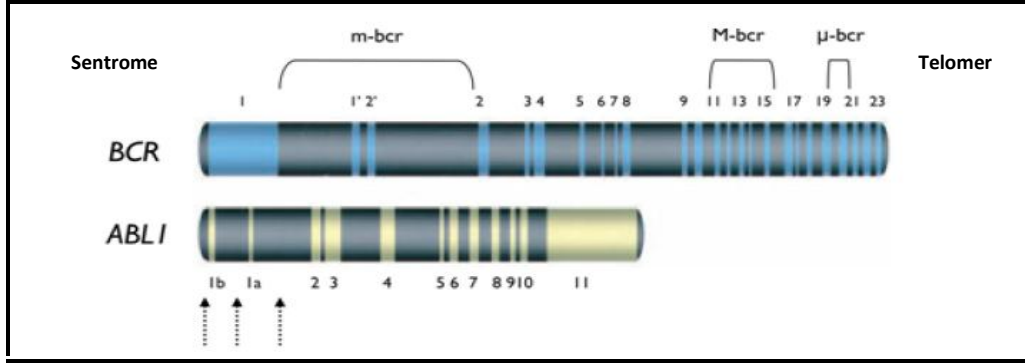


Şekil 1: Philadelphia kromozomu (www.medscape.com/ Expert Rev Anticancer Ther/ 2008).

ABL, 145 kD ağırlığında, bir non-reseptör tirozin kinazdır ve birçok dokuda ifade edilmektedir. Hücre içerisinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte yer alan ABL, iki kompartman arasında etkileşim içerisinde ve integrin sinyal iletim yolları sayesinde hücre çevre hakkında bilgi aktarımında görev alır (8, 27-29). Normalde ABL proteini, çeşitli hücre içi ve dışı sinyallere göre hareket ederek, hücre döngüsünü, hücre bağlanmasını, programlı hücre ölümlerini, hücrenin büyüme ve çoğalmasını, ayrıca hücrelerin stres ortamına verdiği yanıtı kontrol eder (8, 27-30). Normal fizyolojik şartlarda sıkı bir şekilde kontrol edilen ABL'ın SH3 alanı, proteinin aktivitesinin engellenmesinde önemli rol oynar (27). SH3 alanının delesyonu veya değişimi tirozin kinazı aktif hale getirmekte, interaktör protein 1 ve 2 (Abi-1 ve Abi-2) ise, SH3 alanlarının inhibitör fonksiyonlarını aktive etmektedir (27-29).

BCR ise, 160 kD ağırlığında multipl modüler alanlar içeren bir sinyal proteinidir (31). ABL geninin aksine, BCR geni üzerindeki kırılmalar farklı noktalarda oluşabilir (8, 31, 32).

Kırılma noktasının ABL’de sabit BCR’de değişken olması; ABL geninin sağlıklı hücreleri değişime uğratarak kanser hücresine dönüşümünü sağladığını, BCR geninin ise hastalığın fenotipini etkilediğini göstermektedir (Şekil 2) (8, 28, 31,32).



Şekil 2: BCR ve ABL genlerinin kırılma noktaları (32).

Yeni oluşan bu kimerik gen, 210 kDa (p210) molekül ağırlığında KML’de lösemik fenotipin gelişmesinden sorumlu bir protein (BCR/ABL) kodlar (8, 28). Sürekli aktif olan bu protein, otofosforilasyon neticesinde kendi üzerinde, diğer proteinlerin SH2 alanları için bağlanma bölgesi yaratmakta ve çeşitli substratlar, tirozin noktasından fosforlanabilmektedir (8, 28). BCR/ABL proteini, hücrede, büyüme, çoğalma, farklılaşma, maturasyon ve apoptoz ile ilgili pek çok sinyal yollarının devamlı aktivasyonunu sağlamakta, normal hücre siklusunun kontrolünün bozulmasına neden olmakta ve hücrelerin malign dönüşümüne yol açmaktadır (8, 28, 29, 33). Bu durum ise normal olmayan kendi kendini yenileme ve diferansiye olma yeteneklerinin ve apoptoza direnç gelişiminin kazanılması nedeniyle, Ph-pozitif hücre klonunun hayatta kalım ve çoğalma avantajlarını sağlamaktadır (1-3, 8, 33).

BCR/ABL füzyon proteini tarafından gerçekleştirilen malign dönüşümün 4 temel mekanizması vardır (8, 27, 28). Bu mekanizmalar; stromal hücrelere ve ekstrasellüler matrikse bağlanmanın azalması, proliferasyonun sürekli aktif tutulması, apoptozun engellenmesi ve ABL gen aktivitesinin engellenmesinin inhibisyonudur (21, 26, 27, 29, 31).

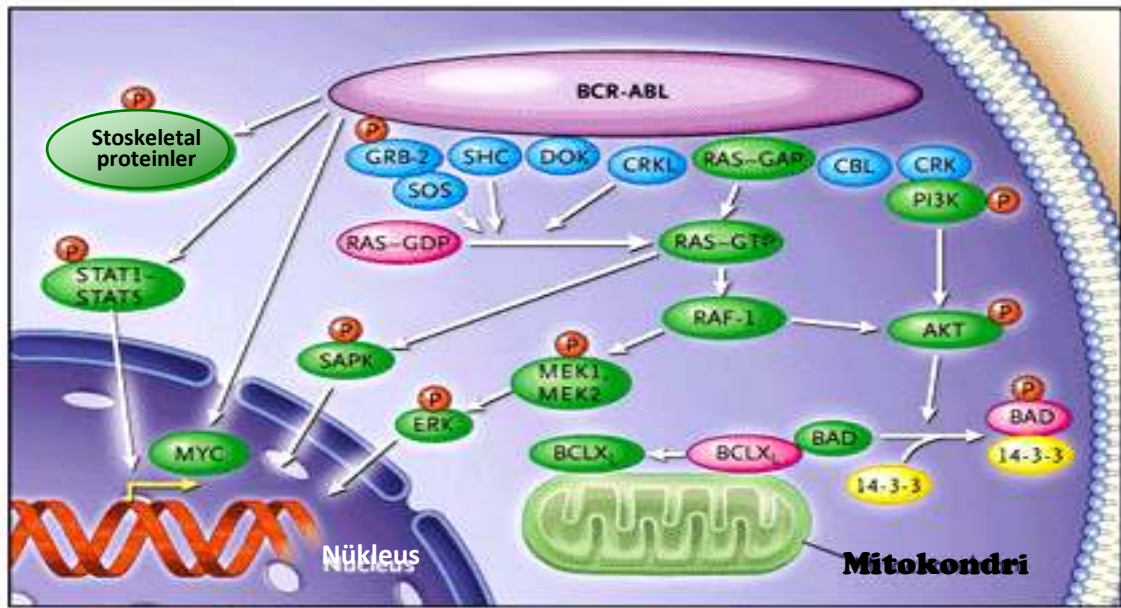
HKH’lerin çoğalması, kemik iliği stromal hücreleri ve integrinler aracılığıyla hücre dışından hücre içine sinyal iletiminin başlatılması ile düzenlenmektedir (21, 27). Yapılan çalışmalar, BCR/ABLproteinin HKH’lerde bulunmayan ve bağlanmayı engelleyebilen bir integrin varyantını ifade ettiğini, bunun sonucu olarak HKH’lerin kemik iliği stromal hücrelerine ve ekstrasellüler matrikse bağlanma düşüklüğü nedeniyle serbestleştiğini

bildirmektedir (8, 28 31). Böylece çoğalmanın negatif kontrolünde önemli olan hücre-hücre etkileşiminin olmadığı ve çoğalma inhibisyonunu ileten sinyal transferinin bozulduğu bildirilmektedir (27, 28, 31, 34).

BCR/ABL geninin oluşumu sırasında ABL'in SH2 domaininin BCR'ın N terminaline bağlanması ile BCR geninin N terminalinin kaybı, füzyon proteinde, artmış sürekli tirozin kinaz aktivitesine yol açar. BCR/ABL füzyon proteinin onkogenik aktivitesi ise transformasyona yol açan çeşitli sinyal treonin yollarını aktif hale getirerek ortaya çıkar (27, 29, 30, 32).

BCR/ABL, STAT1 ve STAT5 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu direkt ve sürekli olarak sağlar. BCR/ABL tarafından değişime uğratılmış hücrelerde STAT5 aktivasyonu, bir antiapoptotik protein olan Bcl-xL ifade edilmesini artırır (25). BCR/ABL proteini tarafından aktif hale getirilen Ras ve Jak/STAT yolları ise, hücrelerin büyüme faktörüne bağımlılığını inhibe eder (Şekil 3). Ayrıca BCR/ABL proteininin, sitokinlerin yanı sıra büyüme faktörlerinin ifade edilmesini de tetiklediği bildirilmektedir. Bazı deneysel çalışmalarda, büyüme faktörü sekresyonu üzerinde, BCR/ABL'ın tetiklediği otokrin döngünün etkili olduğu bildirilmektedir. Çalışmalar, BCR/ABL'ın erken öncül hücrelerde, interlökin (IL)-3 ve granülosit koloni stimulan faktör otokrin döngüsünü tetiklediğini göstermiştir (8, 27-30).

Ayrıca IL-3 sitokin reseptörü α subunitinin (CD123) stimülasyonu ve BCR/ABL proteinine SH2, SH3 alanlarından bağlanan Shc ve Crk1 adaptör proteinleri Ras'ın, dolayısıyla serin-treonin Raf'ın aktivasyonunu sağlar. Raf, Mek1/Mek2 ve Erk serin-treonin kinazlar ile aktif hale gelen sinyal ileti yolları, gen transkripsiyonlarını aktif kılar (Şekil 3). Öte yandan, PI-3 kinaz enzim aktivitesi, BCR/ABL-pozitif hücrelerin çoğalması için gereklidir ve BCR/ABL proteini çeşitli adaptör moleküllerle kompleks oluşturarak PI-3 kinazı, dolayısıyla serin-treonin kinaz olan Akt'ı aktif kılar (Şekil 3). Akt ise IL-3 reseptörün (CD123) hedef molekülüdür. Etkili bir transkripsiyon faktörü olan Myc geninin aşırı aktivasyonu, BCR/ABL geninin SH2 domeini tarafından sağlanarak, kontrol edilmektedir. BCR/ABL tarafından üretilen sinyaller, Ras/Raf, siklin bağımlı kinazlar ve E2f transkripsiyon faktörleri yolu ile Myc gen promotorunun aktif hale gelmesine, bu da, hücrenin büyüme ve çoğalma yönünde ilerlemesine neden olmaktadır (Şekil 3) (8, 27-30, 35).



Ras onkogeninin aktif hale getirilmesi ile büyüme faktörleri eksikliğinden kaynaklanan apoptozun engellendiği gösterilmiştir. Öte yandan, BCR/ABL-pozitif hücre hatlarında DNA’da oluşan zararlardan kaynaklanan apoptoza karşı direnç geliştirildiği gösterilmiştir (21, 26). BCR/ABL füzyon proteini, Bcl-2 gen ekspresyonunu Ras ve/veya PI-3 kinaz yolu ile, Bcl-xL gen ekspresyonunu ise STAT-5 yolu ile kontrol eder (Şekil 3). Bunun yanı sıra BCR/ABL, mitokondriden sitokrom-C’nin salınımını da inhibe eder. Böylece, mitokondri membran potansiyeli ve dolayısıyla Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilen kaspazların aktivitesi inhibe edilir. Ayrıca BCR/ABL, Raf-1 ve Akt proteinleri yoluyla pro-apoptotik Bad proteinini fosforile ederek de apoptozu engellemektedir (Şekil 3). Böylece BCR/ABL, hücre içi dengeyi hücrenin büyümesi yönüne çevirirken apoptozu da engeller. Öte yandan, BCR/ABL ile transfekte edilen hücrelerde BCR/ABL proteininin, Fas reseptörü/Fas ligand sistemi ile apoptozu engellediği de gösterilmiştir (8, 27-29, 33, 35).

BCR/ABL, kendi proteininin proteozomlarca parçalanmasını da kontrol ettiği bildirilmektedir. BCR/ABL proteininin, inhibitör fonksiyonu olan Abi-1 ve Abi-2 proteinlerinin proteozomlarca parçalanmasını kontrol ettiği gösterilmiştir. Abi-1 ve Abi-2 proteinlerinin parçalanması, BCR/ABL-pozitif lösemilerde gözlenirken BCR/ABL-negatif hücrelerde gözlenmemiştir (27, 32).

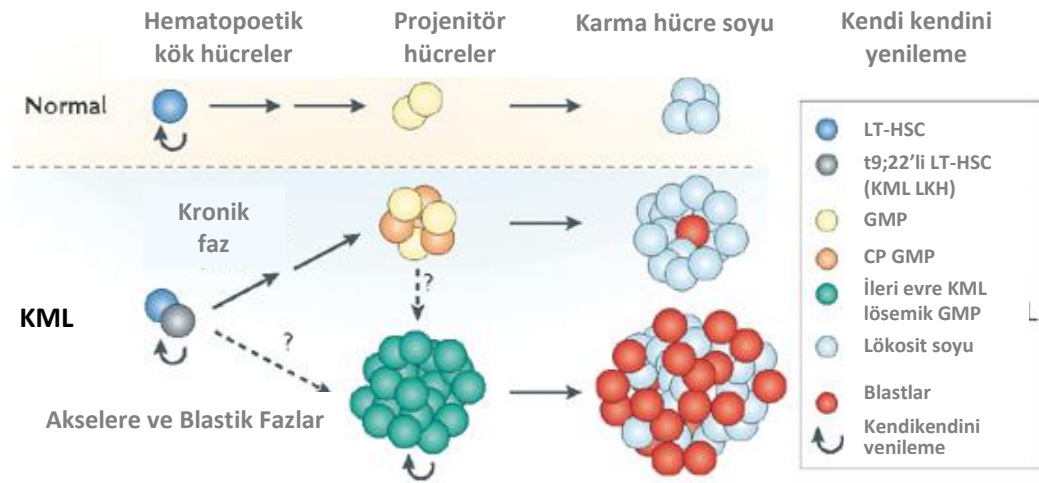
Özetle, BCR/ABL füzyon gen ürünü, bu sinyal ileti yolları yoluyla mitoz aktivasyonu, apoptoz inhibisyonu, adezyon kaybı ve kendi aktivitesini düzenleyen proteinlerin supresyonu ile kanser oluşumunu tetiklemektedir (31).

2.1.3. Klinik

Hastaların %20-40'ı tanı anında asemptomatiktir. Rutin testler sırasında tespit edilen lökositozun incelenmesi sonucu genellikle tanı konulur (36, 37). Hastalığın klinik seyri süresince 3 evre dikkati çekmektedir. Bunlar:

1) Hastaların tanı anında büyük çoğunluğunu oluşturan kronik evre, tipik olarak sabit veya ağrısız fazdır. Semptomlar arasında: letarji, enerji kaybı, nefes darlığı, kilo kaybı veya hemoraji yer almaktadır. Terlemenin artması tipiktir. Spontan ezikler, diş eti, bağırsak veya idrar yollarında kanama yaygındır. Görme bozuklukları oluşabilir. Ateş ve lenfadenopati kronik fazda nadirdir. Teşhis sırasında hastaların %50-70'inde splenomegali ve beraberinde kansızlık vardır. Lökosit sayılarında artma görülür. Kronik fazda blast hücreler %10'dan daha azdır (Şekil 4) (36-38).

2) Vakaların yarısında, akselere faz olarak bilinen bir ara faz gelişir. Hastalık tedavi edilmeyip doğal seyrine bırakıldığında veya tedaviye yanıt alınamadığında gözlemlenebilen bir fazdır. Hastalığın hızlanmış progresyonunu gösteren akselere fazda hastalık tedricen gelişir, aylar veya yıllar sürebilir. Bu fazda, blast sayısında %10-30 artış ve trombositopeni görülür (Şekil 4) (36, 39).



Şekil 4: Kronik myeloid löseminin klinik evrelerinin şematik gösterimi (40).

3) Kötü gidişi gösteren blastik fazda, hayatta kalım süresi ortalama 7 aydır. Vakaların yarısında kronik faz, birdenbire öngörülemeyen, kendiliğinden agresifleşerek bu faza dönüşür. Kemik iliği ve kandaki blast sayısı %30'dan fazla görülür (Şekil 4) (36, 40).

2.1.4. Tanı

Olgunlaşmış ve olgunlaşmakta olan lökositlerin anormal derecede yüksek sayılarda gözlemlenmesi KML tanısında ilk adımı oluşturur. Tanı, lökositoz, trombositoz, immatür granülositler ve bazofili miktarına dayanır. Lökosit sayısı teshiş sırasında $20-200 \times 10^9/L$ sınırları arasındadır. Periferik kan yaymalarında blast formlarından olgun nötrofillere kadar, granulositlerin bütün formlarına rastlamak mümkündür. Bazofiller teşhis sırasında tespit edilmemektedirler. Lenfosit ve monositlerin mutlak sayıları artar, ama yüzdeleri azalır. Trombositler genellikle artar. Hemogloblin konsantrasyonu hastalığın başlangıcında normal seviyededir. Bazen çekirdekli eritrositlere rastlanır. (34, 41). Kemik iliği biyopsisi, blast oranı ve sitogenetik değerlendirme için yapılmalıdır. Kesin tanı periferik kanda veya kemik iliğinde %95'in üstünde Ph kromozomunun pozitifliği ile konulur (34, 41, 42). Sitogenetik ve FISH (Fluorescence in situ hybridization) testi, Ph kromozomunu ve diğer sayısal ya da yapısal kromozomal bozuklukları göstermek için; qRT-PCR ise, kırılma noktalarını belirlemek için uygulanır (35).

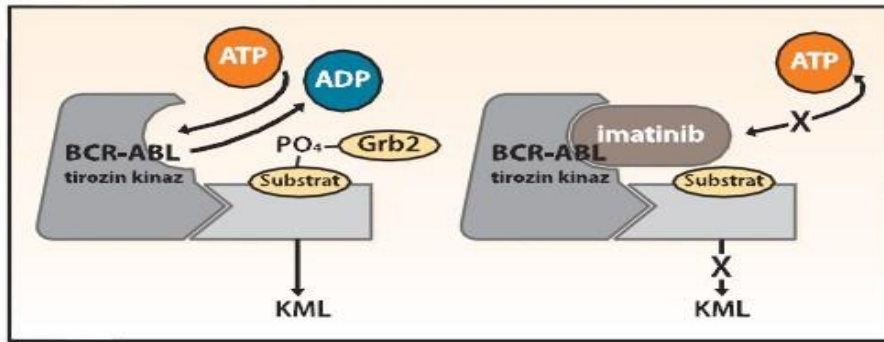
2.1.5. Tedavi

Daha önceki tedavilerde genel olarak radyoterapi, busulfan, hidroksiüre ve interferon-alfa kullanılmaktaydı (43). Ancak hidroksiüre ile hematolojik yanıt ulaşılsa bile sitogenetik yanıt elde edilememekteydi. İnterferon ile % 70-80 hematolojik yanıt ve % 5-15 tam sitogenetik yanıt elde edilebilse bile, tedavinin süresi tam belli değildi (44). Allojeneik HKH nakli ise, KML tedavisinde tek küratif yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Ancak, donör bulmada zorluklarlar görülmekte, genç ve HLA'sı uygun vericisi olan hastalara uygulanabilmektedir. Kemik iliği transplantasyonunda 5 yıllık lösemisiz sağkalım oranları %60-80 arasındadır. Ancak hastaların %10-30'unda allojenik transplantasyondan sonra 3 yıl içerisinde relaps görülmektedir (4).

Son yıllarda hedefe yönelik tedavi olan tirozin kinaz inhibitörlerinin ortaya çıkmasından sonra KML tedavisinde dramatik iyileşmeler meydana gelmiştir. İmatinib, sınıfının ilk

ajanıdır ve ilk basamak tedavisi olarak kabul edilmektedir. Imatinib mesylate ayrıca Glivec, Gleevec, STI571 veya CGP 57148B gibi diğer isimleriyle de tanınmaktadır ve kimyasal yapısı 2-fenilaminopirimidindir. İmatinib ile 8 yıllık toplam hayatta kalım oranı % 85 ve ilerlemiş hastalığa progresyonsuzluk oranı % 92'dir. İlaç, hastaların %80'inde hızlı klinik ve sitogenetik cevap sağlamaktadır . Tam sitogenetik remisyona ulaşan hastalarda bile qRT-PCR yöntemi ile düşük seviyede BCR-ABL transkriptleri tespit edilmektedir. Bu sonuç imatinibin tek başına bütün KML kanıtlarını yok edemediğini göstermektedir (6, 39, 45)

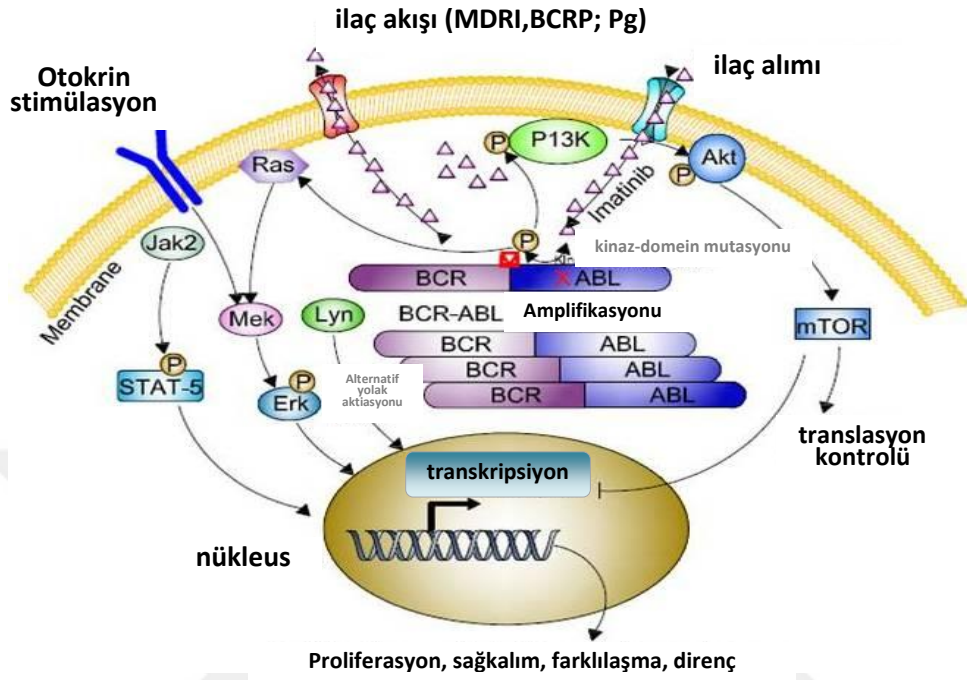
Bu ilaç, ATP bağlanma bölgesine bağlanarak aktifleşmeyi bloke etmektedir (Şekil 5). Bu blokaj, ABL ile inhibe edilen apoptozu indüklemekte, sinyal yolları yoluyla aktive edilen hücresel çoğalmayı ise engellemektedir. Böylece, lösemik hücrelerdeki aşırı aktive olan sinyal yolları imatinib tarafından inaktive edilmekte, BCR/ABL-negatif olması nedeniyle de normal hücreleri etkilememektedir (42).



Şekil 5: İmatinib Mesilat'ın etki mekanizması (www.medscape.com).

Ayrıca imatinib, trombosit kökenli büyüme faktörünün (PDGF), kök hücre faktörünün (SCF) ve c-Kit reseptör tirozin kinazların güçlü bir inhibitörüdür (30, 45, 46). İmatinib uzun süreli tedavi boyunca genel olarak iyi tolere edilmektedir ancak, hastaların bir kısmında imatinibe karşı direnç gelişmektedir (7, 47, 48). Direnç, ilacın bağlandığı bölgede meydana gelen herhangi bir mutasyon ile ilacın bağlanmasının engellemesine; BCR/ABL'ın aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonuna; ve MDRI, BCRP ve P-glikoprotein gibi drug efflux proteinlerinin artışına bağlı olarak oluşabilmektedir (Şelil 6) (47). İmatinib ile sağlanan başarıyı takiben, geliştirilen iki yeni tirozin kinaz inhibitörü olan dasatinib ve nilotinib de BCR/ABL'ı hedeflemektedir. Ayrıca bu iki ilaç, BCR/ABL'dan başka tirozin kinazları da inhibe etmektedir ve bu ilaçlara karşı da direnç vakaları bildirilmektedir (45, 48). Ancak son

yıllarda bu dirence, HKH'lerden geliştiği düşününlen LKH'lerin neden olduğu düşünülmektedir (1, 2).



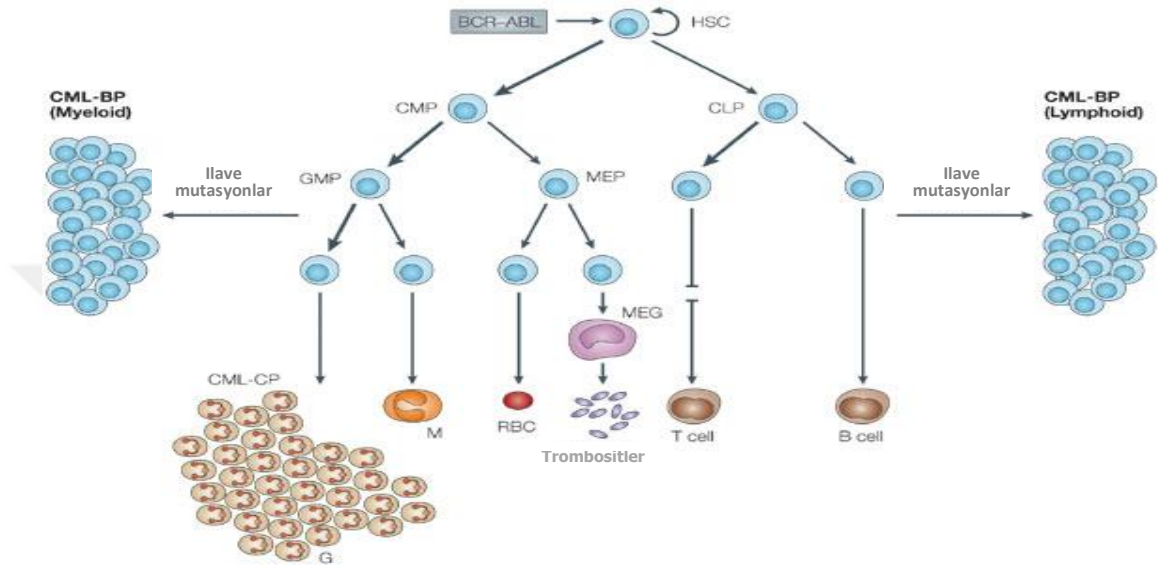
Şekil 6: Kronik myeloid lösemide direnç mekanizmaları (<http://www.intechopen.com/books/stem-cell-biology-in-normal-life-and-diseases/hematopoietic-stem-cells-in-chronic-myeloid-leukemia>).

2.2. Kanser Kök Hücreleri:

2.2.1. Lösemik kök hücreleri

1980'lerde tanımlanmasından sonra BCR-ABL geni klonlanıp retroviral bir vektör ile sıçan HKH'lerine nakledilmiş ve değişime uğrayan kök hücrelerin sıçanlarda insandaki KML hastalığına benzeyen bir hastalığı oluşturduğu gözlenmiştir (26). Normal hematopoezin çoğu diferansiye olacak şekilde organize edilmiştir, ancak küçük bir fraksiyon kendini yenileme kapasitesi sahiptir. KML'nin bu küçük hücre fraksiyonları tarafından hiyerarşik olarak organize edildiği kabul edilmektedir. CD34+ ve CD38- olan bu fraksiyon, LKH olarak tanımlanmıştır. BCR ve ABL genlerinin kırılma noktalarının aynı hastanın her hücre serisinde aynı olması bu bulguyu desteklemektedir. Ayrıca KML hastalarında, Ph kromozomunun bütün myeloid hücre soylarında görülmesinin yanı sıra, bazı B ve T hücrelerinin bir kısmında (lenfoid hücre soyları) da görülmesi, bu bulguyu destekleyici olarak kabul edilmektedir (Şekil 7). Dikkat çeken diğer bir durum, blastik krizdeki KML hastalarından veya tedaviye direnç gösteren hastalardan elde edilen granülosit monosit öncüllerinin (GMP) normalde

böyle bir yetenekleri olmamasına rağmen, kendi kendini yenileme yeteneği göstermesidir. KML’de GMP populasyonunun kendi kendini yenileme kapasitesine sahip olması, hastalığın ilerlemesiyle LKH’lerinin belirli bazı özellikler kazanmasına bağlanmaktadır. Blastik kriz, BCR-ABL kinaz aktivitesi ve GMP’lerin kendi kendini yenileme özelliğinin birbiri ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Şekil 7) (10).



Şekil 7: Kemik iliğinde diğer hücre serilerinde Kronik myeloid lösemi oluşumu (26).

LKH varlığının ilk ilgi çekici kanıtı, 1997 yılında Bonnet ve Dick tarafından gösterilmiştir (49). Raporlarında, NOD/SCID (obez olmayan diabetik (NOD) / severe combined immune-deficient (SCID)) farelerde, akut myelojenik lösemi hücrelerinin yaklaşık 1/10.000 kadarı olan küçük bir alt populasyonun (CD34+/CD38- hücrelerin) sadece orijinal tümörü oluşturabildiğinin gösterilmesi ile kök hücre özelliğinde olan ve hematopoietik malignansileri başlatabildiği bildirilen “lösemik kök hücre” (LKH) kavramı gündeme gelmiştir (1, 2, 49). Bu hücrelerin, normal HKH’lerin özelliğinde olduğu tesbit edilmiş ve kanserin normal kök hücrelerde ve/veya öncü hücrelerinde ortaya çıkan genetik ve/veya epigenetik değişikliklerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür ve birçok çalışma ile de desteklenmiştir (49-51).

2.2.2. Tarihçe

Son zamanlardaki çalışmalar, KKH’lerinin kendi kendini yenileyebilen ve pluripotent kapasiteye sahip, “tümör başlatıcı” özellikte, immortal hücreler olduğunu ileri sürmektedir

(15). KKH'leri, lösemi ve çeşitli solid tümörleri de içeren birçok malignansilerde tespit edilmiştir. Olağanüstü özellikleri nedeniyle KKH'lerin tümör başlaması, gelişmesi, metastazı ve nüksü için gerekli olduğu düşünülmektedir. 1963 yılında, Bruce ve ark., lenfoma hücrelerinin sadece %1 ila 4 kadarı olan alt popülasyonun fare dalağında *in vivo* olarak koloniler oluşturabildiğini ya da kanser başlatabildiğini bildirmişlerdir (50).

Hasta tümör dokusundan izole edilen son derece tümörijenik KKH'lerinin *in vivo* ve *ex vitro* olarak farklılaşmış kanser hücre kitlesi oluşturması, bunların lösemi veya tümör oluşumundan sorumlu olduğunu gösteren en önemli kanıtlardır (49, 50, 51). Solid kanserlerdeki ilk rapor ise, 2003'de meme kanserinde kök hücre varlığını gösteren Al-Haji tarafından gelmiştir. CD24⁻/CD44⁺ hücreler NOD/SCID farelere enjekte edilerek tümör oluşumu gösterilmiştir (52). Bugüne kadar, melanoma (53), akciğer (54), kolon (55), prostat (56), over (57), beyin kanserleri (58) ve diğerlerini de içine alan solid tümörlerin geniş bir spektrumunda KKH'leri keşfedilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, tümör oluşturan hücrelerin hepsinin aynı olmadığı ve tümörlerin, mutasyona uğramış normal doku kök hücrelerinden ya da kök hücre özelliğine sahip öncü hücrelerden köken alabileceği bildirilmiştir (12, 14,15, 59).

2.2.3. Heterojenite Modelleri

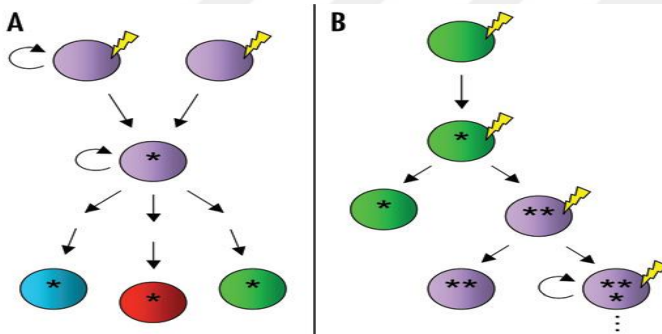
Tümör kitlesi incelendiğinde, çoğalan hücreler olduğu gibi mitozu sona ermiş, farklılaşmış hücreler de bulunmaktadır. Bir tümörün, tek bir hücreden köken almasına (klonal olmasına) rağmen oldukça heterojen olduğu görülür. Bugüne kadar tümör büyümesi ve içindeki heterojeniteyi hesaba katan iki model önerilmiştir (60, 61).

“KKH modeli”, heterojen bir tümör topluluğunda benzersiz bir şekilde kendini yenileme, limitsiz çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahip, nadir hücre grubunun olduğunu ileri sürmektedir. Bu modele göre, “kanseri-başlatan hücreler” ya da “kanseri kök hücreleri” olarak da tanımlanan bu küçük alt popülasyonlar, hiyerarşinin en üstündeki hücreleri oluşturmakta ve diğer bütün hücreler, asimetric bölünme ile farklılaşan KKH'lerinden gelişen tümör topluluklarını içermektedirler. Böylece KKH'lerinin asimetric bölünmesi, tümör içindeki hücre tiplerinin hiyerarşisini üreterek, tümör hücrelerinde gözlenen fonksiyonel heterojenitenin gelişmesini sağlamaktadır. Tümörlerin yüksek derecede

hiyerarşik olduğunu ileri süren KKH modeli, kanserin başlaması, ilerlemesi, metastaz ve rekürrenslerinden KKH'lerinin sorumlu olduğunu vurgulamaktadır (Şekil 8) (59, 60, 61).

Ancak “klonal evrim modeli” (KE) olarak adlandırılan alternatif bir görüş daha vardır. Bu model, tüm tümör hücrelerinin farklı kapasiteli olarak tümör devamlılığına katkıda bulunduğunu varsaymaktadır. Hücreler arası varyasyonlar esas olarak, kanser gelişimi sırasındaki genetik ve/veya epigenetik değişiklikler sonucu oluşan alt klonal farklılıklara atfedilmektedir (Şekil 8) (59, 61).

Genel olarak KKH modeli, intrasellüler genetik çeşitlilik veya genetik olarak çeşitli alt klonların varlığını göz önüne almaksızın, fonksiyonel heterojenite kavramını vurgulamaktadır. Buna karşılık KE modeli, genetik heterojeniteye odaklanır ancak, alt klonların içindeki fonksiyonel çeşitliliği göz ardı eder. Bu iki model birbirini dışlar gibi görünmesine rağmen biriken kanıtlar, ne KKH modelini ne de KE modelini dışlamamayı önermektedir (59, 61).

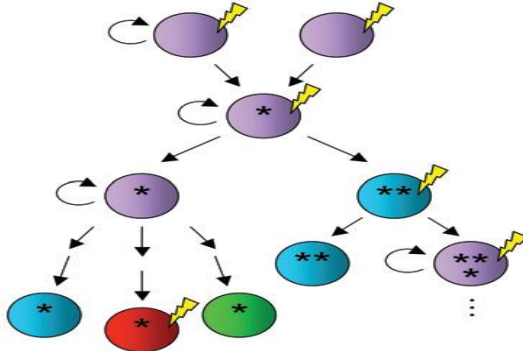


Şekil 8: (A) KKH ve (B) Klonal Evrim Modelleri (64).

Son zamanlarda birkaç grup, hem lösemi hem de solid tümörlerdeki tümör başlatan hücrelerin genetik özelliklerini araştırmak için genetik analizler ile fonksiyonel metodları kombine ettiler. Notta ve ark. BCR/ABL+ ALL örneklerinin, kompleks bir evrimsel süreçle ilişkili olan genetik olarak farklı alt klonlardan oluştuğunu belirtti. Araştırmacılar, tanı zamanında genetik olarak farklı altgrupların çeşitli agresif özelliklere zaten sahip olduklarını da belirttiler. İlaveten subklonların genetik farklılığı ve relatif üstünlüğü, hastalığın gelişimi ile değişmektedir (62).

Bu çalışmalar KKH'lerin varlığını bildirmekle birlikte, zamanla gelişebilir olduğunu göstermektedir. Atasal bir klon, en az iki klonal dizi verir ki bunların her biri farklı genetik

anomalileri edinmesi ile bağımsız olarak gelişmektedir. Bir klon, baskın olarak tanımlanan klon olarak ortaya çıkarken, relapsda diğer klon, ilave mutasyonları içeren baskın klonu doğurur (Şekil 9) (61, 63).



Şekil 9: KKH ve Klonal Evrim Modellerinin birlikteliği (64).

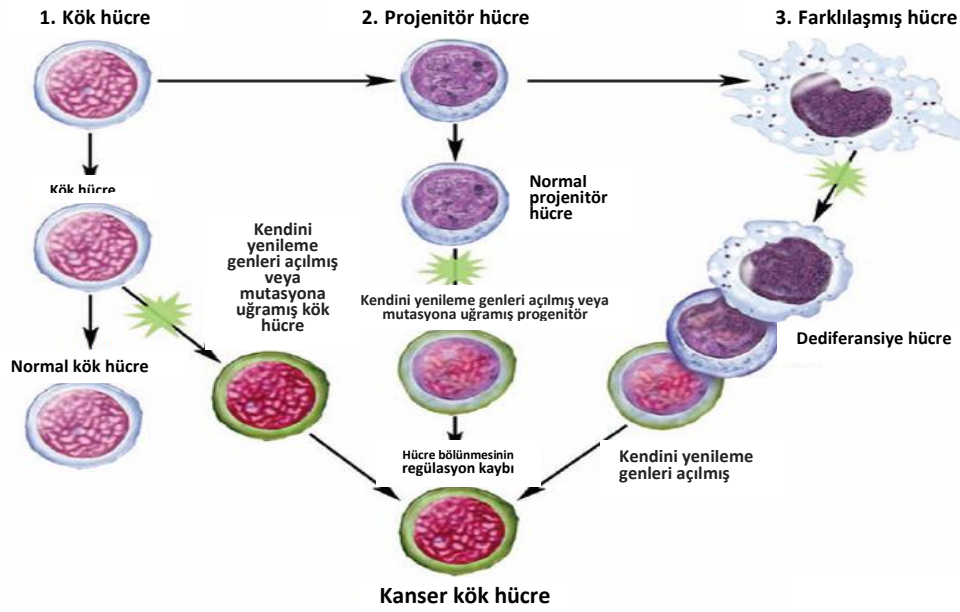
2.2.4. KKH'lerin Kökeni

KKH'lerin kökeni için; *kök hücreler*, *öncü hücreler* ve *farklanmış hücreler* olmak üzere 3 farklı hipotez ileri sürülmektedir:

Normal kök hücrelerden kaynaklandığını ileri süren hipoteze göre; KKH'leri, yetişkin dokularında bulunan normal kök hücrelerden kaynaklanırlar ve bu nedenle tümör oluşturmak için yeniden farklılanmaları gerekmemektedir. Bu varsayıma göre KKH'ler, kök hücrelerde var olan düzenleyici sinyal yollarını kendini yenilemek için kullanabilirler. Sınırlı yaşam süresine sahip ve bu kısa yaşam süresinde tümör oluşumu ve metastaz için gerekli mutasyonları gerçekleştiremeyen diğer olgun ve farklılaşmış hücreler ile kıyaslandığında, kendini yenileme özelliği KKH'lere uzun bir yaşam süresi sunacaktır. Lösemiye neden olan hücrelerin birçok özelliği, KKH'lerin normal kök hücrelerden kaynaklandığı varsayımını desteklemektedir. LKH'lerin farklı dozlarının xenotransplante edilerek farelerde lösemi oluşumunun gösterilmesi, bu hücrelerin HKH'lerden kaynaklandığı sonucuna götürmektedir (Şekil 10) (59, 64).

Öncü hücreler, kök hücrelerin genellikle bir başka hücre tipine farklılaşmak için dönüştüğü hücrelerdir ve olgun hücreleri oluşturmak üzere bölünürler. Çoğalan geçici hücreler olan öncü hücreler, fetus ya da yetişkin dokularında bulunurlar ve kısmen farklılaşmışlardır. Kök hücrelere oranla dokuda daha çok sayıda bulunması, bazı araştırmacılara bu hücrelerin KKH'lerin kaynağı olabileceğini düşündürmüştür (Şekil 10)(65).

Üçüncü hipotez ise; farklılaşmış olgun hücrelerin kök hücreye benzeyen özellikler kazanmak suretiyle KKH'lerin kaynağını oluşturabileceklerini öngörür. Farklılaşmış hücreler, meydana gelen mutasyonlar sonucu yeniden programlanarak geriye doğru farklılaşmakta (dediferansiyasyon), böylece kendi kendini yenileme özelliği kazanan, uzun yaşam süreli hücrelere dönüşmektedir. Bu varsayım, dokuda bulunan geniş bir hücre grubunun tümör oluşturabileceğini ileri sürer. Ancak hücreleri yeniden programlayacak özel bir mekanizma henüz gösterilememiştir (Şekil 10) (66).



Şekil 10: Kök hücrelerinin kökenine yönelik hipotezler (www.medscape.com).

2.2.5. KKH'lerin Özellikleri

KKH'leri tümör hücrelerinin farklı popülasyonlarıdır ve kendilerini yenileyebilme ve immortalite gibi birçok benzersiz özelliklere sahip olmaları nedeniyle, tümör hücre popülasyonunun devamı ve tümör oluşumu için çok önemlidir. KKH'leri, primer tümörlerin büyümesi ve yeni tümörlerin gelişmesi ile sonuçlanan farklı fenotipli tümör hücrelerini oluşturabilme yönünden pluripotenttir (63). Ayrıca sessiz (çoğalmadan yaşamını sürdürme) durumun devamı; anti-apoptotik yolların aktivasyonu; migrasyon; ve aktif telomeraz ekspresyon kapasitesi ile normal kök hücre karakterleri göstermektedir. Bununla birlikte, biyolojik ve fonksiyonel olarak normal kök hücrelerden, yüzey belirteçleri; ilaç direnci; tümörejenik yolların aktivitesi; ve mikroçevre ile farklılık göstermektedir (14, 15, 63, 64).

2.2.5.1. Yüzey belirteçleri

KKH'leri yüzey biyobelirteçleri yönünden farklılık göstermektedir (Tablo 1). Spesifik olarak CD34+/CD38- yüzey marker fenotipi gösteren LKH'leri ilk çalışıldır ve KKH'lerin en anlaşılan tipidir . CD38 kaybı normal HKH'lerden LKH'lerin ayrılmasına neden olurken, hem HKH'ler hem de LKH'ler CD34+'dır (49). Bunu takiben LKH'lerin daha seçici yüzey markerları keşfedilmiştir ve bu marker kombinasyonları kullanılmıştır. Örneğin, CD34+/CD38-/HLA-DR-/CD71-/CD90-/CD117-/CD123+ kombinasyonu LKH'lerin yüzeyinde benzersiz bir şekilde bulunurken, normal HKH'lerin yüzeyinde bulunmamaktadır (65, 67). CD123 sinyalinin, hematopoetik progenitörlerde hücre siklusunu stimüle ettiği, farklılaşmayı indüklediği ve apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir. CD34+/CD38 KML hücrelerinde CD123 ekspresyonunun önemli derecede arttığı bildirilmektedir. Ayrıca CD123'ün KML direncine katkıda bulunan bir otokrin aktivasyon döngüsünü sağladığı da düşünülmektedir. NOD/SCID farelere CD123+ popülasyon transfer edildiği zaman lösemiye yol açtığı, bu nedenle CD123'ün LKH belirteçlerinden biri olduğu öngörülmektedir. Ayrıca CD34+/CD38-/CD123+ LKH'lerin, tedaviye cevap ve sağkalımla ilişkili olduğu da yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (68).

Solid kanserlere ilişkin olarak Al-Hajj ve ark., meme KKH'leri olarak ESA+/CD44+/CD24-^{low}Lineage- hücrelerini tespit ettiler (52). Araştırmacılar, diğer hücre popülasyonlarına nazaran bu popülasyonun NOD/SCID farelerde tümör oluşturmak için daha büyük bir kapasiteye sahip olduklarını buldular. İlaveten hyalüronik asit için bir hücre yüzey reseptörü olan CD44, prostat, ovaryum, akciğer, baş-boyun, mide, kolon, karaciğer, pankreas kanserlerindeki KKH'lerinin de belirteci olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (59, 67). Singh ve ark., NOD/SCID farelerde, CD133+ beyin kanser hücrelerinin çok küçük bir sayısının transplantasyonunun tümör oluşturabildiğini buldular ve CD133+ hücrelerin KKH markeri olabileceğini önerdiler (59). Ancak, KKH yüzey markerlarında büyük ilerleme olmasına rağmen hala birçok konu açıklığa kavuşmak için beklemektedir. Yapılan son çalışmalar, tüm KKH'lerinin belirteçleri eksprese etmediğini ve bazı KKH'i olmayan kanser hücrelerinin de belirteçleri eksprese edebildiğini göstermektedir. Ayrıca belirteçlerin sadece KKH'lerine özgü olmayıp, normal hücrelerde de ifade edilebildiği bildirilmektedir (61). Tablo 1'de kanser tiplerine göre KKH'lerin özel fenotipleri özetlenmiştir.

Tablo 1: Kanser kök hücrelerinin hücre yüzey fenotipleri (67).

Tümör tipi	Kanser Kök Hücre Yüzey Belirteci
Lösemi	CD34+, CD38-, HLA-DR-, CD71-, CD90-, CD117-, CD123+
Meme	ESA+, CD44+, CD24-/ (low)
Beyin	CD133+, CD49+, CD90+
Akciğer	CD133+, ABCG2(high)
Kolon	CD133+, CD44+, CD166+, EpCAM+, CD24+
Pankreas	CD133+, CD44+, EpCAM+, CD24+
Melanom	CD20+

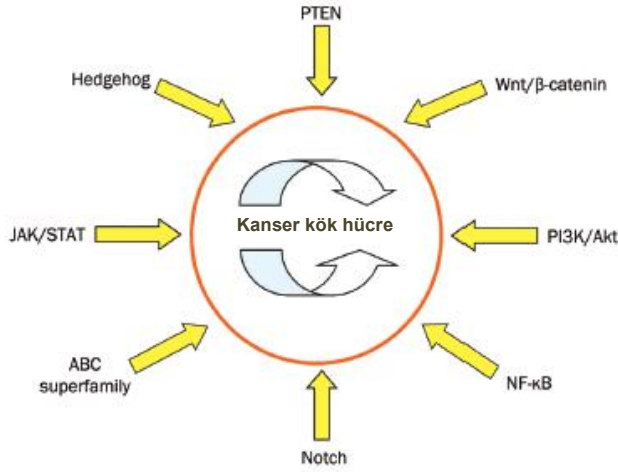
ABCG2 = ATP bağlama kaset subfamilya G üyesi, EpCAM = epitelyal hücre adezyon molekülü, ESA = Epitelyal spesifik antijen.

2.2.5.2. İlaç direnci

ABC (ATP'ye bağlanan kaset = ATP-binding cassette) taşıyıcıları, hücre zarı üzerinde çeşitli maddeleri hem dışarı atma (effluxer = atıcılar) hem de içeri alma (importer = alıcılar) şeklinde taşıyan protein molekülleridir. İlaçlar, metabolik ürünler, steroller, yağlar ve lipitler bu şekilde taşınır. ABC taşıyıcıları, kanserin kemoterapi tedavisine direncinde rol oynarlar. KHH'leri, ABC transpoterlerin yüksek düzeylerini eksprese ederek kanser tedavisine direnç geliştirebilmektedir. Bu olgu çoklu ilaç direncine (MDR) katkıda bulunabilmektedir çünkü, birçok anti-tümör ilaçlar dışarı pompalanabildiği için düşük intrasellüler ilaç konsantrasyonu ile sonuçlanmaktadır. ABC süperfamilyasının iyi bilinen “parlayan yıldızları”, organik bileşikleri taşıyan, çoklu ilaç direnç proteinleri (multidrug resistance proteins) (MRPs/ABCC); topoizomeraz I ve II inhibitörlerini dışarı pompalayan, meme kanserine direnç proteini (breast cancer resistance protein) (BCRP/ABCG2); ve organik katyonları ve doğal bileşikleri taşıyan, P-glycoprotein (P-gp/ABCB1)'dir (Şekil 6). KKH'lerdeki ABC transpoterlerinin yüksek ekspresyon düzeyleri, Hoechst 33342 boyası ile hücrelerin muamelesi sonucunda keşfedilmiştir. Yüksek ABC transpoter düzeylerini içeren nadir hücreler Hoechst'ı dışarı pompalar, bu nedenle bu fraksiyon, yan popülasyon (side population = SP) olarak adlandırılmıştır. Biriken veriler, çeşitli hücre dizileri ve tümörlerinin SP hücreleri içerdiğini ve bu hücre popülasyonunun, SP içermeyen diğer tümör popülasyonlarından tümörojenite açısından daha büyük bir kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir (69, 70).

2.2.5.3. Sinyal yolları

KHH'lerinde sinyal yolak ağlarının bozukluğu, KKH'lerini etkinleştirmede önemli bir rol oynar. Şekil 11'da KKH'lerine etkili olduğu bildirilen sinyal yolları topluca şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 11: Kanser kök hücrelerinde etkili olan sinyal yolları(59).

PI3K/Akt sinyal yolağı, KML ve AML'yi içeren çeşitli kanserlerde yer alır. AKT aktivasyonu, hücrel transformasyon ve tümörojenezis için çok önemlidir (35, 71). AKT1 mutasyonu, Bcl-2'nin protein düzeylerinde ve apoptoza direnç artışı ile sonuçlanan, pro-apoptotik protein olan BAD'ın fosforilasyonunda artışlara neden olmaktadır. İlâveten PI3K yolağının diğr üyeleri (örneğin, PTEN ve mTOR) LKH'lerin ömrünü uzatmasına neden olabilir. PTEN'in mutasyonları veya susturulması, PI3K/Akt sinyal yolağını aktive etmektedir ve T hücreli akut lenfoblastik lösemi, prostat kanseri, melanoma, glioblastoma ve endometriyal karsinomu içeren çeşitli kanserlerde gösterilmiştir (59, 71, 72).

JAK/STAT sinyal yolağı, tümör başlatma ile ilgilidir. JAK/STAT yolağının anormallikleri, özellikle lösemileri içeren çeşitli kanserlerde tanımlanmıştır. V-Abl, JAK/STAT yolağının etkilenmesi ile pre-B hücrelerinin malign transformasyonunu indükleyebilen güçlü bir non-reseptör trozin kinazdır. Pim-1 ve Pim-2 kinazların, pre-B hücrelerindeki v-Abl bağımlı JAK/STAT sinyali ile indüklenbildiği ve hücrel transformasyonda önemli roller oynayabildikleri gösterilmiştir. İlâveten JAK2-V61F mutasyonunun hematopoietik hücrelerin malign transformasyonuna katkıda bulunan önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. JAK/STAT sinyal yolunun negatif regülasyonu için önemli

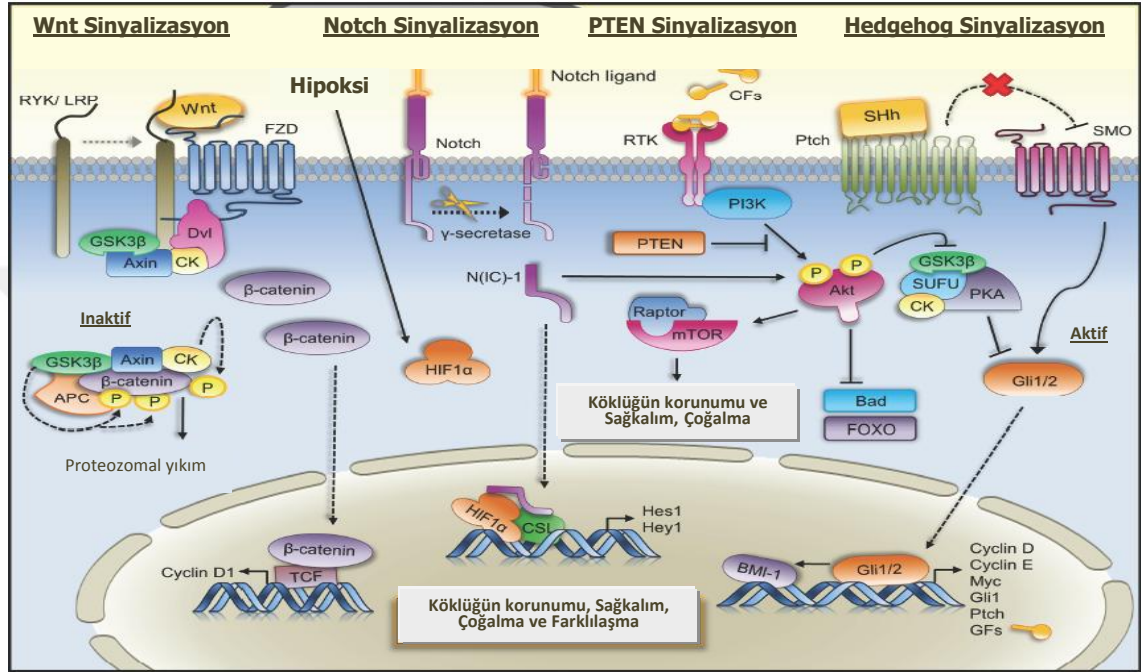
bir mekanizma, sitokin sinyalinin süpressör (the suppressor of cytokine signaling = SOCS) ailesinin üyeleri tarafından aracılık edilir. JAK/STAT sinyalinin aktivasyonunun, birkaç onkogen ile transformasyonunun gerekli olması nedeniyle, SOCS-1 ve SOCS-2'nin regülatör etkisinin aşılmasının tümör oluşumu için gerekli olduğu önerilmiştir. KML'de BCR/ABL tarafından aktive edilen sinyalleme SOCS-1 ve -3'ün trozin fosforilasyonuna yol açtığı, böylece JAK/STAT sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe eden proteinlerin zayıflatıldığı gösterilmiştir (35, 59, 73).

Ayrıca iyi bilinen embriyonik sinyal yolları olan Notch, Hedgehog ve Wnt, KKH popülasyonunun sürdürülmesinde önemli rol oynarlar. Notch sinyalleme, normal kök hücre soyuna spesifik farklılaşmayı ve kendi kendini yenilemeyi etkilemektedir. Yapılan araştırmalar Notch yolağının, angiogenesis, farklılaşma modülasyonu ve KKH'lerin metastaz oluşturma yeteneği ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte Notch4 aktivitesinin, meme KKH'lerini arttırdığı, inhibisyonunun ise meme KKH popülasyonunu azalttığı bildirilmektedir (Şekil 12) (59, 74, 75).

Hedgehog yolağının anormal regülasyonu (Şekil 12), çeşitli insan malignansileri ile ilişkilidir ve hastalık tedavisinin sonucunu etkileyen önemli bir faktördür. Aktif Hedgehog sinyali, insan lösemilerinde (özellikle CD34+ primer lösemi hücrelerinde) gösterilmiştir (74, 76).

Yapılan çalışmalarda KKH özelliklerinin sürdürülmesinin, Wnt sinyal yolağı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Wnt ligandlarıyla çalışan sinyal yolları evrimsel süreçte oldukça iyi korunmuştur. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı, kök hücrelerin pluripotens düzeylerinin korunmasında ve farklılaşmalarının düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Bu nedenle sinyal yolağı üzerindeki kontrol mekanizmalarının bozulması, kök veya öncü hücrelerin doku içerisinde çoğalmasına ve karsinogenezin başlamasına neden olmaktadır. Wnt sinyal yolağı, hücrelerin gelişim sürecinde önemli olmasına karşın, kök hücrelerde uygun olmayan zaman ve yerde aktivite kazanması hücreleri, kanser oluşumuna doğru götürmektedir (Şekil 12). Anormal Wnt/ β -katenin sinyali, lösemi, kolon, epidermal, meme ve kutanöz karserler gibi çeşitli malignansilerde tespit edilmiştir. İnsan kolorektal kanserlerinin birçoğunun Wnt sinyal yolağında meydana gelen mutasyon sonucu geliştiği bilinmektedir. APC (adenomatous polyposis coli), Wnt sinyal yolağındaki β -kateninin parçalanmasını sağlayarak tümör gelişimini engelleyici etki göstermektedir. APC geninin işlev kaybıyla sonuçlanan defektif

mutasyonlarda kolorektal kanserlerinin görüldüğü bildirilmektedir. Bu mutasyonlar, β -catenin uygunsuz stabilitesi ve Wnt kaskad aktivasyonu ile epiteliyal hücre transformasyonunu indüklemektedir. Ancak APC etkisizleşmesi, öncü ve farklılaşmış hücrelerde meydana gelirse bu değişimin başlatılamadığı gözlenmiş ve karsinogenezin bağırsaktaki kök hücrelerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (35, 59, 74, 77, 78).

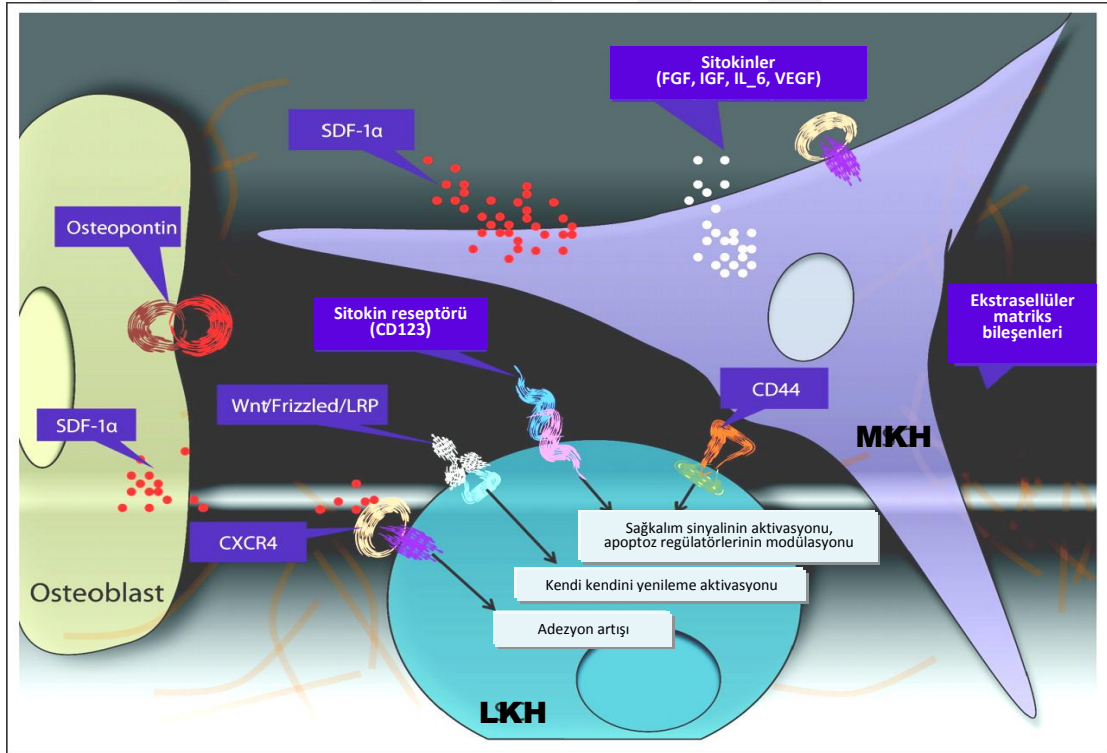


Şekil 12: Kanser kök hücre sinyal iletim yolları (74).

2.2.5.4. Mikroçevresi

Normalde kök hücrelerini içinde bulunduğu “mikroçevre” (niş) korumakta ve kendi kendini yenileme gibi faaliyetlerini sıkı bir şekilde denetleyerek çoğalmalarını kontrol altında tutmaktadır. Niş içinde yerleşmiş olan sessiz kök hücreler mutasyona karşı en iyi korunan hücrelerdir. Gereksinim durumunda hızlı çoğalma evresine girerler ki mutasyon olasılığının en fazla arttığı evre bu aşamadır. Bu aşamada ortamda oksijen azlığı veya pH değişiklikleri gibi ani ve istenmeyen olaylar mutasyon olasılığını artırır. Hızla çoğalan hücrede ortaya çıkabilecek en küçük bir sorun önemli bir mutasyon nedeni olabilir. Bu nedenle kök hücrelerin farklılaşması çok sıkı kontrol edilen bir süreçtir. Tümör mikroçevresi de, KKH’sini korumak için bir niş oluşturabilmekte ve ilaçla indüklenen apoptozdan KKH’lerini koruyabilmektedir (79, 80). Örneğin, kemik iliği nişi içinde ekstrasellüler matriks komponentleri ve salınan faktörler LKH’nin biyolojisini oluşturur. Osteoblastlar osteopontin

kaynağıdır ve kemik iliği stromal hücreleri tarafından sekrete edilen “stromal hücrelerden kökenlenen faktör-1” (SDF-1/CXCL12) ve onun reseptörü (CXCR4) arasındaki etkileşim önemlidir. CXCR4, CXCL12’nin salındığı yer olan kemik iliği mikroçevresine lösemik hücre trafiği ve homingi için kılavuzluk etmektedir. CXCL12, lösemik hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri ile yakın temasını sağlayarak, lösemik hücrelerin büyüme ve ilaç direnç sinyalleri aktive olabilmektedir. Mikroçevrede LHK’ler ile etkileşim içinde olan mezenkimal kök hücreler de SDF-1 salgılayarak LKH homingi regüle eder. Ayrıca hücre çoğalmasında, sağ kalımda, apoptozda ve ilaç direncinde etkili çeşitli sitokinlerin salınımında da rol oynar (Şekil 13) (81, 82, 83). Ayrıca VEGF (Vasküler Endotelial Growth Faktör)’in mikroçevre oluşumu ve tümör büyümesinde etkili olduğu ve tümör anjiogenezinin, KKH yaşamı ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Şekil 13) (84).



Şekil 13: Lösemik kök hücre regülasyonu ve mikroçevre
(<http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2010.31.0904>).

2.3. Kök Hücre İzolasyon Yöntemleri:

KKH’ler ile tümör başlaması, ilerlemesi, metastaz ve ilaç direnci arasındaki yakın ilişki nedeniyle, total kanser topluluğundan bu hücrelerin izolasyonu detaylı araştırmalar için temeldir. Farklı ve spesifik yüzey biyomarker fenotipleri, KKH’lerini normal kök hücreler ve

diğer tümör hücrelerinden ayırt etmek için kullanılabilir. Şu anda KKH'lerini ayırmak için kullanılan en yaygın metodlar, hücre yüzey markerları ve intrasellüler moleküllere dayanan FACS (floresans ile aktive edilen hücre ayırma = fluorescence-activated cell sorting) ve MACS (magnetic-activated cell sorting = manyetik aktive edilen hücre ayırımı) yöntemleridir.

2.3.1. Akım Sitometrik Analiz ile Hücre İzolasyonu

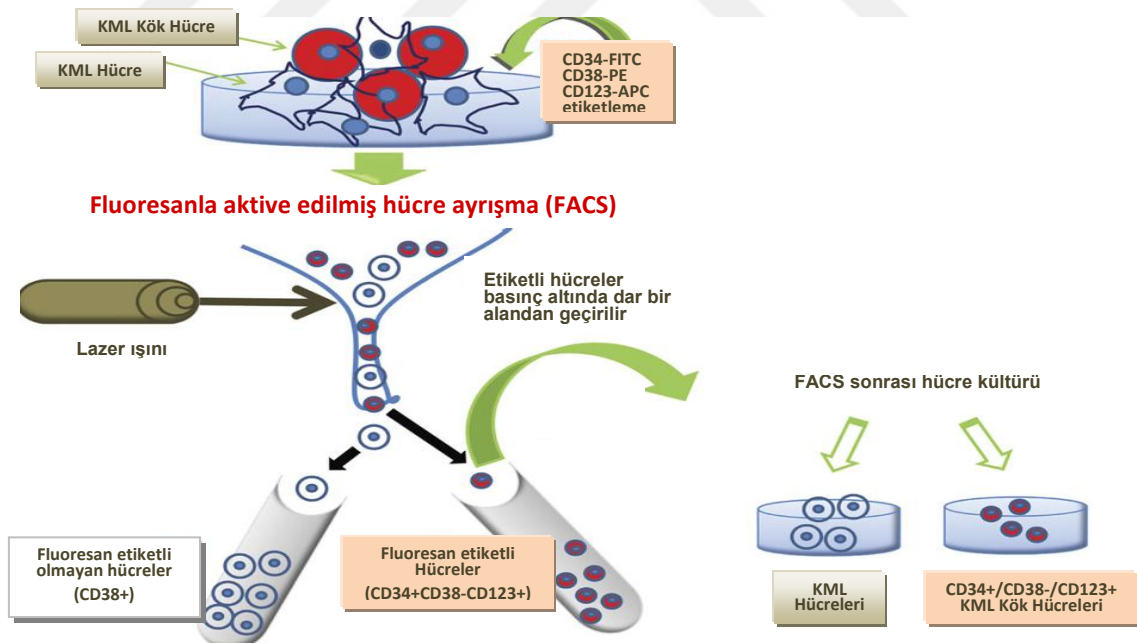
Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. "Flow" sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir. Günümüzde "flow" sitometri ya da akım sitometri terimleri kullanılmaktadır (85, 86, 87). Akım sitometrinin major kullanım alanlarından birisi de hücre subtiplerinin tespitidir. Len Herzerberg ve ark, 1974'de Stanford Üniversitesinde "Fluorescence Activated Cell Sorter" ismiyle "flow" sitometride önemli bir yenilik getirmişlerdir. Flow sitometrik analizde ölçülen özelliklerine göre hücrelerin ayrılması işlemine, "floresanla aktive edilmiş hücre ayrışması" (fluorescence-activated cell sorting, FACS) denir (88). Bu özellik her flow sitometri modelinde bulunmamakta daha çok araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Flow sitometri cihazı; numune kolektörü ve transporter, flow sistem, ışık kaynağı, sinyal dedektörü, bilgisayar ünitesi, sorting mekanizması gibi bileşenlerden meydana gelir. Bu cihazlar, kan gibi karışık bir hücre topluluğu içerisinde istediğimiz özelliğe sahip, az sayıdaki hedef, alt hücre gruplarının farklı hücre populasyonu içinden, farklı tüplere ayrılarak saflaştırılması prensibine dayanmaktadır ve aynı anda 4 farklı hücre populasyonunu ayrıştırılabilmektedir. Bir saniyede 500 hücre sayma ve 20 saniyede ortalama 10.000 hücreyi analiz edebilme gibi, çok daha fazla hücreyi daha kısa sürede, sıvı bir sistem içerisinde tek tek geçerken fiziksel, kimyasal, fenotipik ve karakteristik özelliklerini kalitatif ve kantitatif olarak analiz edebilmekte, hatta tek hücre seviyesinde araştırma imkanı sağlamakta, ayrıca ölü ve canlı hücre ayırımı da yapılabilmektedir (85, 87, 88, 89).

Bu sistemde süspansiyon halinde hazırlanan ve floresan ile boyanan hücreler tek sıra halinde akış kanalından geçerken lazer ışığı ile karşılaşır. Saçılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilir, uygun dedektörler ve filtreler tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak sinyallere dönüştürülür. Bu sinyaller bilgisayar ortamına aktararak hücrelerin büyüklüğü, granülaritesi, iç yapısı ve floresan yoğunluğu hakkında bilgi

verir. Hücreler lazer ışının önünden geçerken iki olay meydana gelmektedir (Şekil 14) (85, 88, 89).

1. İlk olay hücrenin büyüklüğü ve iç yapısına göre ışınların yayılmasıdır. Işık kaynağına paralel olarak yayılan ışınlar forward scatter channel dedektörü (FSC = İleri saçılım kanal dedektörü) ile toplanır ve hücrenin büyüklüğü hakkında bilgi verir. Hücre içerisinden 90°'lik açı ile kırılıp yayılan ışınlar side scatter channel dedektörü (SSC = Yana saçılım kanal dedektörü) ile toplanır. Hücrenin granül içeriği ve iç yapısı hakkında bilgi verir. Ayrıca ölü hücreleri, hücre agregatları ve debrisleri elimine etmeyi sağlar (85, 86, 87, 89).

2. İkinci olay ise florokromlarla boyanmış hücreden ışınların yayılmasıdır. Hücrenin spesifik bileşenlerini boyamak için florokrom olarak adlandırılan, floresan antikorlar kullanılmaktadır. Bunlar, farklı hücre gruplarının tesbiti için kullanılan spesifik hücre yüzey reseptörleri veya hücre içi proteinleridir. Florokromlar lazer ışınından enerjiyi absorbe edip farklı dalga boylarında yeniden yansıtarak dedektörler aracılığıyla toplanmasını ve kullanılabilir bilgi şeklinde bilgisayar sistemine aktarılmasını sağlarlar (85, 86, 87, 89).



Şekil 14: Floresanla aktive edilmiş hücre ayırma (FACS) işlemi

(http://www.nature.com/nprot/journal/v6/n7/fig_tab/nprot.2011.350_F3.html)'dan uyarlanmıştır.

Hücreler analiz edilirken bilgisayar sisteminde toplanan veriler farklı grafikler kullanılarak ifade edilir. FSC/SSC grafiğinde analiz edilmek istenen bölgenin seçilmesine

kapılama (gating) denir. Nokta alan (dot blot) en çok kullanılan grafiklerdir. Nokta alan grafiğinde her bir nokta tek bir hücreyi göstermektedir. Bu grafikte iki farklı floresan antikoru da taşıyan hücreler belirlenir. Sağ üst kadranda her ikisinin de pozitif olduğu hücreler, sağ alt ve sol üst kadranda sadece tek bir floresan antikorumu taşıyan hücrelerin olduğu bölgeler bulunur. Sol alt kadranda her iki floresan antikoru da taşımayan hücreler vardır (85, 86, 87).

2.3.2. Manyetik Boncuklar ile Hücre İzolasyonu

Günümüzde çok basit tek tüp sistemlerinden çok karmaşık otomatik çoklu sistemlere kadar çok sayıda değişik kullanım amacına yönelik ticari manyetik ayırıcılar bulunmaktadır. Manyetik ayırım prosesi ise çeşitli formlarda tasarlanmış manyetik ayırıcılar ile gerçekleştirilmektedir. Manyetik ayırma sistemlerinde bir ya da daha fazla manyetik olmayan bileşen içeren karışım manyetik etiketle işaretlenir. Böylece işaretlenen bileşenin ortam arasında manyetik fark yaratılarak ayrılması sağlanır. Genel olarak hücre yüzeyindeki antijen bölgelerine özgün antikor kullanılmaktadır. Hücrelerin bu ayırıcı sistemlerde bulundukları ortamlardan saflaştırılması 3 temel adımda uygulanmaktadır (90, 91, 92).

1) İstenen hücreyi içeren örnek süspansiyonu manyetik etiketler ile karıştırılır. Bu aşamada manyetik etiketler ile hedef hücreler arasında etkileşim ve bağlanma için 30-60 dk. arasında bir inkübasyon zamanı beklenir. Daha sonra manyetik kompleksi içeren ortam manyetik ayırıcı kullanılarak ortamdaki diğer bileşenlerden ayrılır. Ve süpernatant uygun yöntemler kullanılarak ortamdaki diğer bileşenlerden uzaklaştırılır.

2) Manyetik kompleks ortamdaki istenmeyen unsurların uzaklaştırılması için bir iki kez uygun tamponlar kullanılarak yıkanır. Bu aşamadan sonra hücreler istenilen amaca uygun olarak kullanılabilir.

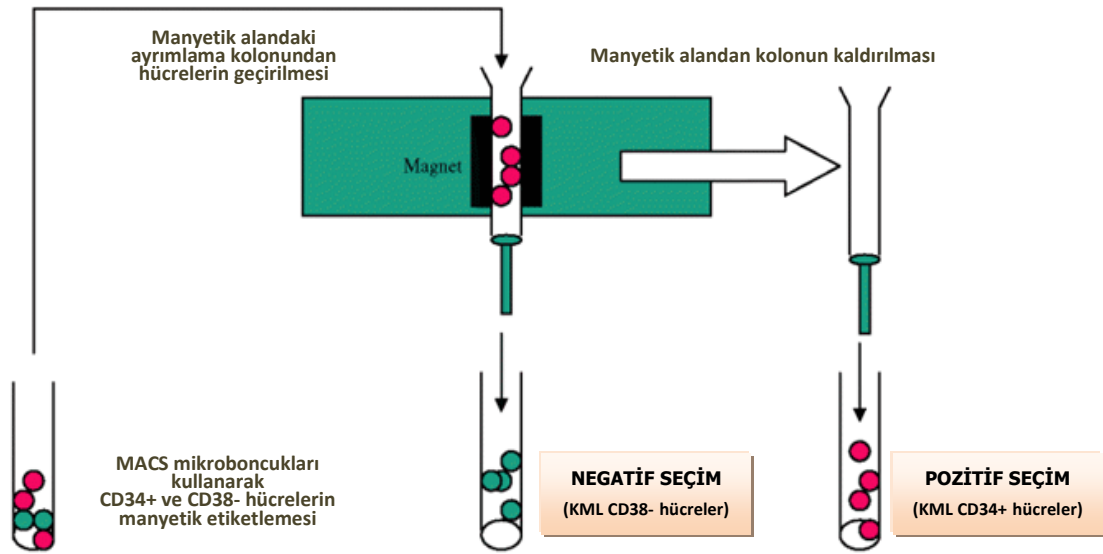
3) Seçilen uygulamanın amacına uygun olarak manyetik etiketin hedef hücre saflaştırılması gerçekleştirildikten sonra hedef hücreden ayrılması da gerçekleştirilebilmektedir.

Manyetik teknikler ile hücre izolasyonunda genel olarak iki çeşit uygulama yöntemi tercih edilir (93).

1- *Doğrudan ve dolaylı ayırım metodları:* Ortamda izole edilmesi istenen hücre özgün primer ligand taşıyan manyetik etiketlerle işaretlenir. Belirli süre inkübasyondan sonra

manyetik partiküllere bağlı primer ligand spesifik hücre reseptörü ile etkileşir ve etkileşim kompleksi bir mıknatıs kullanılarak ortamdan ayrılır. Dolaylı ayırım metodunda ise ortamdan izole edilmesi istenen hücre uygun bir primer afinite ligandı ile işaretlenir. Bu primer liganda özgün sekonder afinite ligandı taşıyan manyetik partikül inkübasyon süresince primer ligand ile birleşir ve manyetik ayırıcı yardımı ile istenilen hücrenin ortamdan izole edilmesini sağlar.

2- *Pozitif ve negatif seçim metodu (Şekil 15):* Pozitif ve negatif seçim metodları ortamda hangi hücrenini önce seçileceği esasına dayanmaktadır. Negatif seçimde izolasyonu istenmeyen hücreler manyetik işaretlenir, böylece mıknatıs altında istenmeyen hücreler tutunurken, izolasyonu istenen hücreler manyetik işaretlenmedikleri için yıkama işlemleri ile birlikte sistemi terk ederler. Hem doğrudan hem de dolaylı ayırım metodları negatif seçim metoduyla kullanılabilir. Negatif seçimin kendi içinde birtakım kısıtlamaları bulunmaktadır. Eğer izolasyonu istenen hücre ortamda oldukça az bulunuyorsa, negatif seçim metodu izolasyonda yabancı hücre kontaminasyonuna ve dolayısıyla düşük verime neden olabilmektedir.



Şekil 15: Manyetik olarak aktive edilen hücre ayırımı (MACS) sisteminin şeması (www.medscape.com).

Pozitif seçim yönteminde ortamdan izole edilmesi istenen hücre manyetik olarak işaretlenir ve böylelikle mıknatıs altında tutulabilmektedir. Yıkama işlemi sonunda istenmeyen hücreler ortamdan uzaklaştırılır. Sistemden en son çıkan izole edilmesi istenen özgün hücredir. Bu seçim yönteminde de hem doğrudan hem de dolaylı ayırım yöntemleriyle birlikte kullanılabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Araştırma deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırma Mayıs 2013 tarihinde literatür tarama ile başlamış olup; etik kurul onayı Ekim 2013 tarihinde alındıktan sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Laboratuvarlarında deneyler yapılmış ve Mart 2016 tarihinde sonlandırılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Çalışma Grupları:

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Yusuf Baran'dan 04.02.2014 tarihinde; imatinibe duyarlı, Philadelphia kromozomu-pozitif K562 insan kronik myeloid lösemi hücreleri ile imatinibe dirençli, Philadelphia kromozomu-pozitif K562 insan kronik myeloid lösemi hücreleri (K562/IMA-3) sağlanmıştır. K562/IMA-3 insan kronik myeloid lösemi hücreleri, Prof. Dr. Yusuf Baran ve ekibi tarafından, K562 hücrelerinin yaklaşık 2 yıl süreyle, 3 µM dozunda tekrarlı imatinib uygulamalar sonucunda imatinibe dirençli hale getirilmiştir. Çalışmamızda, iki hücre hatlarından *in vitro* olarak KML kök hücre hattı oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla RPMI-1640 ortam, diferansiye edici ortam, diferansiye etmeyen ortam ve lösemik kök hücre ekspansiyon edici ortamlar olmak üzere dört ayrı hücre kültüründe, K562 (imatinibe duyarlı) ve K562-IMA-3 (imatinibe dirençli) KML hücrelerinden ayrılan LKH'leri ayrı ayrı olarak bu dört ortamda (toplam sekiz grup) üretilmek için gruplandırılmıştır.

3.4. Çalışmanın Materyali:

İmatinibe duyarlı Philadelphia kromozomu-pozitif K562 insan Kronik myeloid lösemi hücreleri ve 3 µM imatinib'e maruz bırakılarak dirençli hale getirilen Philadelphia kromozomu-pozitif K562 insan Kronik myeloid lösemi (K562/IMA-3) hücreleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nden temin edilerek uygun hücre kültür şartlarında üretildikten sonra, FACS ve MACS metodlarıyla izole edilerek elde edilen lösemik kök hücreleri araştırma materyali olarak kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Çalışmanın ilk basamağı olan K562 ve K562/IMA-3 hücre hatlarında FACS ve MACS metodları ile lösemik kök hücre eldesi aşamasında “bağımsız değişkenler” hücre hatları iken, “bağımlı değişkenler” elde edilen lösemik kök hücreleridir. Daha sonraki aşama olan, lösemik kök hücrelerin dört farklı besiyeri ortamında üretilmesi aşamasında ise, besiyerleri “bağımsız değişkenler”, lösemik kök hücreleri ise “bağımlı değişkenleri” oluşturmaktadır. En son aşama ise, “bağımsız değişkenler” olan K562 ve K562/IMA-3 hücre hatları ile bu hücre hatlarından elde edilen lösemik kök hücrelerinde, CD paneli ile bakılan markerlar, telomeraz mRNA miktarları, BCR-ABL mRNA miktarları “bağımlı değişkenler; yine “bağımsız değişken” olan lösemik kök hücrelerinin Alkalen Fosfataz boyama ile gösterilen alkalen fosfataz tayini “bağımlı değişkeni” temsil etmektedir. Ayrıca lösemik kök hücrelerinin transferi ile Nude farelerde tümörojenite deneyinde “bağımsız değişkenler” lösemik kök hücreleri iken, “bağımlı değişkenler” oluşan tümör miktarlarıdır.

3.6. Veri Toplama Araçları:

3.6.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.6.1.1. Kullanılan Cihazlar

- CO₂ İnkübatörü (Nüve FN500)
- Laminar Air Flow (Nüve)
- Inver Mikroskop (Olympus)
- Işık Mikroskobu (Nikon E400)
- Soğutmalı Santrifüj (2.0 RS Biofuge stratos, Heraus)
- 4°C Buzdolabı (Arçelik 450 lux)
- (-20°C) Dondurucu (Ufuk)
- (-80°C) Dondurucu (Thermo Science)
- Akım Sitometri Cihazı (BD Accuri C6)
- MiniMACS manyetik hücre ayırıcı (Miltenyi Biotec GmbH)

- Hücre Sayma Kamarası (Hycor)
- Motorlu Pipet (Isolab)
- Motorlu Pipet (DiaMed)
- Vorteks (IKA) (Biovortex V1)
- pH Metre (710A, Orion)

3.6.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Steril Pipetler (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) (Greiner)
- 25 cm² hücre kültür Flaskı (Biofil CFT 025)
- 75 cm² hücre kültür Flaskı (Biofil CFT 075)
- Pipet Uçları (mavi ve sarı) (Barrier100)
- 15 ml vida kapaklı Konik Tüp (Falkon)
- 50 ml vida kapaklı Konik Tüp (Falkon)
- Eksrasellüler Matsiks Kaplı Flask (Celprogen)
- Ependorf tüpleri (2mL) (Greiner)
- Cryo vialler (2mL) (Greiner)
- Polilizinli lam (Isolab)
- Steril Pastör Pipeti (Greiner)

3.6.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- RPMI-1640 Hücre Besiyeri Ortamı (Biochrom F1215)
- Lösemik Kök Hücre Kültür Ortamı (Celprogen)
- Diferansiye Edici Ortam (Celprogen)
- Diferansiye Etmeyen Ortam (Celprogen)
- CD34+ Expansion Supplement (StemSpam, StemCell)
- Lösemik Kök Hücre Dondurma Ortamı (Celprogen)

- Fetal dana serumu (Biochrom S0113)
- L-Glutamin (Biochrom K0282)
- Penisilin / Streptomisin (Biochrom A213)
- DiMetil Sülfoksit (Aplchem A3670)
- Alkalen Fosfataz İHC Kiti (Millipore, Miltenyi Biotec)
- Anti CD34 Manyetik İzolasyon Kiti (Invitrogen DynaBead)
- Anti CD38 Manyetik İzolasyon (Miltenyi MicroBead)
- Anti CD34 Antikoru (E-Bioscience)
- Anti CD38 Antikoru (E-Bioscience)
- Anti CD123 Antikoru (E-Bioscience)
- Bcr-Abl Translokasyon Deteksiyon Pcr Kiti (Roche)
- Telomeraz Pcr Kiti (Roche)
- Mikoplazma Deteksiyon Elisa, Pcr Kiti (Roche)
- Steril PBS (Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen) (SigmaAldrich)
- Dna / Rna İzolasyon Kiti (Roche)
- Deionize edilmiş H_2O , HCl ,NaOH (1 N)
- Paraformaldehit (SigmaAldrich)

3.6.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

3.6.2.1. RPMI-1640 Besiyerlerinin Hazırlanması

400 ml RPMI-1640 besiyeri içerisine, 100 ml fetal dana serumu (FCS) (%20), %1 penisilin / streptomisin ve 2 mM L-glutamin ilaveli olacak şekilde hazırlandı.

3.6.2.2. Diferansiye Edici Besiyerinin Hazırlanması

400 ml Diferansiye Edici besiyeri içerisine, 100 ml fetal dana serumu (FCS) (%20), %1 penisilin / streptomisin ve 2 mM L-glutamin ilaveli olacak şekilde hazırlandı.

3.6.2.3. Diferansiye Etmeyen Besiyerinin Hazırlanması

400 ml Diferansiye Etmeyen besiyeri içerisine, 100 ml fetal dana serumu (FCS) (%20), %1 penisilin / streptomisin ve 2 mM L-glutamin ilaveli olacak şekilde hazırlandı.

3.6.2.4. Lösemik Kök Hücre Ekspanse Edici Besiyerinin Hazırlanması

400 ml Lösemik Kök Hücre besiyeri içerisine, 100 ml fetal dana serumu (FCS) (%20), %1 penisilin / streptomisin ve 2 mM L-glutamin ilaveli olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu besiyerinin 90 ml'ine 10 ml CD34+ Expansion Supplement ilave edildi.

3.6.2.5. Alkalen Fosfataz Deneyi için %4'lük Fikzatif Hazırlanması

Alkalen Fosfataz deneyinde formaldehit esaslı fiksatif, doku ve hücrelerin tespiti için kullanır. 1 L % 4 formaldehitin için, bir cam behere 800 ml 1X PBS (0.137 M NaCl, 0.05 M NaH₂PO₄, pH 7.4) çözücünün kaynamamasına dikkat edilerek, yaklaşık 60 °C'ye kadar ısıtılırken karıştırıldı. Isıtılmış PBS çözeltisine 40 g paraformaldehit tozu eklendi. Çözelti netleşene kadar bir pipetle 1 N NaOH damla damla ilave edilerek pH değeri ayarlandı, çözelti soğutuldu, filtre edildi ve +4°C'de saklandı.

3.6.2.6. Manyetik Hücre Ayırma Deneyi için İzolasyon Tamponu Hazırlama

Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen %0.1 PBS 2 mM EDTA ile karıştırılarak, pH7.4'e ayarlandı.

3.6.2.7. Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS) Hazırlama

150mM NaCl, 10 nM Na PO₄ eklenerek, pH: 7,4'e ayarlandı, +4°C'de saklandı.

3.6.3. Hücre Kültürü

Süspansiyon kültür özelliği gösteren K562, K562/IMA-3, K562 kök ve K562/IMA-3 lösemik kök hücreleri kültür kabına yapışma göstermezler. Süspanse halde bulunan kültür içindeki hücreler oval ve yuvarlak görünümlüdürler.

3.6.3.1. Hücrelerinin Pasajlanması

Hücreler pasajlanabilmesi için hücre kültür flaskları konfluent olmalıdır. Hücreler, T3 (25ml) ve T4 (75ml) steril ortam kaplarında ve tüm işlemler, steril biyogüvenlik sınıf 2

kabinetin içerisinde gerçekleştirildi. Güvenlik önlemlerine dikkat edilerek CO₂ etüvünde (37°C; %5 CO₂) çoğaltılarak kültüre edildi ve laboratuvar şartlarına uyumu sağlandı. Kùltürler günlük olarak kontrol edildildi, besiyerinin rengi ve morfolojisi ile hücrelerin yoğunluğu gözlemlendi.

Yöntem

- 1) Ortalama 3 günde, hücre süspansiyonu doku kültür flasklarından steril tüp içine alındı.
- 2) 1000 rpm'da 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.
- 3) Alttaki hücre pelleti serumdan arındırılmak için 2 ml PBS (fosfat tamponu) ile pipetlenerek yıkandı.
- 4) Sonra, 1000 rpm'da 10 dk tekrar santrifüj edildi.
- 5) Daha sonra hücre pelleti medyum ile resüspanse edilip, sayıldı ve kültür flasklarına transfer edildi.
- 6) İlk pasajlamada hücrelerin yarısı donduruldu, yarısı pasajlandı.
- 7) Pasajlamalarda karşılaştırmalı olarak hücrelerle beraber medium alınıp, 2 tane flaska ikiye bölünerek aktarıldı.
- 8) Her 2 flaskın üzerine alınan kadar yarı (1/2) ölçü yeni medium eklendi.

3.6.3.2. Hücrelerin Dondurulması

Daha ileri çalışmalar için gerekli olabileceği düşünöldüğünden ve hücrelerin canlılığının devam etmesi ve hücre hatlarının devamlılığının korunması için hücreleri koruma altına almak amacıyla, hücrelerin yarısı ilk pasajlamada donduruldu.

Yöntem

- 1) Hücreler, 50 ml'lik falkon tüp içine flask içeriğinin tamamı alındı.
- 2) Daha sonra 1000 rpm'da 5 dk santrifüj edildi.
- 3) Süpernatant atıldıktan sonra pellet, 5 ml 1X PBS ile resüspanse edildi.
- 4) Tekrar 1000 rpm'da 5 dk santrifüj edildi.
- 5) Santrifüj sırasında kriyovialler buz üzerine alındı.

- 6) Santrifüjden sonra süpernatant atıldı, tüp buz üzerine alındı.
- 7) Daha sonra pellet 1 ml besiyerinde sulandırılarak sayıldı.
- 8) Pelet, 5.4 ml FBS (%90) ve 600 µl DMSO (%10)'da resüspanse edildi.
- 9) Solüsyon buz üzerinde karıştırıldı ve hücre süspansiyonundan 1,5 ml her bir kriyovial içine alındı ve 30 dk 4°C'de, daha sonra -20°C'de bekletildikten sonra, -80°C'ye saklanmak üzere aktarıldı.

3.6.3.3. Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi

- 1) Daha önce dondurulmuş olan her iki hücre hattının bulunduğu (K562 ve IMA-3) kriyoviyaller 37⁰C'de, hızlı bir şekilde çözüldü.
- 2) Kriyoviyalin içindeki hücre süspansiyonu besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarıldı.
- 3) Tüp 1500rpm'de 7 dk. santrifüj edildikten sonra üst kısım atıldı.
- 4) Pelete 1 ml medyum eklenerek hücrelerin iyice çözünmeleri sağlandıktan sonra üzerine besiyeri eklenerek daha önce tarif edildiği gibi hazırlanan RPMI-1640 besiyerinde kültür kabına alınarak tekrar çoğaltıldı.

3.6.3.4. Hücrelerin Sayımı ve Hücre Canlılık Testi

Tripan Blue hücre canlılık testi, canlı hücrelerin boyayı membranlardan içeri geçirmeme prensibine dayanmaktadır. Hücrelerin canlılık testi Tripan mavisi boyama yöntemi kullanılarak yapıldı.

Yöntem

- 1) Hücrelerin sayımı için hücreler 1:1 oranında taze besiyeri / PBS ile seyreltildikten sonra yaklaşık 3 dakika beklendi.
- 2) Neuber–hemositometreye alındı.
- 3) Hemositometredeki dört karedeki hücreler ışık mikroskobu altında sayılıp ortalaması alındıktan sonra çıkan sayı Dilüsyon Etkeni x 10⁴ ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı (hücre/ml) bulundu.

3.6.3.5. Hücre Kültüründe Mikoplazma Kontaminasyonunun Aranması

Hücre hattı üretiminde mikoplazma kontaminasyonu açısından kültürün temiz olduğunun gösterilmesi gerekir ve bu, hücre hattının kalite kontrol testlerinden biridir. Bu açıdan üretilen hücreler, “Roche Applied Science Mycoplasma Detection Kit” kullanılarak mikoplazma kontaminasyonu açısından test edildi.

Yöntem

- 1) Deneye başlamadan önce kitin içindeki tüm ajanlar 15-25 °C’ye getirildi.
- 2) 16 kuyucuklu mikroplate, 4 mikoplazma türü için 8, negatif kontrol için 4, pozitif kontrol için 4 kuyucuk olmak üzere ayrıldı.
- 3) Mikroplatenin her 4 kuyucuğuna 0,25 ml kendi kaplama antikoruna eklendi (vial 1a: ilk 4 kuyucuğa, vial 1b: ikinci 4 kuyucuğa, vial 1c: üçüncü 4 kuyucuğa, vial 1d: dördüncü 4 kuyucuğa).
- 4) Mikroplate sıkıca kapatılıp 2 saat 37 °C’de inkübe edildi.
- 5) İnkübasyon sonrası, bloklama solüsyonundan (vial 2) 0,25 ml, tüm antikorla kaplı kuyucuklara pipetlenir ve 30 dk 37 °C’de inkübe edildi.
- 6) İnkübasyon sonrasında 3X yıkama buffer (vial 3) ile kuyucuklar yıkandıktan sonra, tamamen uzaklaştırıldı.
- 7) Mikroplatenin 8 kuyucuğu örnek, 4 kuyucuğu pozitif kontrol ve 4 kuyucuğu ise negatif kontrole ayrılmak üzere 0,2 ml olarak pipetlenir ve mikroplate sıkıca kapatılarak 2-4 °C’de 1 gece inkübe edildi.
- 8) 5. basamakta tanımlandığı gibi yıkama yapıldı.
- 9) Detection-antibody solüsyonu (vial 6a-d), her bir antikora ayrılan 4 kuyucuğa 0,2 ml olarak ayrı ayrı uygulandı (ilk 4 kuyucuğa vial 6a: ikinci 4 kuyucuğa vial 6b: üçüncü 4 kuyucuğa vial 6c: dördüncü 4 kuyucuğa vial 6d).
- 10) Mikroplate sıkıca kapatılıp 2 saat 37 °C’de inkübe edildi.
- 11) İnkübasyon sonrası yıkama buffer solüsyonu ile 4X yıkandıktan sonra buffer tamamen uzaklaştırıldı.

- 12) 16 kuyucuğun her birine 0,2 ml Streptavidin-AP solüsyonu (vial 7) pipetlendikten sonra, mikropate sıkıca kapatılıp 1 saat 37 °C’de inkübe edildi.
- 13) İnkübasyon sonrası yıkama buffer solüsyonu ile 3X yıkandıktan sonra, buffer tamamen uzaklaştırıldı.
- 14) Daha sonra, 16 kuyucuğun her birine 0,2 ml Substrate solüsyonu (vial 8) pipetlendikten sonra, mikropate sıkıca kapatılıp 30 dk 18-25 °C’de inkübe edildi.
- 15) 405 nm’de mikropate okuyucusunda ölçüldü.

3.6.4. Akım Sitometrik Analiz

Bu çalışmada Flow Sitometrik analiz ile, LKH’lerinin izolasyonunun yanısıra, CD Paneli ve Hücre Siklus analizleri de yapılmıştır.

3.6.4.1. CD Paneli Analizi

Çalışmamızda Lösemik kök hücrelerinin, kök hücre özelliğini koruyarak çoğalıp-çoğalmadığı Flow Sitometrik analiz ile CD paneline bakılarak test edildi. Daha sonra Akım Sitometrik analiz ile CD34+ / CD38- lösemik kök hücre oranı belirlenerek çoğalan lösemik kök hücrelerin konfirmasyonu sağlanmıştır.

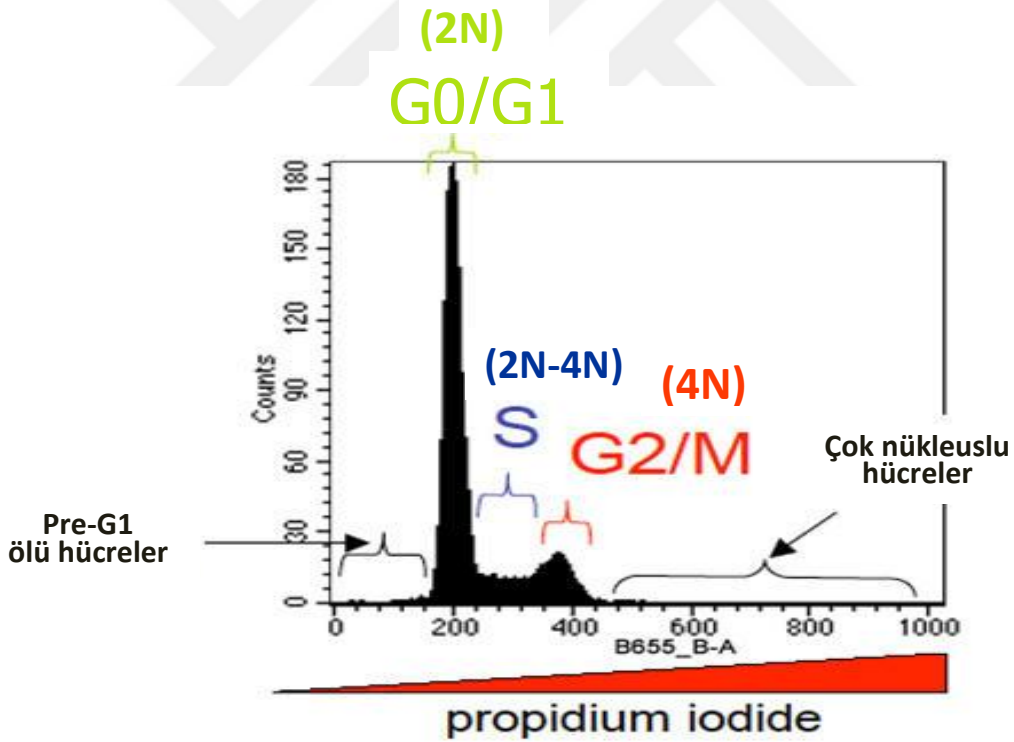
Yöntem

- 1) Hücreler 1300 rpm’de 7 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- 2) Pelet resüspanse edildikten sonra test tüplerine 100 µl halinde konuldu.
- 3) İlgili tüplere 20’er µl monoklonal antikorlar ilave edildi.
- 4) Başka bir test tüpüne aynı şekilde antikorların izotopik kontrolleri eklendi.
- 5) Oda ısısında ve karanlıkta 15 dk inkübe edildikten sonra akım sitometri cihazında analiz gerçekleştirildi.

3.6.4.2. Hücre Siklus Analizi

DNA içeriği plooidinin ifadesi olarak hesaplanır. Bir hücre popülasyonunda DNA miktarı, kromozom sayılarına bağlı olmalıdır. Diploid örnekler için 46, tetraploid örnekler için 92’dir. Flow sitometri DNA analizinden G0 ve G1 hücrelerinin DNA content değeri ve

hücre siklusunun fazlarında kaç hücrenin olduğu bilgisi sağlanır ve hücrenin proliferatif aktivitesi de belirlenebilmektedir. Popülasyonundaki hücreler propidium iodide gibi DNA'ya spesifik fluorokromla işaretlenir ve elde edilen floresan yoğunluğu doğrudan doğruya hücrenin içerdiği DNA miktarına orantılıdır. Hücre popülasyonundaki DNA ölçümü hücre siklusunun bölümlerine göre 3 faza ayrılır: G0/G1, S ve G2+M. Siklusun G0/G1 hücreleri daima büyük fraksiyonda toplanırlar ve diploid DNA içeriğine (2N) sahiptirler. Bölünmeyen hücrelerde ve dinlenme halindeki hücrelerde (G0/G1) DNA içeriği diploid sayıdadır. Hücreler siklusun G2 ve M fazına ulaştıklarında DNA içeriği iki katına çıkar. Bunlar G0/G1 pikinden ve orijinden uzakta yer alırlar. S fazı DNA'nın sentezlendiği duplikasyon fazıdır. Siklusun S fazındaki hücreler 2N-4N arasında DNA içeriğine sahip olup G0/G1 ve G2/M pikleri arasında yer alır. Şekil 14'de Flow sitometri ile Hücre siklus analizinin histogramı görülmektedir; ilk pik G0/G1 fazındaki hücre popülasyonunu ve yanındaki küçük pik ise G2+M fazındaki hücreleri gösterir. Aradaki mesafede ise S fazındaki hücreler yer alır (Şekil 14) (94, 95, 96).



Şekil 16: Flow Sitometri Hücre Siklus analizinin histogram görüntüsü (www.medscape.com).

Yöntem

- 1) Hücreler santrifüj edildikten sonra üst kısmı atıldı. Dipte kalan çökeltideki hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak deterjan (nükleusu serbestleştirmek için), propidium

iodide (DNA'ya spesifik fluorokromla işaretlemek için) ve RNaz içeren bir tampon ile resüspanse edildi ve analiz edildi.

- 2) DI'i, histogramından elde edilen G0/G1 fazındaki diploid piklerin ortalamasının, diploid referans hücrelerin G0/G1 piklerin ortalamasına bölünmesiyle hesaplandı.

3.6.5. Akım Sitometri ile Hücre Ayırma Metodu

FACS (Fluorescence-activated cell sorting = Floresan ile aktive edilen hücre ayırımı) yöntemi ile İmatinibe duyarlı K562 ve imatinibe dirençli IMA-3 insan KML hücrelerinden, CD34+, CD38- ve CD123+ fenotipindeki lösemik kanser kök hücrelerinin izolasyonu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Eğitim Laboratuvarı (AREL)'de FACS Calibur akım sitometre (BD Sciences) cihazında yapıldı. Lösemik kanser kök hücrelerinin izolasyonu için lazer ışığı ile aktif hale geçerek ışın yayan farklı fluorokrom işaretli monoklonal antikorları kullanıldı. Bunun için; fluorescein isothiocyanate (FITC) konjuge anti-CD34, phycoerythrin (PE) konjuge anti-CD38 ve allophycocyanin (APC) konjuge anti-CD123 monoklonal antikorları ve uygun izotip kontrolleri kullanıldı. Böylece Flow Sitometrik analizi ile CD34+/CD38-/CD123+ LKH'lerinin oranı belirlenerek MACS yönteminin konfirmasyonu sağlanırken aynı zamanda, FACS yönteminin de MACS ile hücre izolasyonunun verimliliği açısından karşılaştırılması yapılmıştır.

Yöntem

- 1) Kültür kabında belli sayıya ulaşan KML hücreleri, kültür medyumunu içeren tüplere aktarılıp santrifüj edildi.
- 2) Santrifüj sonrası pellet çözülür ve hücreler sayıldıktan sonra 2×10^7 olacak şekilde kendi medyumunu ile süspanse edildi ve test tüplerini içine konuldu.
- 3) Daha sonra 20'er µl CD34-FITC, CD38-PE ve CD123-APC monoklonal antikorları ilave edildi. Başka test tüpüne de aynı miktarda antikorların izotopik kontrolleri eklendi. Tüm tüpler oda ısısında ve karanlık ortamda 20dk inkübe edildi.
- 4) İnkübasyon sonrası bağlanmayan antikorların ortamdan uzaklaştırılması için tüplere 2 ml yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azide içeren PBS) eklendi. 5 dk 1300rpm'da santrifüj edildi ve süpernatant atılarak artefaklardan temizlendi.

- 5) Boyama işleminden sonra hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometre cihazında (BD Sciences) okutuldu ve BD Cell Quest™ software programı ile analiz edildi.
- 6) Hücreler izole edilir edilmez sayıldı, ekstrasellüler matriks kaplı 25 cm²'lik kök hücre flasklarına ekildi ve RPMI-1640, diferansiye, undiferansiye ve LKH ekspansiyon ortamlarında çoğaltıldı.

3.6.6. Manyetik Partiküller ile Hücre Ayırma Metodu

MACS (Magnetic-activated cell sorting = Manyetik ile aktive edilen hücre ayırımı) yöntemi ile CD34+/CD38- LKH'leri Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Laboratuvarında izole edildi. K562 ve K562/IMA-3 hücrelerinden sırasıyla "CD38 MicroBead" ve "CD34 Invitrogen DynaBead" kitleri kullanılarak CD34+CD38-, CD34+CD38+ hücre fraksiyonları elde edilmiştir. Yöntem üretici firmanın belirttiği şekilde uygulanmıştır. Önce negatif seçim ile CD38- hücreler elde edildikten sonra, pozitif seçimle CD34+ hücreler elde edilerek CD34+CD38- LKH subpopülasyonu elde edildi.



Şekil 17: Manyetik partiküller ile ayırmada kullanılan magnet.

3.6.6.1. Negatif Seçim Yöntemi

İstenilen hücrelerin işaretlenmeyip, istenmeyen hücrelerin işaretlenerek elimine edilmesinin yapıldığı hücre ayırma yöntemidir. Bu yöntem ile ayırımı yapılan hücreler el değmemiş hücrelerdir. CD38- hücreler bu yöntemle ayrıldı. Böylece ayırımı yapılmak istenen hücreler daha az tahrifata maruz kalarak elde edildi.

- 1) Tüm işlemler sınıf II Laminar Air Flow kabinesi içinde gerçekleştirildi. Kabinin içinde magnet ve kolon sistemi kuruldu.

- 2) Hücreler 1200rpm'da 7 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatant atıldıktan sonra, 80 µl izolasyon tamponu içinde resüspanse edildi.
- 3) 1ml'de 1×10^7 hücre başına 20 µl CD38-Biotin antikoru ilave edildi.
- 4) İyice karıştırılıp 10 dk +4 °C'de inkübe edildi.
- 5) Hücrelere 2 ml izolasyon tamponu koyup 200xg'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- 6) Hücreler 80 µl izolasyon tamponu içinde resüspanse edilip 1×10^7 hücre başına 20 µl Anti-Biotin MicroBead eklendi. K562 hücreleri için 100 µl, K562/IMAR-3 hücreleri için 140 µl eklendi.
- 7) İyice karıştırılıp 15 dk +4 °C'de inkübe edildi.
- 8) 4. ve 5. adımlar tekrarlandı.
- 9) Hücreler 500 µl izolasyon tamponunda resüspanse edildi.
- 10) Kolona da 500 µl izolasyon tamponu konularak, kolonun ıslanması sağlandı.
- 11) Kolon tamponla yıkandıktan sonra hücre süspansiyonu kolonun tepesinden eklendi.
- 12) Kolonun altına bir tüp tutularak kolondan doğrudan geçen hücreler (CD38-) toplandı.
- 13) Kolona yukardan hücre süspansiyonu her seferinde 500 µl kadar eklenerek hücreler bitinceye kadar devam edildi.
- 14) İşlem bitince kolon magnetten çıkarıldı ve üzerine 500 µl kadar eklenerek, kolonun ucuna başka bir tüp konuldu.
- 15) Kolonun arkasına enjektör şeklindeki pompası yerleştirilerek, kolonun içindeki tüm hücreler boşaltıldı. Kolondan boşaltılan, boncuk bağlı bu hücreler CD38+ hücreler olup, bunlar LKH'leri değildir.

3.6.6.2. Pozitif Seçim Yöntemi

Bu yöntemde istenilen (hedef) hücreler işaretlenerek, istenmeyen hücrelerin ise işaretlenmeyerek elimine edildiği hücre ayırma yöntemidir.

- 1) CD38- olan hücreler ayrıldıktan sonra 250xg'de 7 dk santrifüj edildi, süpernatantı atıldı.

- 2) Hücre sayısı 1ml'de maksimum 1×10^8 olacak şekilde izolasyon tamponu ile süspanse edildi.
- 3) Toplam 10^8 hücre başına 100 μ l CD34 DynaBead ilave edildi ve 30 sn vortekslenerek iyice karıştırıldı.
- 4) +4 °C'de 30 dk inkübe edildi.
- 5) 100 μ l CD34 DynaBead'e 1 ml izolasyon tamponu koyup, magnet içine tüp yerleştirildi.
- 6) 1 dk beklendikten sonra süpernatant atıldı (boncukların magnete tutunduğunu gözlemlemek önemlidir. Tutunmanın olmadığı taraftan süpernatant mikropipetle toplanarak atıldı).
- 7) Daha sonra tüp magnetten uzaklaştırıldı ve hücreler bu yıkanmış boncukların üzerine eklendi.
- 8) Daha sonra üzerine 1 ml soğuk izolasyon tamponu eklendi.
- 9) Tüp magnete yerleştirildi ve boncuk-bağlı hücrelerin magnete tutunduğu gözlemlendi.
- 10) 2 dk beklendikten sonra tüpü oynatmadan, tutunmanın olmadığı uçtan mikropipetle süpernatant (CD34- hücreler) uzaklaştırıldı.
- 11) Tüp magnetten uzaklaştırıldı ve 2 ml soğuk izolasyon tamponu eklendi.
- 12) 8. ve 9. adımlar tekrar edildi.
- 13) Tüpte geri kalan (kahverengi renkli olarak bağlı boncukların görüldüğü) hücrelerin üzerine 1 ml izolasyon tamponu ekleyerek resüspanse edildi.
- 14) 100 μ l DetachaBead eklenerek manyetik beadlerin hücrelerden ayrılması sağlandı
- 15) Tüpün ağzı parafinlenerek, oda sıcaklığında, 45 dk çalkalayıcıda çalkalanarak inkübe edildi.
- 16) Bu süre sonunda tüp üzerine 2 ml oda sıcaklığındaki izolasyon tamponu eklendi.
- 17) Tüp tekrar magnete yerleştirilerek, hücrelerden ayrılmış olan boncukların magnette asılı kaldığı görülerek, tutunmanın olmadığı taraftan hücrelerimiz (CD34+ CD38-) bir başka tüpte toplanarak Lösemik kök hücre ortamı ve matriks kaplı 25 cm²'lik flasklarda kültüre edildi.

3.6.7. Alkalen Fosfataz Boyaması

Alkalen fosfataz bir hidrolaz enzimidir. Nükleotidler, proteinler ve alkaloidler dahil olmak üzere çeşitli moleküllerden fosfat gruplarının koparılmasını yani defosforilasyonu sağlar ve en etkili alkali ortamlarda işlev görür. Alkalen fosfataz, farklılaşmamış pluripotent kök hücrelerin hücre zarında yüksek miktarda bulunur. Embriyonik kök ve embriyonal karsinom hücreleri gibi pluripotent hücreler alkalen fosfataz boyaması ile tespit edilebilmektedir. Alkalen fosfataz boyaması, bir kök hücre markeri olarak da kabul edilerek, pozitif boyanan hücreler diferansiye olmamış kök hücreler olarak kabul edilir.

Yöntem

Bu yöntemde Alkalen Fosfataz Kiti (Millipore, Miltenyi Biotec) kullanılmıştır. Kitin içinde bulunan, MixFast Red Violet ve Napithol, su ile 2:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

- 1) Hücreler ependorfa alındı ve 9000rpm'da 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- 2) Pelet, lizinli lama yayıldı ve hızla kurutuldu.
- 3) Üzerine %4 paraformaldehit (PBS'li) eklenerek maksimum 1-2 dk beklenerek hücreler fiske edildi.
- 4) Fikzatif Rinse Buffer ile yıkandı, üzerine Metanol eklenerek hızla kurutuldu.
- 5) Tekrar Rinse Buffer yıkandı, 2:1:1 oranındaki karışım solüsyonundan 0.5 ml eklendi.
- 6) 15 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
- 7) Tekrar Rinse Buffer ile yıkandı.
- 8) Kurumaması için üzerine 1xPBS eklendi ve mikroskop altında incelendi.

3.6.8. Telomeraz ve BCR/ABL Gen İfadelerinin Analizi

3.6.8.1. Hücre Kültüründen Total RNA Eldesi

K562 ve K562/IMA-3 kök hücrelerinden RNA izolasyonu, “High Pure RNA Isolation Kiti” kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre biyogüvenlik kabininde yapıldı.

Yöntem

- 1) Hücrelerin üzerine 200 μ L soğuk PBS ve 400 μ L Lizis tamponu eklenip 15 saniye vortekslendi.
- 2) Filtre, toplama tüpüne yerleştirilip tüm karışım filtre üstüne aktarıldı.
- 3) Tüp 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirildi.
- 4) Her bir örnek için 90 μ L DNaz inkübasyon tamponu steril tüpe alındı ve 10 μ L DNaz I eklendi.
- 5) Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra karışım filtrenin ortasına bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 6) 500 μ L'lik 1. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- 7) 500 μ L'lik 2. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 15 saniye 9000 rpm'de santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- 8) 200 μ L'lik 3. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 3 dk 13500 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. Filtre, steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 9) Filtre üzerine 20 μ L örnek seyreltme çözeltisi eklendi ve 9000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- 10) Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.6.8.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak random hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA için PCR karışımı (Tablo 2) ince çeperli 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra elde edilen total RNA eklendi.

Tablo 2: RT-PCR tepkime karışımı.

	Son Konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4µL
dNTP	1mM	2µL
Random hekzamer primeri	60µM	2µL
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5µL
Transkriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	0.5µL
Total RNA	1µg	1µg olacak şekilde

3.6.8.3. Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 3’de belirtilen programa ayarlanarak cDNA sentezi yapıldı. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR’da kullanılabilecek kadar -20 °C’lik derin dondurucuda saklandı.

Tablo 3: Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25°C	10dk	1
Ters Transkripsiyon	50°C	60dk	1
İnaktivasyon	85°C	5dk	1
Soğutma	4°C	-	1

3.6.8.4. Gen İfadesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

Telomeraz ve BCR-ABL genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) cihazında uygun primer ve prob kullanılarak gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4: Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	4.7µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
LC 480 Master karışımı		2.5µL
cDNA	-	1µL

3.6.8.5. Light Cycler (LC) Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96 kuyucuklu plate’ in her bir kuyusuna bir örnek gelecek şekilde dağıtıldı ve üzerine cDNA’ler eklendi. Plate cihaza

yerleştirildikten sonra Tablo 5’de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu, telomeraz ve BCR-ABL genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi ve normalize edildi.

Tablo 5: Telomeraz ve BCR-ABL genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	40	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10sn	20sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

3.6.9. Tümörojenite Deneyi

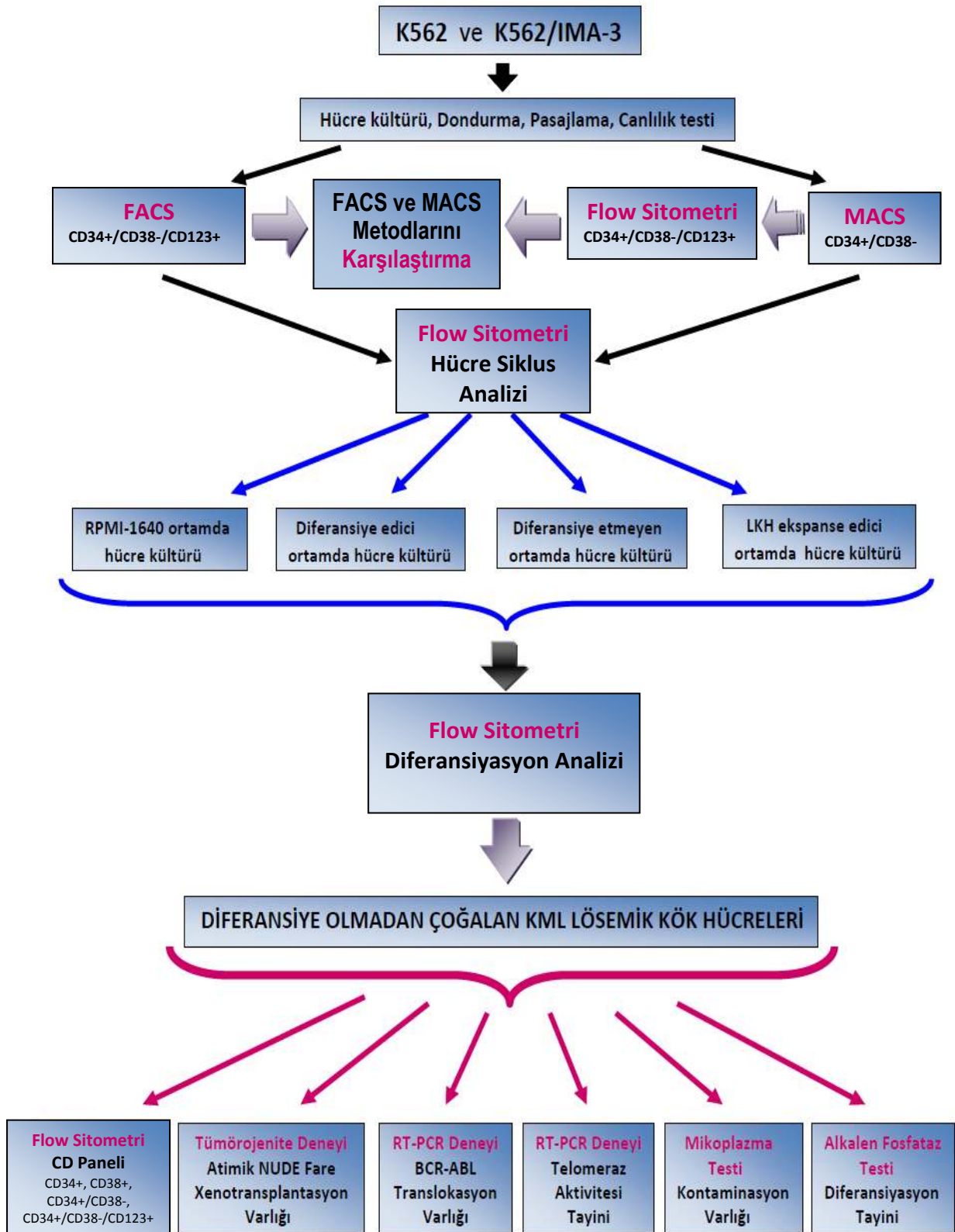
Çalışmamızda K562, K562/IMA-3 hücre dizilerinden LKH’ler izole edildikten sonra kültüre edilerek üretildi ve bu hücrelerin tümör başlatma potansiyelleri (tümörojeniteleri) yönünden hayvan modeli kullanılarak kök hücre özelliğinde olup olmadıkları konfirme edildi. Model olarak kullanılan iki tane 21 haftalık immündefisit Nude dişi fareler, Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalının laboratuvarından elde edilerek çalışıldı.

Yöntem

- 1) Her iki hücre hattından izole edilen CD34+ CD38+ kök hücre olmayanlar ve CD34+ CD38- kök hücre özelliği gösteren hücreler, iki ayrı Nude farenin 2 farklı bölgesine, steril şartlar altında 1×10^6 kadar hücre, 200µl konsantrasyondaki PBS ile süspanse edildikten sonra, 27 gaugelik iğneler ile subkutan olarak enjekte edildi.
- 2) K562 CD34+/CD38- kök hücre özelliğindeki hücreler farenin ense kısmına, K562 CD34+/CD38+ kök hücre özelliğinde olmayan hücreler aynı farenin sırt kısmına subkutan enjekte edildi.
- 3) IMA-3 CD34+/CD38- kök hücre özelliğindeki hücreler ise diğer farenin ense kısmına ve IMA-3 CD34+/CD38+ kök hücre özelliğinde olmayan hücreler aynı farenin sırt kısmına enjekte edildi.

3.7. Araştırma Planı:

- **Mayıs – Eylül 2013** ➔ Literatür taraması, projelendirme ve deneyin planlanması.
- **Eylül 2013 – Şubat 2014** ➔ Malzemelerin temini.
- **Şubat – Haziran 2014** ➔ Hücre kültürü, LKH ayırılama, konfirme etme.
- **Haziran – Ekim 2014** ➔ LKH kültürü, Ploidi analizi.
- **Ekim 2014 – Şubat 2015** ➔ LKH'lerde; Tümörojenite deneyi, CD paneli, Bcr-Abl translokasyon ve Telomeraz aktivite tayini, Alkalen fosfataz ve Mikoplazma tayini.
- **Şubat – Haziran 2015** ➔ Sonuçların analizi, değerlendirilmesi, literatür güncelleme, proje sonuç raporunun hazırlanması.
- **Haziran – Ekim 2015** ➔ Tez yazımı.
- **Ekim 2015 – Şubat 2016** ➔ Yayın haline getirme.
- **Mart 2016** ➔ Tez savunma sınavı.



Şekil 18: Projenin genel akış şeması.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi:

Bu çalışmada hemen her deney (FACS analizi hariç) en az iki tekrarla yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesi için FACS ve MACS metodlarının kök hücre eldesi yönünden verimlerinin karşılaştırılması açısından elde edilen LKH sayıları; ayrıca LKH'lerinin CD marker özellikleri açısından elde edildikleri iki kanser hücre hattını da içeren grafiksel gösterimi yapılarak analiz edildi. Yine LKH'lerinin translokasyon varlığı ve telomeraz aktivitesi açısından elde edilen mRNA miktarlarının izole edildikleri KML hücre hatları ile karşılaştırılması için grafiksel olarak gösterimi sağlandı. Alkalen fosfataz testi, LKH'lerinin (+) boyanmasının gösterilimi ile; mikoplazma testinin ise (-) olması ile değerlendirildi. LKH'lerinin tümör oluşturma kabiliyetleri ise transplante edilen Nude farelerde oluşturduğu tümör boyutları görüntülenerek değerlendirildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Bu çalışmanın, hasta sayısının ve zaman yetersizliği nedeniyle hastalardan alınan kan ve kemik iliği örneklerinden sağlanan primer hücre kültürleri ile KML kök hücre hattı üretim çalışması yapılamayışı eksikliğidir. Ancak hem tecrübe kazanım açısından hem de böyle bir çalışmanın uygulanabilirliği açısından bir ön çalışma niteliğinde olan çalışmamız ile bu aşamanın daha sonraki çalışmalarda uygulanabilir olduğu anlaşılmıştır. LKH'lerinin gerek çabuk diferansiye olmaları gerekse sessizleşmeleri nedeniyle üretim zorlukları, bu zorlukların zaman kaybına neden olması, KKH üretimi için gerekli tecrübe azlığı ve KKH'lerinin normal kök hücrelerle olan benzerlikleri bu araştırmanın diğer sınırlılıklarıdır. Çalışmanın, maddi nedenlerden dolayı daha fazla tekrarlarının yapılamaması kısıtlılığıdır. Ayrıca çalışma ile ilgili diğer bakımlardan sınırlamalar tartışma bölümünde ayrıntılı olarak değinilmiştir.

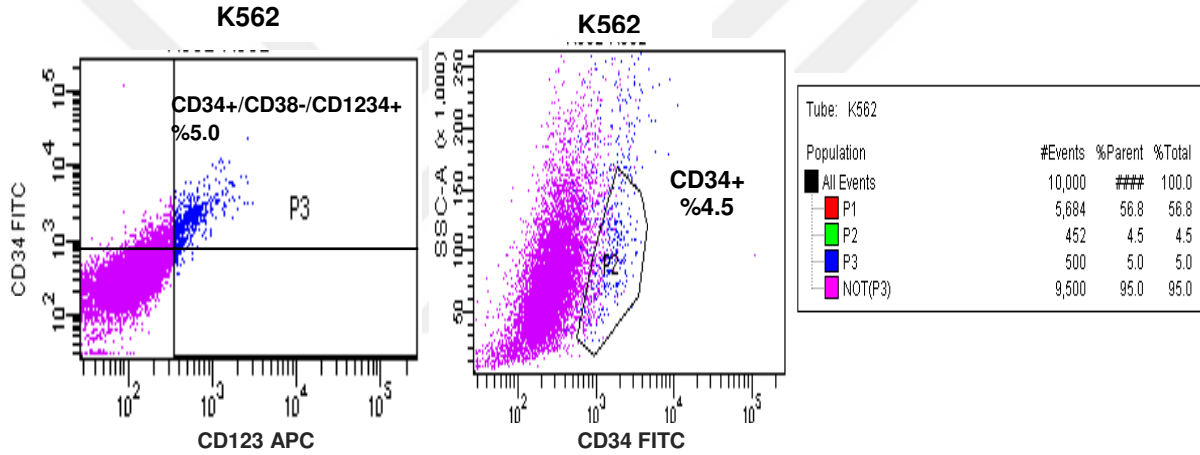
3.10. Etik Kurul Onayı:

Bu proje, 12.07.2012 tarih ve 618-GOA protokol numarası, 2012/25-10 karar numarası ile DEÜ Etik Kurul'undan onay almış olup, 10.10.2013 tarihinde 2013/37-16 karar numarası ile projeye doktora tezi sahibi araştırmacı olarak Dr.Sibel Azizenur Öztürk'ün kabulü onaylanmıştır. Ayrıca 19.02.2014 tarihinde 10/2014 karar numarası ile DEÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurul onayı alınmıştır (Ek 1, 2, 3).

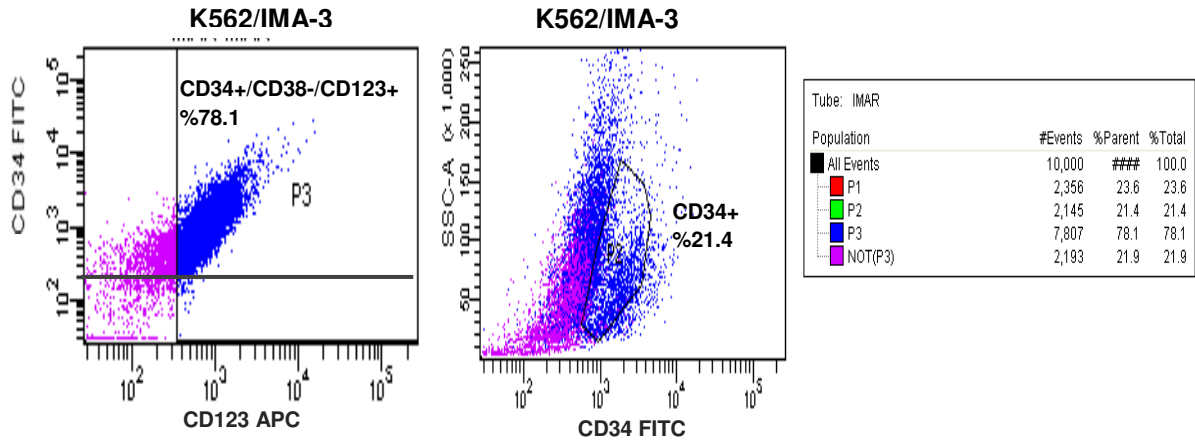
4. BULGULAR

4.1. FACS ve MACS Yöntemlerin Verimliliğinin Karşılaştırılması:

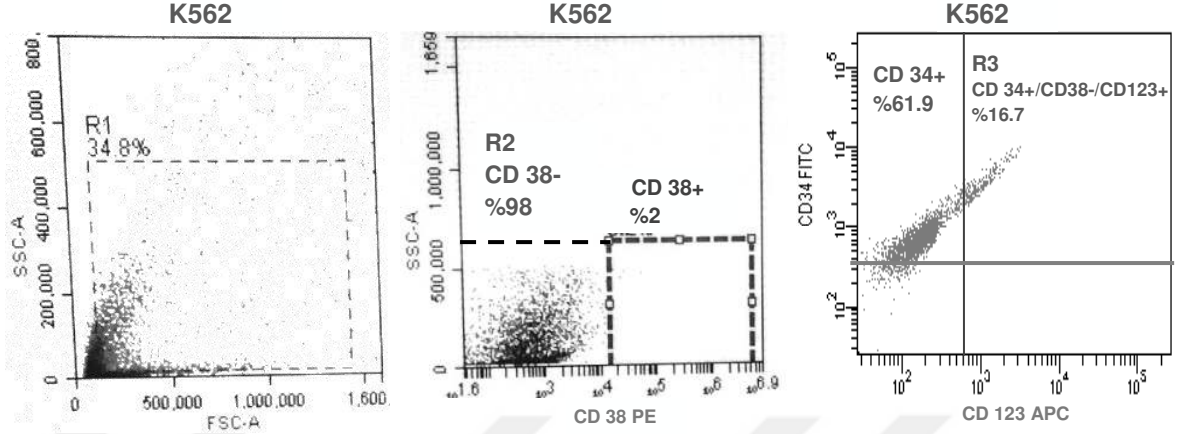
K562 ve K562/IMA-3 hücre hatları kültüre edilerek belli sayıya ulaşıldıktan sonra önce Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Eğitim Laboratuvarı (AREL)’de FACS (Fluorescence-activated cell sorting = Floresan ile aktive edilen hücre ayırımı) yöntemi ile CD34+/CD38-/CD123+ LKH’leri izole edildi (Şekil 19, 20). Daha sonra Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Laboratuvarında MACS (Magnetic-activated cell sorting = Manyetik olarak aktive edilen hücre ayırımı) yöntemi ile CD34+/CD38- LKH’leri izole edildi.



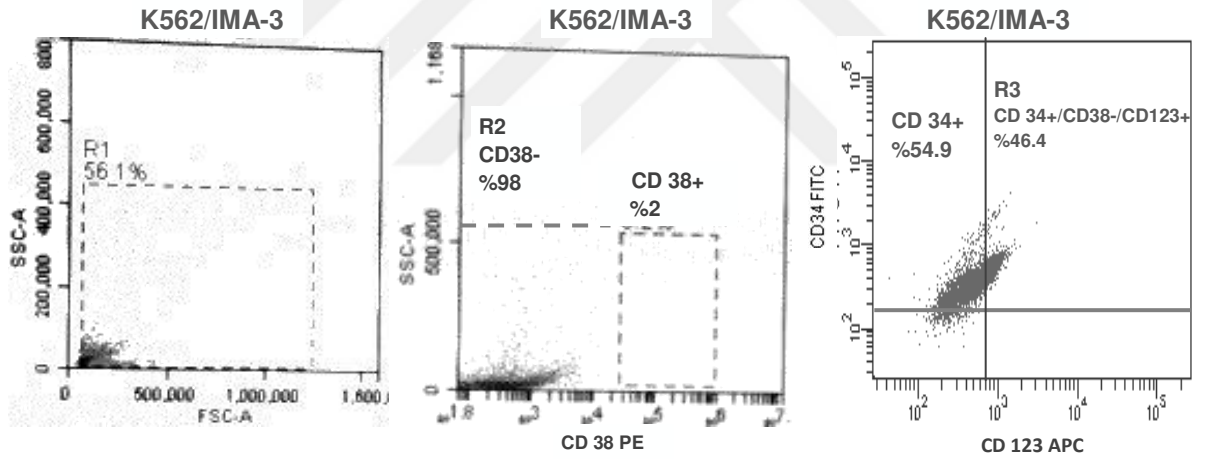
Şekil 19: K562 hücrelerinin FACS sonuçları.



Şekil 20: K562/IMA-3 hücrelerinin FACS sonuçları.

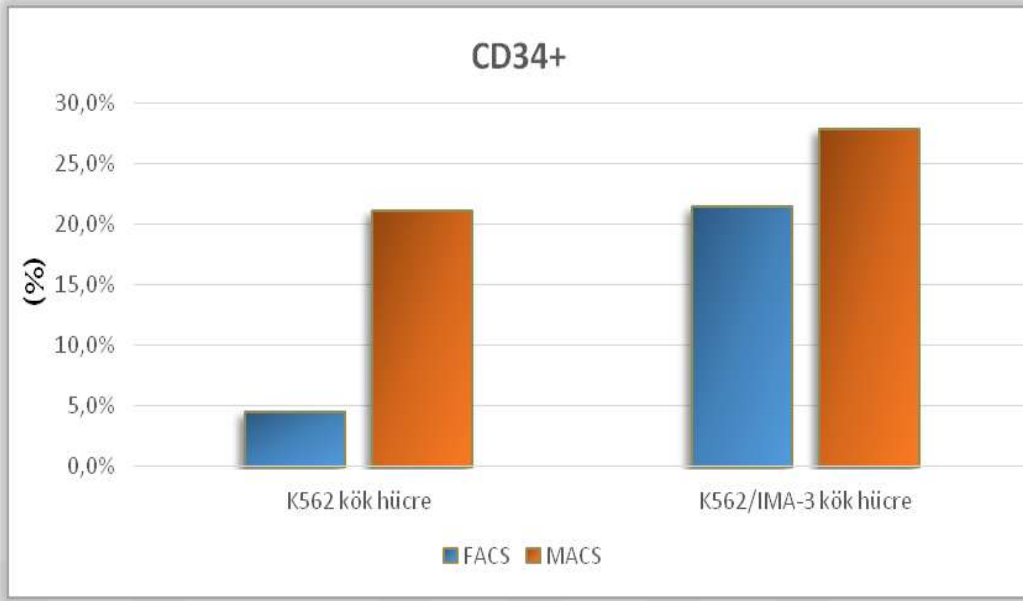


Şekil 21: K562 hücrelerinin MACS sonrası yapılan Flow Sitometri sonuçları.



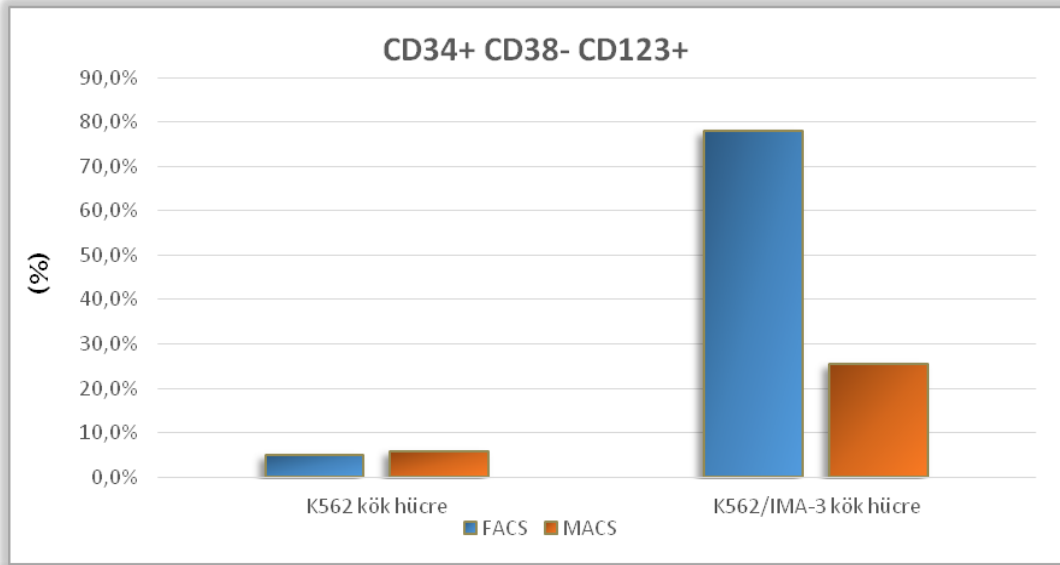
Şekil 22: K562 hücrelerinin MACS sonrası yapılan Flow Sitometri sonuçları.

Şekil 23’de görülen grafikte K562 ve K562/IMA-3 LKH’lerinin FACS ve MACS yöntemleriyle izolasyon sonrasında, CD34+ hücrelerin yüzdesi karşılaştırmalı olarak verilmiştir. K562 hücre hattından MACS yöntemi ile LKH’lerin izolasyonu, FACS yöntemi ile yapılan LKH izolasyonundan 4,7 kat daha verimli olduğu görülmektedir. K562/IMA-3 hücrelerinden izole edilen LKH’lerinin ise, FACS yöntemine göre MACS yönteminin 1,3 kat daha verimli olduğu görülmektedir (Şekil 23).



Şekil 23: K562 ve K562/IMA-3 hücre hatlarından izole edilen CD34+ lösemik kök hücrelerinin FACS ve MACS yöntemlerine göre % oranlarının grafiği.

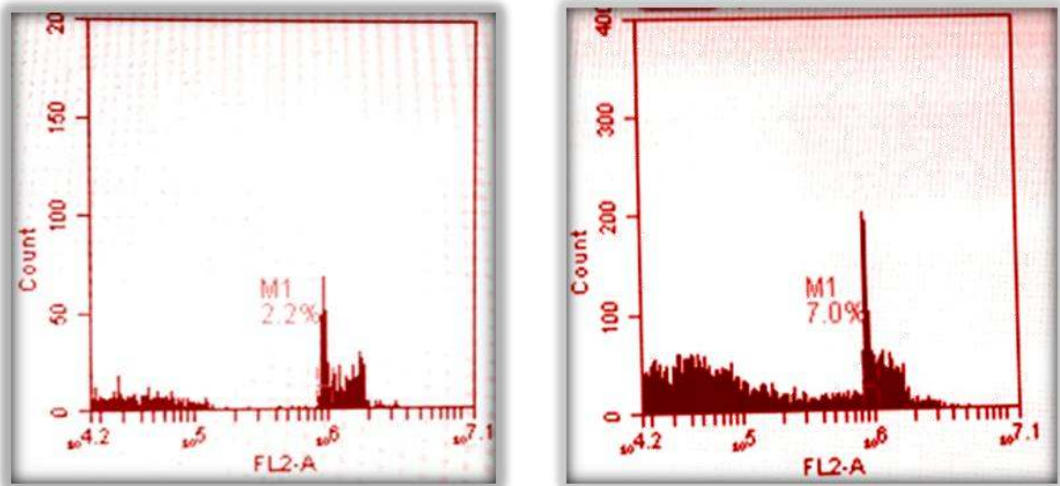
LKH markerleri olarak bilinen CD34+/CD38-/CD123+ varlığı K562 ve K562/IMA-3 hücre hatlarından FACS yöntemi ile direk izole edilirken, MACS yöntemi ile iki belirteçle izolasyon yapılabilmesi, üç belirtecin aynı anda izolasyonunun yapılamaması nedeniyle önce CD34+/CD38- LKH'leri izole edildi. Daha sonra izole edilen bu hücreler çoğaltılarak Akım Sitometrik yöntemle hem CD34+/CD38- hücrelerinin hem de CD34+/CD38-/CD123+ hücrelerinin oranlarının ölçülmesi ile dolaylı olarak tespit edilmiştir (Şekil 21, 22). Böylece MACS yönteminin konfirmasyonu sağlanırken aynı zamanda, FACS yönteminin de MACS ile hücre izolasyonunun verimliliği açısından karşılaştırılması yapılmıştır. Şekil 24'de görüldüğü gibi K562 hücrelerinden izole edilen CD34+/CD38-/CD123+ LKH'lerin FACS ve MACS yöntemleriyle yapılan izolasyon oranları hemen hemen eşit görülmektedir. K562/IMA-3 hücrelerinden izole edilen CD34+/CD38-/CD123+ LKH'lerinin oranları ise MACS yöntemine göre FACS yöntemi ile 3,1 kat daha fazla bir verimle tespit edilebildiği görülmektedir (Şekil 24).



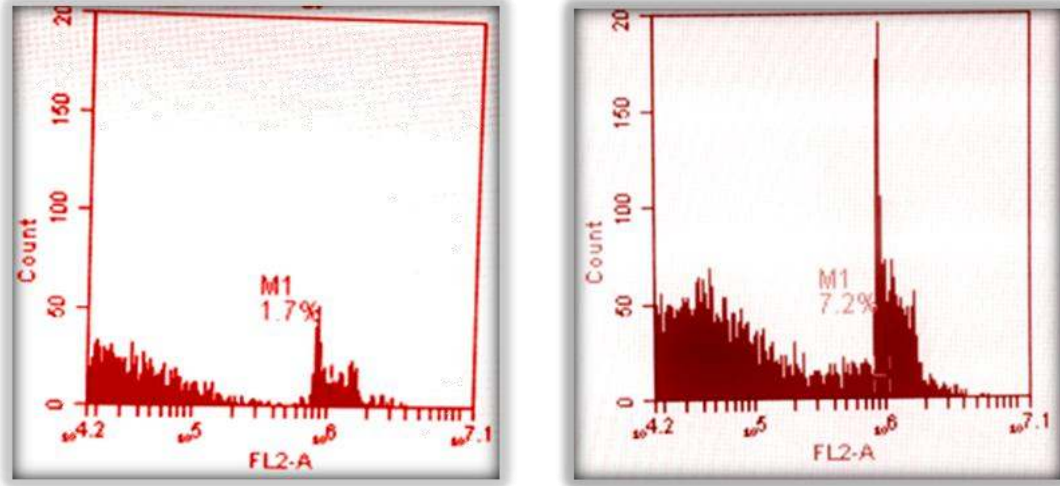
Şekil 24: K562 ve K562/IMA-3 hücre hatlarından izole edilen CD34+/CD38-/CD123+ lösemik kök hücrelerinin FACS ve MACS yöntemlerine göre % oranlarının grafiği.

4.2. Hücre Siklus Analizi:

Flow Sitometre analizi, tümör hücrelerinde hücre siklusunun ölçülmesinde de kullanılmaktadır. Bu çalışmada LKH izolasyonu esnasında her iki hücre hattı (K562 ve K562/IMA-3) sort edilirken toplanan CD34+ kök hücrelerinin hücre siklus oranları ve DNA içeriği, toplanan CD34- hücrelerin kontrol olarak kullanılması ile analiz edildi.



Şekil 25: Sırasıyla, K562 CD34- ve CD34+ hücrelerin siklus fazlarını gösteren histogramları.



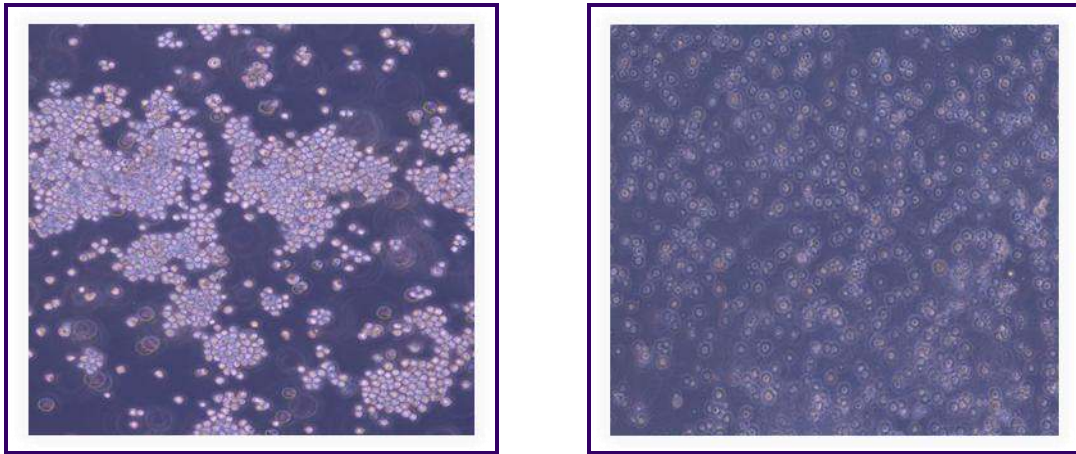
Şekil 26: Sırasıyla, K562/IMA-3 CD34- ve CD34+ hücrelerin siklus fazlarını gösteren histogramları.

K562 CD34- hücrelerde $DI = 2,03$ (tetraploidi $4N$) görülürken, K562 CD34+ hücrelerin bir kısmında $DI \leq 1$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 25). K562/IMA-3 CD34- ve CD34+ hücrelerde $DI = 1$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 26).

4.3. K562 ve K562/IMA-3 Lösemik Kök Hücre Kültürleri:

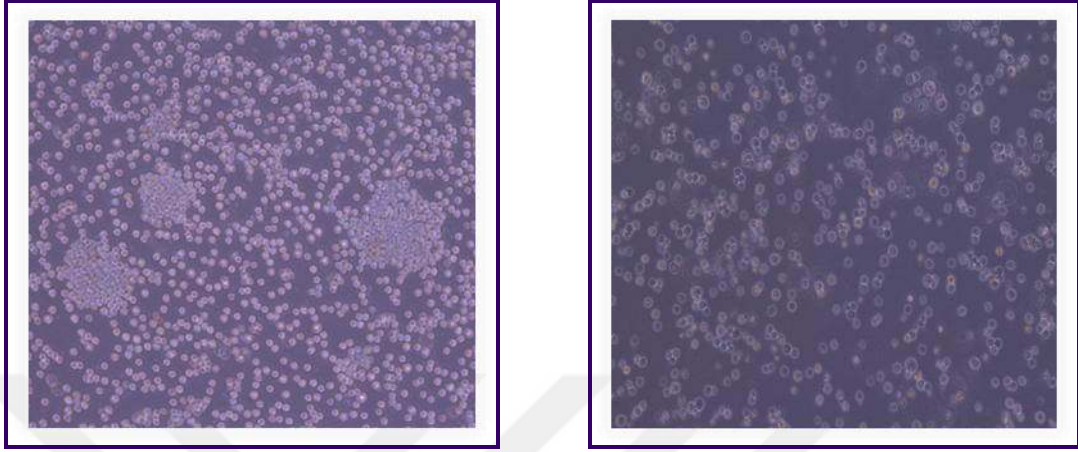
K562 ve K562/IMA-3 hatlarında izole edilen LKH'ler dört ayrı ortamında (RPMI-1640 ortam, Diferansiye edici ortam, Diferansiye etmeyen ortam ve Lösemik kök hücre ekspansiyon ortamı) kültüre edilmiştir.

RPMI-1640 besiyeri ortamında üretilen K562 ve K562/IMA-3 LKH'lerinin çoğunluğu, lösemi hücrelerine dönüşerek (diferansiye olarak) çoğaldığı görüldü (Şekil 27).



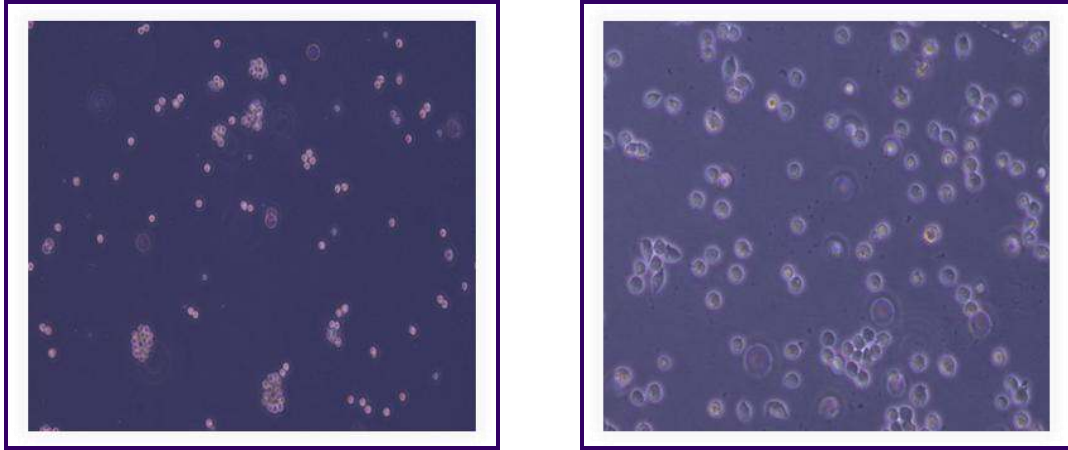
Şekil 27: Sırasıyla, K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin RPMI-1640 kültür ortamındaki morfolojik görüntüsü (10X).

Diferansiye edici besiyeri ortamında kültüre edilen K562 LKH'leri ve K562/IMA-3 LKH'lerinin çoğunluğu, lösemi hücrelerine dönüşerek (diferansiye olarak) çoğaldığı görüldü (Şekil 28).



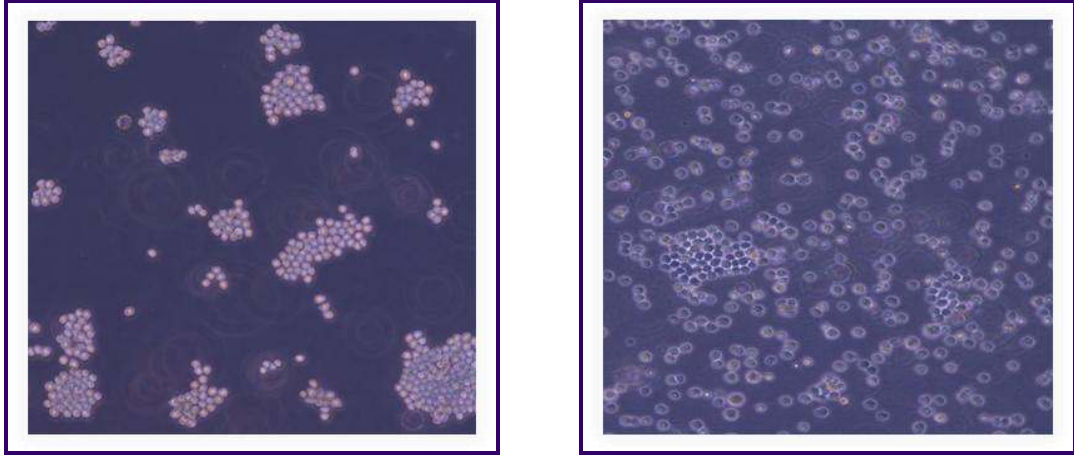
Şekil 28: Sırasıyla, K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin diferansiye edici kültür ortamındaki morfolojik görüntüsü (10X).

Diferansiye etmeyen ortamda kültüre edilen K562 LKH'leri ve K562/IMA-3 LKH'lerinin çoğunluğu, lösemi hücrelerine dönüşmeden (diferansiye olmadan) fenotiplerini korudular ancak, çoğalma olmaksızın yaklaşık 2 hf kadar kültüre edilebildi (Şekil 29).



Şekil 29: Sırasıyla, (10X) K562 ve (20X) K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin diferansiye etmeyen kültür ortamındaki morfolojik görüntüsü.

Lösemik kök hücre ekspansif ortamda kültüre edilen K562 LKH'leri ve K562/IMA-3 LKH'lerinin çoğunluğu, lösemi hücrelerine dönüşmeden (diferansiye olmadan) çoğaldıkları görüldü (Şekil 30).



Şekil 30: Sırasıyla, K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin lösemik kök hücre ekspansiyon edici kültür ortamındaki morfolojik görüntüsü (10X).

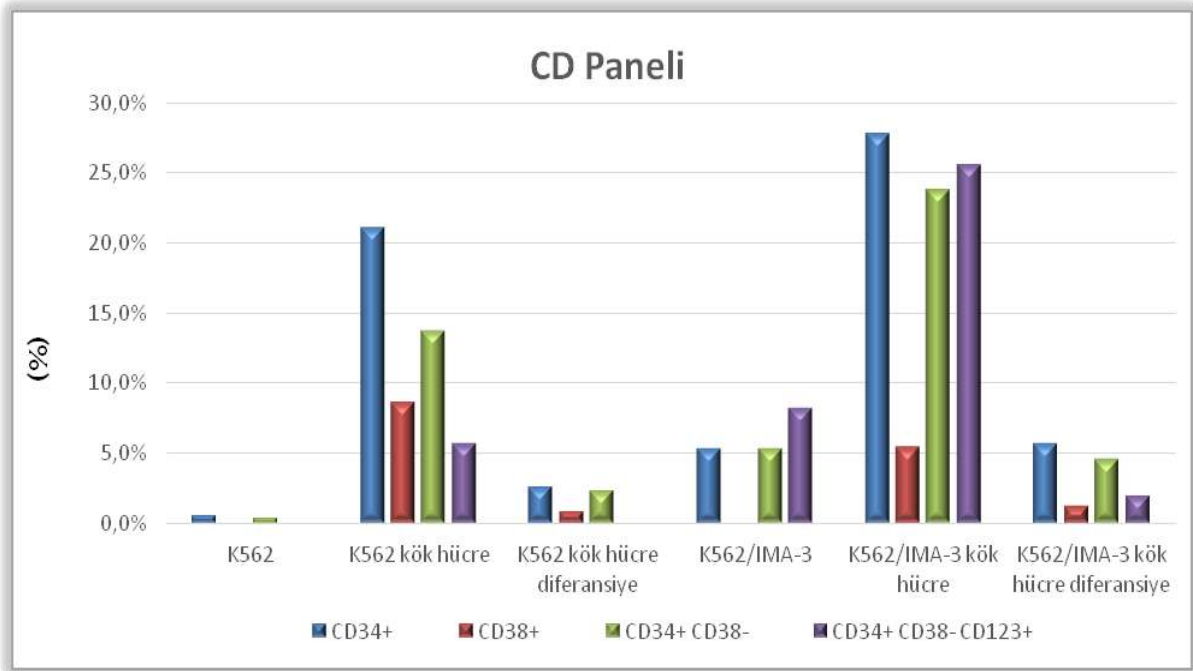
4.4. CD Paneli:

LKH'lerinin, çoğunluğu kök hücre özelliğini koruyarak çoğalıp-çoğalmadığı Flow Sitometre analiziyle CD paneline bakılarak test edildi. Diferansiye edici besiyeri ortamına maruz bırakılarak davranışları gözlenen her iki hücre hattının LKH'lerinin diferansiye olarak çoğaldığı gözlemlendi. Lösemik kök hücre ekspansiyon edici besiyeri ortamında büyüyen her iki hücre hattının LKH'leri ise, kök hücre özelliklerini koruyarak çoğaldığı görüldü ve bu besiyerinde LKH'leri çoğaltıldı.

Üretilen hücrelerin CD paneli Şekil 31'deki grafikte toplu olarak gösterilmiştir: K562 ve K562/IMA-3 hücreleri, izole edilen K562 ve K562/IMA-3 LKH'leri ve diferansiye K562 ve K562/IMA-3 LKH'lerinin, CD34+; CD38+; CD34+/CD38- ve CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyon oranlarına ayrı ayrı bakılmıştır (Şekil 31).

K562 hücre hattında bakılan, aynı zamanda LKH markerları olan CD34+/CD38- ve CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonları da dahil olmak üzere tüm altpopülasyonlar %1'in altında görüldü (Şekil 31). LKH markerı olduğu bilinen CD34+/CD38- hücre popülasyonunun varlığı en çok K562/IMA-3 LKH'leri başta olmak üzere, her iki LKH'lerinde en yüksek seviyede görülmüştür. En yüksek CD34+, CD34+/CD38- ve CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonu da yine K562/IMA-3 LKH'lerinde görülmektedir (Şekil 31).

K562 LKH'lerine göre, K562/IMA-3 LKH'lerinin CD34+ popülasyonunun 1.3 kat, CD34+/CD38- popülasyonunun 1.7 kat, CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonunun 4.5 kat daha fazla olduğu görüldü. K562/IMA-3 LKH'lerinin, K562/IMA-3 diferansiye LKH'lerine göre CD34+ popülasyonunun 4.9 kat, CD34+/CD38- popülasyonunun 5.2 kat, CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonunun 12.7 kat daha fazla olduğu görüldü. K562/IMA-3 hücrelerine göre ise, K562/IMA-3 LKH'lerinin CD34+ popülasyonu 5.2 kat, CD34+/CD38- popülasyonu 4.5 kat, CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonu ise 3.1 kat daha fazla idi (Şekil 31).



Şekil 31: K562 ve K562/IMA-3; K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücreleri; K562 ve K562/IMA-3 diferansiye olmuş lösemik kök hücrelerinin toplu CD panelinin grafiği.

Normal Hematopoetik projenitör hücre (HPH) markeri olarak görülen CD38+ popülasyondaki hücreler, K562 LKH'leri başta olmak üzere, en yüksek oranda LKH'lerinde görülmüştür (K562 LKH'lerinde %8.6, K562/IMA-3 LKH'lerinde %5.4 oranlarında). K562 LKH'lerinde CD38+ hücre popülasyonunun, K562/IMA-3 LKH'lerine oranla 1.6 kat; K562/IMA-3 diferansiye LKH'lerine oranla 7.2 kat; K562 diferansiye LKH'lerine oranla 10.7 kat daha fazla olduğu görülmüştür. K562 ve K562/IMA-3 hücre hattının her ikisinde de CD38+ popülasyon %0.1 gibi oldukça düşük oranlarda idi ve hem K562 hem de K562/IMA-3 hücrelerine oranla K562 LKH'lerinde CD38+ hücre popülasyonu, 86 kat daha fazla olduğu görüldü (Şekil 31).

4.5. Tümörojenite Deneyi:

Diferansiye olmadan çoğalan tek besiyeri olan lösemik kök hücre ekspanse ortamında kültüre edilerek çoğaltılan K562 ve K562/IMA-3 CD34+/CD38- LKH'leri, konfirme etmek için immün yetmezlikli iki ayrı NUDE farenin ense bölgesine subkutan olarak xenotransplante edildi. Ayrıca RPMI-1640 serumlu ortamda kültüre edilerek çoğaltılan, LKH olmayan K562 ve K562/IMA-3 CD34+/CD38+ hücreleri de kendi hücre hattına ait LKH'lerin enjekte edildiği immün yetmezlikli NUDE farenin sırt bölgesine subkutan olarak enjekte edildi. Yaklaşık 2 hf kadar sonra farelerin ense kısmına enjekte edilen K562 ve K562/IMA-3 CD34+/CD38- LKH'lerinin tümör oluşturduğu görülürken, diğer enjeksiyon bölgesi olan sırt kısmında K562 CD34+/CD38+ hücrelerde tümör oluşumu görülmedi. Ancak K562/IMA-3 CD34+/CD38+ hücrelerin enjekte edildiği sırt kısmında ise küçük boyutlu tümör oluşumu görüldü (Şekil 32).



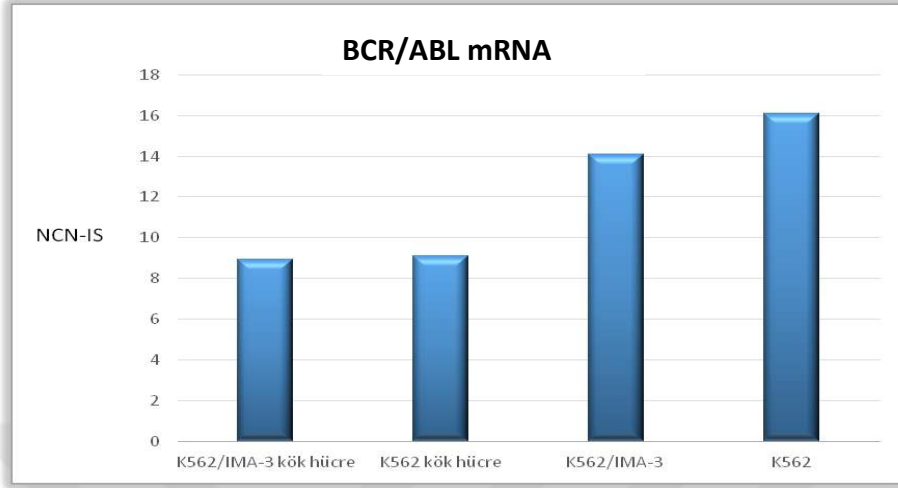
Şekil 32: Sırasıyla, K562 ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerinin immün defisit-NUDE farelere xenotransplantasyonu. Farelerin ense kısmındaki tümör, yaklaşık 2-3 hafta içinde gelişmiştir.

4.6. Kantitatif Real Time PCR Deneyi:

4.6.1. BCR-ABL mRNA Miktarının Ölçülmesi

Kantitatif Real Time PCR deneyi ile translokasyon varlığının anlaşılması açısından BCR/ABL mRNA miktarının tayinine bakıldı. BCR/ABL mRNA düzeyi K562 ve

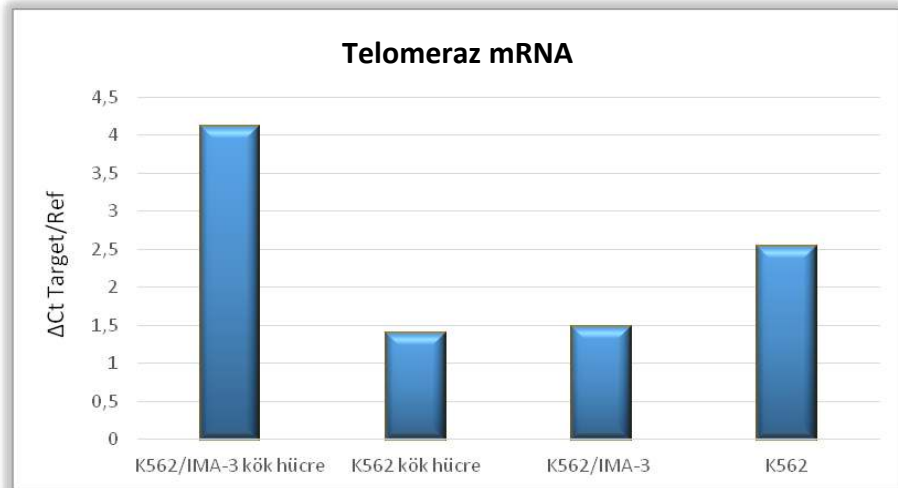
K562/IMA-3 hücrelerine göre, K562 kök ve K562/IMA-3 LKH'lerinde sırasıyla, 1,8 ve 1,6 kadar azaldığı görülmekle birlikte BCR/ABL ekspresyonu korunmuştur (Şekil 33).



Şekil 33: K562, K562/IMA-3, K562 LKH ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerde BCR-ABL mRNA miktarlarının grafiği.

4.6.1. Telomeraz mRNA Miktarının Ölçülmesi

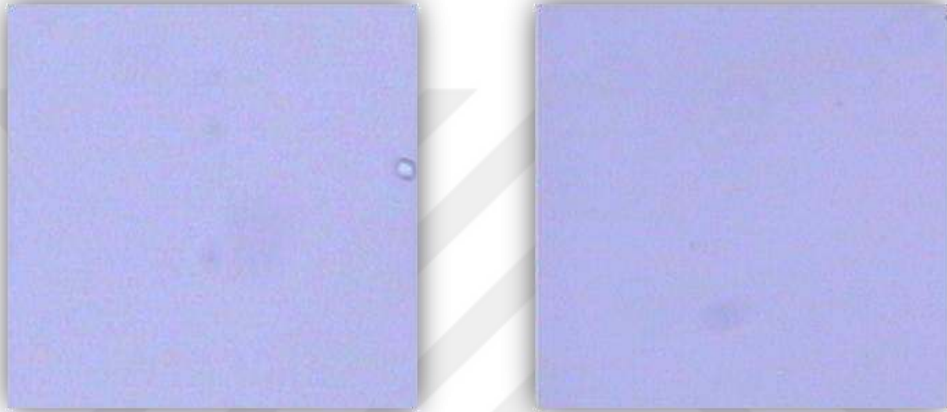
Kantitatif Real Time PCR deneyi ile hücrelerin bölünme yeteneklerinin takibi açısından telomeraz aktivitesinin mRNA düzeyine bakıldı. K562/IMA-3 LKH'leri, K563/IMA-3 hücrelerine oranla telomeraz aktivitesi bakımından 2,8 kat daha aktif iken; K562 LKH'leri ise K562 hücrelerine oranla 1.8 kat telomeraz aktivitesinde azalma görüldü (Şekil 34).



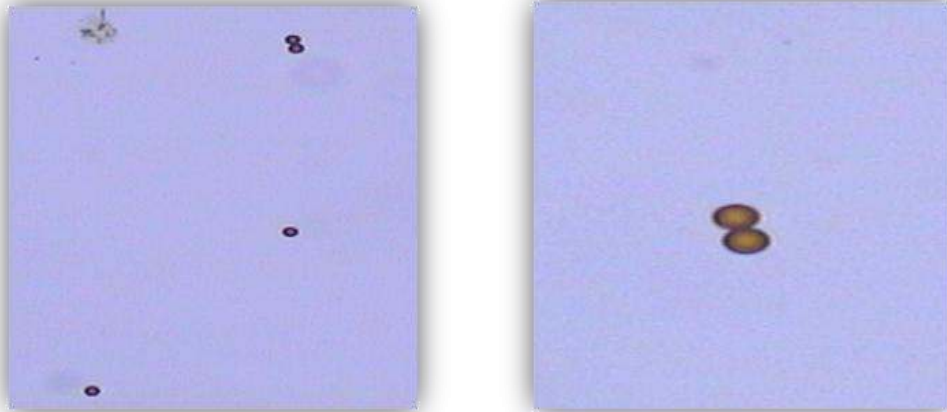
Şekil 34: K562, K562/IMA-3, K562 LKH ve K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerde Telomeraz mRNA miktarlarının grafiği.

4.7. Alkalen Fosfataz Deneyi:

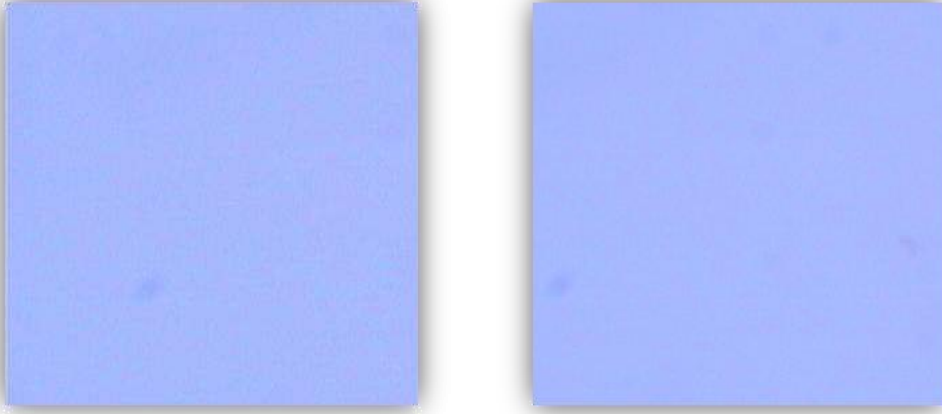
Alkalen Fosfataz testi ile K562 ve K562/IMA-3 KML hücreleri kontrol olarak kullanılarak, K562 ve K562/IMA-3 LKH'lerinin diferansiye olmaması açısından konfirmasyonu sağlanmıştır. Boyama sonrasında K562 ve K562/IMA-3 hücreleri mikroskop altında inceleme ile kırmızı boyalı koloniler görülmezken (şekil 35 ve 37), K562 ve K562/IMA-3 LKH'lerinin alkalen fosfataz boyama sonrası mikroskop altında incelenmesi ile kırmızı boyalı koloniler görülmüştür (Şekil 36 ve 38).



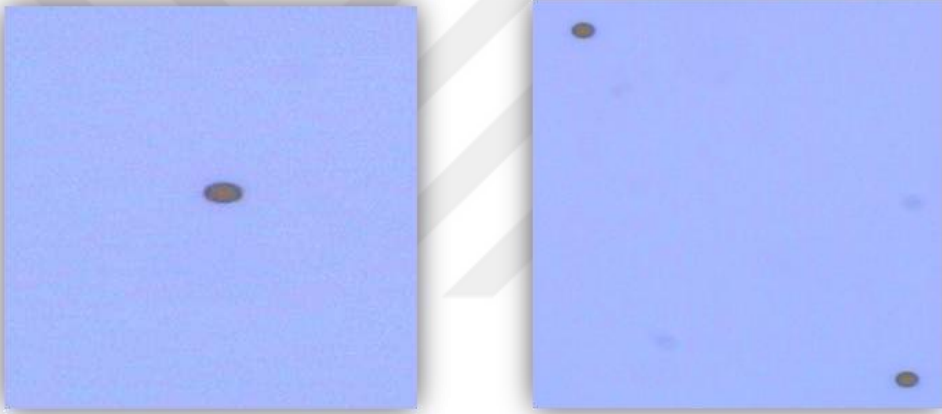
Şekil 35: Alkalen Fosfataz boyama ile K562 lösemi hücrelerin görünüşü.



Şekil 36: Alkalen Fosfataz boyama ile K562 lösemik kök hücrelerin görünüşü.



Şekil 37: Alkalen Fosfataz boyama ile K562/IMA-3 lösemik hücrelerin görünüşü.



Şekil 38: Alkalen Fosfataz boyama ile K562/IMA-3 lösemik kök hücrelerin görünüşü.

4.8. Mikoplazma Kontaminasyon Varlığının Gösterilmesi:

Üretilen LKH'leri, mikoplazma detection testi ile kontaminasyon varlığı açısından değerlendirilmiş ve kontaminasyon görülmemiştir.

5. TARTIŞMA

Birçok malignensilerdeki tedavi başarısızlığının yaygın nedenleri, kemoterapi ve radyoterapiye direnç ve yeterli ölçüde seçici olmayan stratejilerin sağlıklı dokulara toksik olabilmesidir. Özellikle KKH'lerine hedefli olmayan tedavi stratejileri sonucu hastalığın nüks ve metastaz riskinde artış ile karşı karşıya kalınmaktadır. Bu nedenle KKH'lerinin eliminasyonu, malign hastalıkların tedavisinde çok önemlidir. İlk yapılması gereken, KKH'lerinin eliminasyonu için farklı terapötik stratejilerin geliştirilmesi yönünde çalışmaların olmasıdır. Ancak normal kök hücreler korunurken KKH'lerine hedefli yeni tedavilerin geliştirilmesi, KKH'lerinin tanınmasındaki zorluklar nedeniyle sıklıkla başarısızlığa götüren sınırlamalara sahiptir.

Dünya genelinde KKH'lerini araştırma aracı olarak kullanan laboratuvarların sayısı hızla artmaktadır. Fakat çözümlenmesi gereken pek çok güçlük vardır. KKH'lerinin normal kök hücreler ile benzerlikleri nedeniyle tanımlanmalarında sorun yaşanmaktadır. Bu nedenle normal kök hücreler ve KKH'ler arasındaki farkların tanımlanması ile ancak KKH'lerinin direk hedeflenerek yok edilebilmesi mümkün olabilecektir. Ayrıca, bu çalışmaların yapılabilmesi için KKH'lerinin farklılaşma potansiyellerinin ortadan kaldırılması da gerekmektedir. Bu nedenle, KKH'lerinin şaşırtıcı potansiyellerinin çözümlenmesi için öncelikli olarak stabil kültür ortamlarına ve idame KKH hatlarına ihtiyaç vardır. Bu idamenin sağlanması için gelişebilecek problemlerin tanınması, farklılaşma mekanizmasını anlamamız yönünde belirgin ilerlemeler kaydetmemizi sağlayacaktır. Literatüre baktığımızda, Inzunza ve ark. iki yeni kök hücre serisi türetmişlerdir. Fakat büyük çabalara rağmen kök hücre için kullanılan modifiye protokoller optimalin altındadır ve kendiliğinden farklılaşmalar gözükmemektedir (97). KKH hattının tedavi geliştirme amaçlı kullanılabilmesi için temel kriter, hücre kültür ortamlarında özellikleri değişmeden sayılarının çoğaltılmasıdır. Bu açıdan, spesifik kültür koşullarının tanımlanması önemlidir. Bizim çalışmamızın da genel amacı, KKH'lerinin birçok tümör serilerine farklılaşma mekanizmasına karşı güçlü bir protokol geliştirerek *in vitro* olarak KKH hattı oluşturmaktır.

Bunun için KKH'lerinin yeterli sayıda eldesi gereklidir ve öncelikli olarak yüksek verimle çalışan ayırma sistemlerine ihtiyaç vardır. Hücre ayırmada FACS ve MACS sistemlerinin kullanımı son yıllarda yoğun bir şekilde artmıştır. Bunun en önemli nedeni

uygulamanın kolay ve hızlı olması ve ilgili hücre seçimi ve saflaştırma sonrası elde edilen hücrelerin canlı olmasıdır. Biz de çalışmamızda, K562 ve K562/IMA-3 KML hücre hatlarından LKH izolasyonu için FACS ve MACS metodlarını seçerek birbirlerine konfirme ettik ve sonuçları karşılaştırdık.

FACS sistemi ile ayırmanın basit, yönetiminin kolay olması ve tamamen kapalı, artmış güvenlik ortamında yapılması en önemli avantajlarıdır. Aynı zamanda sonuçlar hızlı, kolay ve hassas bir şekilde elde edilmektedir. Çok parametrelili, yüksek performansa sahip FACS sistemi tek bir numunedeki alt popülasyonları etkili bir şekilde tanımakta, aynı anda 4 farklı hücre popülasyonunu, saniyede 500 hücre sayımı gibi çok büyük bir hızda izole edebilmektedir (98). Ancak FACS ile olan hücre ayırlama esnasında, hücrelerin kontamine olma riskleride büyük bir sorun olarak karşımızda durmaktadır. Kontaminasyon riski, özellikle izolasyon sonrası üretimi yapılacak hücrelerin kaybı ya da hücre karakterlerinin değişimi gibi ciddi sonuçlar doğurabilmektedir. Ayrıca lazer ışığının hücrelerin karakterinde farklılık yaratıp yaratmadığı da tam bilinmemektedir.

MACS sistemindeki manyetik partiküllerin, manyetik alan etkisindeki davranışları temelinde yüksek seçicilik ile ayırma izin vermektedir. Bağlanmanın ve kullanılan tampon sisteminin kolay olması, yıkama işlemlerinin basitliği ve azlığı ile işlem süresi oldukça kısalmaktadır (93). Ancak FACS sistemine oranla daha yavaş, zaman alıcı bir uygulamadır. MACS sisteminde istenen hücrenin ortamdan ayrılmasında kullanılan manyetik partiküller, mikron ve nano boyutludur ve süperparamanyetik özellikte oldukları için ortamda sadece manyetik alan olduğu zaman etkinlik göstermektedirler (99). Bu partiküllerin yüzeyleri polimer ile kaplanmış olup demir partiküllerinin hücrede oluşturabileceği toksik etkileri ortadan kaldırmaktadır (99). Bunun yanı sıra, MACS yönteminde sınırlı sayıda antikör kullanılabilen ve bu antikörlerin pozitif seleksiyon sonrası hücreden koparıma işlemleri hücreyi istenmeyen ek strese ve hasara maruz bırakabilmektedir. Ayrıca manuel olduğu için kapalı sistemler değildir, bu nedenle güvenlik önlemlerine dikkat edilmesi gerekmektedir.

Normal HKH'lerde de pozitif olarak görülen CD34 markeri, hücrelerin hem hematopoetik hem de köklük özelliğinin olduğunu göstermektedir (50). Bu bakımdan LKH'lerin izole edildiği her iki hücre grubundaki CD34+ hücrelerin oranlarına bakıldı. K562/IMA-3 LKH'lerde daha fazla olmak üzere hem K562 hem de K562/IMA-3 hücrelerinde MACS metoduyla izole edilen CD34+ hücrelerin oranı, FACS metoduyla izole

edilene göre daha yüksek görüldü (sırasıyla 4,7 ve 1,3 kat yüksek) (Şekil 23). FACS metodunda görülen bu verim düşüklüğünün nedeninin, öncelikle kapılama hatasından ya da antikörlerin hücreye bağlanma sorunundan kaynaklanmış olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca hücrelerin en iyi şekilde sorterde çalışması için uygun konsantrasyonda olması gerekir. Çalışılacak hücrelerin, çok konsantre ya da çok seyreltilmiş olması sorunlara yol açabilmektedir. Ancak sort için ideal bir konsantrasyon yoktur. Basitçe söylemek gerekirse, hücrelerin çok konsantre edilmesi tesadüfi düşüşler nedeniyle daha düşük bir toplamaya neden olacaktır, örneğin; birbirine çok yakın olan iki hücre, cihaz tarafından saflığı sağlamak amacıyla reddedilecektir. Ayrıca cihaz hücreleri ayırmak için değerlendirirken, sort edilen malzemenin saf kalmasını sağlayacak bir şekilde yapılıp yapılmadığını da denetleyecektir. Şayet istenilen etkinlik potansiyel bir istenmeyen etkinliğe çok yakın olursa, cihaz saflığı sağlamak için istenilen etkinliği (sortu) iptal edecektir. Akla gelebilen bu ve benzeri sorunlar, CD34+ sonuçlarımızda görülen FACS sistemiyle yaptığımız hücre izolasyonundaki verim düşüklüğünün nedeni olabileceğini düşündürmektedir.

Yine her iki hücre hattından saflaştırılan LKH'lerdeki CD34+/CD38-/CD123+ hücrelerin oranlarına bakıldı. K562 CD34+/CD38-/CD123+ LKH'leri, FACS ve MACS metodları ile hemen hemen eşit oranlarda bir verimlilikle tespit edilebilmesine rağmen; K562/IMA-3 CD34+/CD38-/CD123+ LKH'lerinin MACS yöntemine göre FACS yöntemi ile 3,1 kat daha yüksek bir verimlilikle tespit edilebildiği görülmüştür (Şekil 24). Bu durum, MACS ile sort edilirken bazı aksaklıklardan kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Şöyle ki; bu sonuçlar FACS metodunda direkt, MACS metodunda ise indirekt yollarla (önce CD34+/CD38- hücrelerin MACS metoduyla izolasyonunun ardından izole edilen bu hücrelerden Flow Sitometrik yöntemle CD34+/CD38-/CD123+ hücre alt popülasyonları belirlenmekte) elde edilmektedir ve MACS sisteminde önce negatif (CD38-) ve sonra pozitif (CD34+) seleksiyonla hücrelerin saflaştırılması yapılabilmektedir. CD34+ hücreler toplandıktan sonra hücrelerden manyetik boncukların koparılma işlemi esnasında hücrelerin hasarlanarak kaybedilmesi sonucu bu verim düşüklüğünün görülebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Yine hücrelerin fazla işleme maruz kalması ile hücrelerin hasarlanabileceği ve manyetik boncukların CD34+ hücrelerine bağlanma probleminin olabileceği de akılda tutulmalıdır. Ayrıca MACS sonrası yapılan Flow sitometrik analizi sırasında, yukarda FACS işleminde bahsedildiği gibi, kapılama hatası, hücrelerin uygun konsantrasyonda olmaması ya da antikörlerin hücreye bağlanma sorunu gibi nedenlerden

dolayı oluşabilecek aksaklıklardan da MACS yöntemindeki bu verim düşüklüğünün sorumlu olabileceği düşünülmelidir.

Ancak Şekil 23 ve 24’de gösterilen her iki grafik birlikte değerlendirilecek olunursa; LKH’lerini daha gerçekçi göstermesi açısından, bizim için asıl değerli olan CD34+/CD38-/CD123+ hücre oranlarına bakıldığında, K562 LKH’lerinde her iki yöntemle hemen hemen eşit sonuçların çıkması, bu iki metodu birbirine konfirme etmektedir ve K562/IMA-3 CD34+/CD38-/CD123+ hücrelerindeki sonucun da doğru olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda CD34+ hücrelerine bakıldığında, her iki hücre grubunda görülen MACS metodundaki verim yüksekliği, MACS yöntemi ile elde edilen K562/IMA-3 CD34+/CD38-/CD123+ hücrelerindeki verim düşüklüğünün olası nedeni olarak yukarıda bahsedilen; “pozitif seleksiyon sonrası manyetik boncukların koparılma işlemi sırasında hücrelerin hasarlanarak kaybedilmesi” nedeni ile ters düşmektedir. Şayet bu geçerli olsaydı, CD34+ hücrelerin pozitif seleksiyonla toplanması nedeniyle MACS yöntemi sonrası verim düşüklüğünün görülmesi gerekecekti. FACS sisteminde ise, CD34+/CD38-/CD123+ hücreler aynı anda izole edildiği ve cihazın verilerinden CD34+ hücre oranlarının bilgisi alındığı için CD34+/CD38-/CD123+ hücrelerin izolasyonunun doğruluğu, aynı zamanda CD34+ hücrelerin izolasyonunun doğruluğu anlamına da gelecektir. Bu durum ise yukarıda tartışılan, FACS yönteminde meydana gelebilecek olası verim düşüklüğü ihtimallerinin gelişmediğini göstermektedir. Tüm bunlar dikkate alındığında, K562 CD34+ ve K562/IMA-3 CD34+ hücrelerin eldesindeki verime göre K562/IMA-3 CD34+/CD38-/CD123+ hücrelerin eldesinde görülen MACS yöntemindeki verim düşüklüğünün olası nedeninin; fazla işleme maruz kalarak hasarlanma sonucu hücre kaybının olabileceği ya da izolasyon kiti olan manyetik boncukların hücrelere değişken özgüllük ile bağlanıyor olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu durumun açıklığa kavuşturulması daha ileri çalışmaları gerektirmektedir. Ancak K562 CD34+/CD38-/CD123+ hücrelerin FACS ve MACS yöntemlerinde eşit saflıkta eldesi, her iki yöntemin oldukça güçlü bir ayırım özelliğinin olduğuna da işaret etmektedir. Bu durumda, iki yöntem arasında saptanan farklılıkların deneysel aşamalarda oluşabilecek problemlerden kaynaklanmış olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda, Flow Sitometre ile her iki KML hücre hattında hücre siklus analizi yapıldı. Flow Sitometre analiziyle bir popülasyondaki hücrelerin DNA miktarının dağılımının çalışması ve hücrelerin hangi bölünme fazında ne miktarda hücre bulunduğunun tespiti de

yapılabilmekte ve hücre siklusunun seviyesi belirlenebilmektedir. Hücrenin DNA içeriğini yansıtan DNA İndeksi (DI), major DNA içerik değişiminin varlığını test etmek suretiyle LKH'lerin çoğalma ve farklılaşmasının kontrolü amacıyla hücre kültürü esnasında yapılmıştır. Histogramda diploid (2N) DNA dağılımındaki hücreler, G0/G1 fazındaki ana pikde yer alır. S (sentez) fazındaki hücrelerin DNA içeriği diploid ile tetraploid hücreler arasında olacaktır. G2 ve mitozdaki hücreler ise 4N miktarında DNA taşıdıklarından tetraploid olarak izlenecek ve G2+M fazında anormal yüksek pikler verecektir. Bu şekilde hücrelerin çoğalma hızları hakkında bilgi toplanabilmektedir. LKH'lerin %90 kadarının G0 (sessizleşme) fazını ifade eden G0/G1 pikinde yer alması ve kalanının S ve G2+M fazında dağılması gerekir, ancak elde edilen piklerin pozisyonu histogramda beklenen pozisyonun %10 kadar sapabilmektedir (97, 98, 99).

Çalışmamızda K562/IMA-3 CD34+ ve CD34- hücrelerde diploidi (DI: 1), K562 CD34- hücrelerde DI: 2,03 (tetraploidi 4N) ve K562 CD34+ hücrelerin bir kısmında DI: ≤ 1 görüldü. Tetraploidinin görülmesi, K562 CD34- hücrelerin mitoz fazında olduğunu göstermekte olup, Şekil 25'deki K562 CD34- hücreleri gösteren histogramda da G2/M fazında görülen pik, bu artışı göstermektedir. Bu durum, K562 CD34- hücrelerinin beklenildiği gibi kök hücre olmadıklarının belirtisi olarak da yorumlanabilir. K562 CD34+ ve K562/IMA-3 CD34+ hücrelerde tetraploidinin görülmeyip diploidinin görülmesi, bu hücrelerin mitoz girmediğini göstermektedir (Şekil 25 ve 26'de K562 CD34+ ve K562/IMA-3 CD34+ histogramlarında G2/M fazının görülmeysi). Bu sonuç, kök hücrelerden beklenen sessizleşmenin (G0 fazın) belirtisi olarak da kabul edilebilir. Ancak K562/IMA-3 CD34- hücrelerde görülen diploidi, sessizleşmenin (G0) yani bu hücrelerde köklük özelliğinin bir belirtisi olarak görülse de, Şekil 26'da görülen histogramda G2/M fazında pik olması, mitoz fazında hücrelerin olduğunu göstermekte olup, bu durum, hücrelerin çoğaldığının bir belirtisi olarak kabul edilebilir. Dirençli olan bu kanser hattındaki hücrelerin karakterizasyonunun değişmiş olabileceğini bilinmektedir. Bununla birlikte dirençle ilgili olan karakterizasyondaki bu değişimin, hücre bölünmesini kontrol eden sinyal yollarında da olup-olmadığının (Rb, p53 gibi hücre döngüsünü baskılayan düzenleyicileri; Ras, Myc, BCR-ABL gibi bölünmeyi arttıran düzenleyicilerin) gösterilmesi daha ileri çalışmalar ile aydınlanabilecektir. Böylece K562/IMA-3 hücrelerden izole edilen LKH'lerindeki farklılıklar daha net anlaşılabilecektir.

K562 ve K562/IMA-3 hatlarından izole edilen LKH'ler dört ayrı ortamda (RPMI-1640 ortam, Diferansiye edici ortam, Diferansiye etmeyen ortam ve Lösemik kök hücre ekspanse edici ortam) kültürasyona maruz bırakılarak LKH'lerin bu ortamlardaki davranışları gözlemlenmiştir. Böylece KML kök hücre hattı oluşumunda en uygun olabilecek besiyeri ortamı/ortamları seçilmeye çalışılmıştır. Bu ortamlarda LKH'lerine ek katkısı olacağı düşünülen ekstrasellüler kaplı 25 cm²'lik kültür flasklarına hücreler ekilmiştir. RPMI-1640 serumlu ortamda ve diferansiye edici ortamda, K562 ve K562/IMA-3 LKH'lerinin, ileri pasajlamalarda lösemi hücre hattına farklılaşarak çoğaldığı görülmüştür. Bu ortamlardaki pasajların fizibilitesinin kötü olduğu görülmektedir. Bunun, LKH'lerinin pH ve densite değişikliklerine hassasiyetleri nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Diferansiye etmeyen ortamda ise her iki LKH'lerinin çoğalmadan fenotiplerini koruduğu görülmüş, ancak hücreler, iki hafta kadar kültüre edilebilmiştir.

Yaptığımız çalışmada LKH'lerinin, kullanılan serumun tipine ve kalitesine çok hassas olduğu ve idamesi için kültüre edildiği ortamın özelliklerinin büyük önemi olduğu görüldü. LKH'lerin kültürasyonu için kullanılan besiyerinin, herhangi bir hücrenin kültüründe kullanılan besiyerinden farklı olması gerekmektedir. Daha kontrollü, ideal deneyler yapılabilmesi için LKH'lerin; fenotipinin idamesini, farklılaşmadan çoğalmasını ve kendi kendini yenilemeyi destekleyen kök hücreye özgü besiyerlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Biz de çalışmamızda LKH'ler için geliştirilen "Lösemik kök hücre ortamı"na "CD34+ ekspansiyon supplement" ekledik. Amacımız, birçok pasajlama sonrasında farklılaşmanın olmamasını ve kendi kendine yenilemeyi sağlamaktır. Bu kültürasyon sonucunda LKH'lerin çoğunluğunun farklılaşmadan çoğaldığı gözlemlendi.

Çalışmamızda lösemik kök hücre ekspanse ortamında üretilen LKH'leri ve daha önceki izolasyon sonrası toplanan CD34+ ve CD38+ hücre popülasyonları kültüre edilerek, tüm bu gruplar birbiriyle karşılaştırmak için Flow sitometre analizinde CD paneline bakıldı (Şekil 31). CD paneli olarak CD34+/CD38- hücre popülasyonunun belirlenmesi ile MACS analizinin confirmasyonu, CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonunun belirlenmesi ile de FACS analizinin bir confirmasyonu yapılmıştır. Ayrıca CD34+ ve CD38+ hücre popülasyon oranlarına da bakılmıştır.

LKH markeri olduğu bilinen CD34+/CD38- hücre popülasyon oranı en çok K562/IMA-3 LKH'leri başta olmak üzere, LKH'lerinde en yüksek seviyede görülmüştür (Şekil 31).

Böylece birçok literatürde belirtildiği gibi CD34+/CD38- popülasyonun LKH marker özelliğini koruduğu anlaşılmaktadır (1, 2, 11-13, 17, 18). Kuvvetli LKH markeri olarak bilinen CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonu ise, K562/IMA-3 LKH'lerinde en yüksek oranda görülmüştür. K562 LKH'lerine göre K562/IMA-3 LKH'lerinde CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonu 4.5 kat daha yüksek oranda olduğu görüldü (Şekil 31). Ayrıca K562 LKH'lerinde CD34+/CD38- popülasyonunun CD34+/CD38-/CD123+ popülasyona oranla 2.4 kat daha fazla olması (Şekil 31), bu farkın CD123+ popülasyondan kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu sonuçlara göre, CD123'ün K562/IMA-3 LKH'leri için kuvvetli bir marker özelliği gösterdiği, ancak K562 LKH'lerini belirlemede marker özelliğinin yetersiz olduğu söylenebilir. CD paneli içinde çalıştığımız diğer bir hücre popülasyonu olan CD34+'lığı, CD34+/CD38- ve CD34+/CD38-/CD123+ gibi, en yüksek oranda K562/IMA-3 LKH'lerinde görülmüştür (Şekil 31). Yine K562 LKH'lerinde de oldukça yüksek oranda görümesi, CD34+ popülasyonun köklük karakteri göstermesi açısından artmış oranlarının LKH'lerinde görülmesi sonucu ile uyum göstermektedir.

Yaptığımız çalışma sonunda K562 hücrelerinin % 0.4 oranında, K562/IMA-3 hücrelerinin ise % 5.3 oranında LKH içerdiği görülmüştür. K562 hücre hattında, bakılan tüm popülasyonların <%1 olduğu görülmüştür (Şekil 31). Aynı zamanda LKH markerları olan CD34+/CD38- ve CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyonlarının da <%1 gibi çok düşük oranlarda olduğu görülmüştür (Şekil 31). Bu sonuç, daha önce yapılan birçok çalışmada bildirildiği gibi kanser hücre popülasyonundaki KKH oranları ile uyumlu olarak (1, 2, 49), bu hücre hattında da KKH oranının bir göstergesi olabileceğini göstermektedir. Yine dirençli hücreler olan K562/IMA-3 hücrelerinde daha fazla CD34+/CD38- ve CD34+/CD38-/CD123+ hücre popülasyon oranlarının görülmesi (Şekil 31), bu hücrelerin dirençli olmasının LKH oranının yüksek olması ile alakalı olabileceğini düşündürmektedir. Diferansiye olmuş K562 LKH'lerinde CD34+/CD38- popülasyon 6 kat, CD34+/CD38-/CD123+ popülasyon ise 5.7 kat (% 0) K562 LKH'lerine göre azaldığı gözlemlendi (Şekil 31). Diferansiye olmuş K562/IMA-3 LKH'lerinde ise, CD34+/CD38-popülasyon 5.2 kat, CD34+/CD38-/CD123+ popülasyon ise 12.7 kat K562/IMA-3 LKH'lerine göre azalma gösterdiği bulundu (Şekil 31). Bu sonuçlara göre, özellikle CD34+/CD38-/CD123+ popülasyonun, diferansiye K562 LKH'lerinde %0 olarak hiç gözlenmemesi, ve K562/IMA-3 LKH'lerine göre diferansiye K562/IMA-3 LKH'lerinde ise 12.7 kat gibi yüksek bir düşüş göstermesi (Şekil 31), CD123+'lığının

diferansi olma ile yok olduğunu göstermektedir. Bu ise, bir kez daha CD123'ün köklük özelliği belirlemede kuvvetli marker özelliğinde olabileceğini düşündürmektedir.

Normal HPH markeri olarak görülen CD38+ popülasyondaki hücreler, K562 LKH'leri başta olmak üzere, en yüksek oranda LKH'lerinde görülmüştür. K562 LKH'lerinde CD38+ popülasyonun, K562/IMA-3 LKH'lerine oranla 1.6 kat; K562/IMA-3 diferansiye LKH'lerine oranla 7.2 kat; K562 diferansiye LKH'lerine oranla 10.7 kat; K562/IMA-3 hücrelerine oranla 86 kat; ve K562 hücrelerine oranla 86 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 31).Yaptığımız çalışmada CD38+ popülasyonun, diferansiye LKH'lerinde çok az oranda görülmesi; lösemik hücrelerinde ise hemen hemen hiç görülmemesi, kanser hücre topluluğunun normal HPH özelliklerinden farklı olduğunu göstermesi açısından önceki bilgilerimizi destekler niteliktedir. Ancak CD38+ popülasyonun, beklenenin aksine LKH'lerinde oldukça yüksek oranlarda görülmesi, daha önceki yapılan birçok çalışmalarda belirtildiği gibi CD38+'liğin negatifleşmesi yani, ifade edilmeme bilgisi ile ters düşmektedir. Bu durum, LKH'ler sort edilirken bazı aksaklıklar nedeniyle LKH'lerinin saf olmadığının ve içinde HPH'lerin olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Örneğin, manyetik boncukların afinite problemi gibi nedenlerle CD38+ hücrelerin kolondan akması (böylece HPH'lerin de izole edilmesi) sonucu saflığın sağlanamamış olabileceği düşünülebilir. Ancak, LKH'lerin izole edildiği K562 ve K562/IMA-3 hücrelerinde CD38+ popülasyonun hemen hemen hiç görülmemesine (sırasıyla, % 0.1 ve 0.1) rağmen, izole edilen K562 ve K562/IMA-3 LKH'lerinde oldukça yüksek oranlarda (sırasıyla, % 8.6 ve 5.4) görülmesi, bu ihtimalin olmadığının (Şekil 31) ve HPH'lerin, LKH izolasyonundan sonra ortaya çıktığının bir göstergesidir. Ancak bu sonuç, kanserleşmiş de olsa, köklük özelliğinde olan normal HPH ve KKH biyolojilerinin benzerliğini de ifade ediyor olabilir. Ayrıca tümör başlatan hücrelerin normal kök hücrelerinden gelişme ihtimalinin yüksek olduğunun da bir göstergesi olabileceği gibi, KKH'lerinin normal kök hücrelerden ayrılmasındaki zorluğu bir kez daha gözler önüne sermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda HPH markeri olan CD38+'lik oranının, neden LKH popülasyonunda yükseldiği ile ilgili daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiği ortadadır.

Diferansiye olmadan çoğalan tek besiyeri olan lösemik kök hücre ekspanse ortamında kültüre edilerek çoğaltılan CD34+/CD38- K562 ve K562/IMA-3 LKH'leri, immün yetmezlikli NUDE fareye subkutan olarak transplante edildi. Farelerde, K562/IMA-3 LKH'leri daha hızlı ve daha büyük olmak üzere, her iki LKH'lerinin de transplante edildiği

NUDE farede tümör oluşturabilme kapasitesinin olduğu tümörojenite deneyi ile gösterilmiştir. Böylece iki hücre hattından izole edilen LKH'lerinin KKH özelliği açısından konfirmasyonu sağlanmıştır (Şekil 32). Ayrıca CD34+/CD38+ K562 hücrelerinin NUDE farede tümör oluşturamadığı gözlenerek (Şekil 32), LKH özelliği taşımadığı sonucu çıkarılırken, CD34+/CD38+ K562/IMA-3 hücrelerinin NUDE fareye transplante edildiği sırt kısmında küçük bir tümör oluşumunun gözlenmesi (Şekil 32), bu hücre popülasyonunun da tümör başlatma yeteneğinde olabileceği sonucunu göstermektedir. Bu durumun daha detaylı araştırmalarla aydınlatılması gerektiği açıktır.

İzole edilen LKH'lerinin KML özelliğindeki hücreler olduğunun belirlenmesi için, %95'in üzerinde görülme oranı ile tanı koydurucu olan BCR/ABL translokasyon varlığı, kantitatif real time PCR yöntemiyle BCR/ABL mRNA miktarına bakılarak gösterilmiştir. BCR/ABL ekspresyonu her iki LKH'lerinde korunmuş olmakla birlikte, mRNA miktarları izole edildikleri hücre hattına göre; K562 ve K562/IMA-3 LKH'lerinde azalma göstermiştir (sırasıyla 1.8 ve 1.6 kat) (Şekil 33). BCR/ABL füzyon proteini hücrede çoğalma, sağkalım, direnç ve farklılaşma mekanizmalarını düzenlediği bilinmektedir (Şekil 6). Yukardaki sonuçlar dikkate alındığında, BCR-ABL ekspresyon miktarının varlığı, hem KML özelliği ile uyumlu olduğu, hem de LKH'lerinde görülen apoptoz ve tedavi direncinin ve sağkalımın artması ile ilişki olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bununla birlikte, bizim sonuçlarımızda görülen LKH'lerde BCR/ABL ekspresyon miktarındaki azalmanın, LKH karakterinin lösemi hücrelerine göre değiştiği, ancak bu değişikliğin, çoğalma ve farklılaşmada azalmanın görüldüğü köklük karakteri ile ve G0 fazında bulunma ile (Şekil 25 ve 26) ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu konunun, BCR/ABL ekspresyonu, aktivitesi ve mekanizması açısından LKH'lerinde daha detaylı araştırmalar ile ancak aydınlanabileceği açıktır.

Ökaryotik kromozomların uç kısımlarında bulunan ve kromozom bütünlüğünü koruyan telomerik yapılarda, her hücre siklus sonrasında, DNA replikasyon problemi olarak da tanımlanan, bir miktar kısalma görülür. Bu kısalma kritik bir uzunluğa geldiğinde hücre çoğalmayı durdurur. Telomeraz enzimi bu telomerik yapıları uzatarak hücrelerin bölünme kapasitesini artırır. Bu enzim, germ hücreleri, kök hücreler ve kanser hücrelerinde aktif olup, telomeraz aktivitesinin tayini, kanser hücrelerinin bölünme kapasitesinin değerlendirilmesi açısından önemlidir (100). Biz de çalışmamızda telomeraz enzim aktivitesinin mRNA miktarını, kantitatif real time PCR deneyi ile ölçerek değerlendirdik. K562/IMA-3

LKH'lerinde telomeraz aktivitesi, K562/IMA-3 hücrelerine göre artma (2.8 kat) gösterirken; K562 LKH'lerinde telomeraz aktivitesi, K562 hücrelerine oranla azalmış (1.8 kat) olarak görülmüştür (Şekil 34). Bu sonuçlar, her iki LKH'lerinin bölünme ve immortalite kapasitelerini anlamak bakımından önemlidir. K562/IMA-3 LKH'lerinin kök hücre özelliğinde olması nedeniyle beklendiği gibi bu artış, izole edildiği K562/IMA-3 hücrelerinden daha yüksek bir bölünme ve immortalite kapasitesinin olduğunu göstermektedir. Tersine, K562 LKH'leri de kök hücre özelliğinde olmasına rağmen, izole edildikleri kanser hücrelerinden daha az bölünme ve immortalite kapasitesine sahip gibi görünmektedir. Yukarıda belirtilen hücre siklus analizinde, K562 CD34+ hücrelerinin diploid olduğu görülmüş ve bu sonuç, sessizleşmenin (G0) yani köklük özelliğinin bir belirtisi olarak yorumlanmıştı. Bu yorum, K562 LKH'lerin telomeraz aktivitesinin azalması ile de uyumlu olup, bu hücrelerin G0 fazında olma ihtimalini akla getirmekte ve köklük özelliğinin bir belirtisi olduğunu düşündürmektedir. Bu durumun, hücrelerin sessizleştiği G0 fazı ile ilgisinin olup olmadığının belirlenmesi açısından daha ileri araştırmalar gerektirdiği açıktır. K562/IMA-3 LKH'lerinde görülen telomeraz aktivitesindeki artış ise, daha önce yapılan K562/IMA-3 CD34+ hücrelerinin hücre siklus analiz sonuçlarında görülen diploidi sonucu ile ve K562/IMA-3 lösemi hücrelerinin telomeraz aktivitesi ile ters düşmektedir. Bu sonuç, K562/IMA-3 LKH'lerinin daha çok bölünme ve immortalite kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. K562/IMA-3 LKH'lerinin, tedavi direnci, relaps ve metastaza yatkınlık bakımından daha dirençli lösemi hücrelerini oluşturma özelliği düşünülürse, artmış bölünme yeteneği bakımından farklılaşma ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Tüm bu sonuçların daha detaylı araştırmalarla açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Ancak bizim çalışmamızda, *in vitro* LKH hattı üretimi açısından artmış immortalite kapasitesinin, şayet farklılaşma önlenbilirse bir avantaj olabileceğini düşünmekteyiz.

AF ile pozitif boyanma, farklılaşmamış hücrelerin varlığını gösterir. AF boyama, K562 ve K562/IMA-3 hücrelerinde negatif, bu hücrelerden izole ettiğimiz LKH'lerinde pozitif boyandığı gösterilerek, LKH'lerinin diferansiye olmadan çoğaldıkları, kontrol grubu olarak izole edildikleri hücreler ile karşılaştırılarak konfirme edildi (Şekil 35, 36, 37 ve 38).

Hücre hattının devamı ve kalite kontrolü için mikoplazma kontaminasyonu açısından değerlendirilmesi gerekir. Çalışmamızda ürettiğimiz LKH'leri mikoplazma kontaminasyonu açısından test edilerek, mikoplazma varlığının olmadığı gösterilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kanser başlatan hücrelerin oluşumu ve kanser oluşturma mekanizması, normal kök hücreler ile KKH'leri arasındaki farkların detaylı olarak belirlenmesi ve multimodal tedavi stratejilerinde KKH'lerinin hedef alınması güncel bilimsel konulardan birisidir. KKH'lerin yeterince tanınması, gelişme ve ilerleme mekanizmalarının anlaşılması, farklılıklarının bulunması ile çözülebilir. KKH'lerinin mekanizma ve farklılıklarının tanımlanması, KKH'lerine hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin yanında, normal dokuların ve normal kök hücrelerin de korunması (hem tedaviler sırasındaki toksik etkilerden hem de kanser gelişmesinden) açısından büyük önem arz etmektedir. Ancak, normal kök hücrelerle yakın benzerliği nedeniyle KKH'lerinin *in vitro* ortamdaki araştırmalarında güçlüklerle karşılaşmaktadır. Günümüzde her ne kadar bazı faktörlerin, moleküllerin ve ajanların kök hücrelerin farklılaşma sürecindeki rolleri bilinse de, farklılaşmanın çok faktörlü bir mekanizma ile kontrol edilmesi sonucunda, ancak belirli oranda kök hücrelerin farklılaşmadan çoğalması sağlanabilmektedir. Gerekli olan faktörler veya otokrin/parakrin moleküller ve farklılaşma mekanizmaları daha detaylı belirlendiğinde istenilen yüksek oranda ve saflıkta KKH hatları elde edilebilecektir.

Bu nedenle yaptığımız bu çalışma, gelecekte bu yönde daha fazla araştırmaların yapılabilmesi için uygun kalite ve standartta *in vitro* olarak KML kök hücre hattının üretim çalışmasıdır. Yukarıda değindiğimiz sorunların çözümüne yönelik araştırmaların yapılabilmesi için, önemli bir materyal eldesinin sağlanması yolunda çalışmamızın bir ön hazırlık niteliğinde olduğunu düşünmekteyiz. Bu doğrultuda çalışmamızda, KKH hattının üretiminde ortaya çıkabilecek güçlükler gündeme getirilmiş, tartışmalı noktalar gözler önüne serilmiştir. Ayrıca çalışmamızda insan hücre hatları olarak, bir kök hücre hastalığı olan KML hücrelerin kullanılmasının, çalışmamıza ek avantajlar sağladığını da düşünmekteyiz. Bu çalışmanın sonucunda, KML kök hücrelerinin *in vitro* olarak üretiminin zor, ama olası olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda bu çalışma sonucunda, gelecekte primer kültür, hayvan deneyleri ve faz çalışmaları gibi daha ileri çalışmalara geçilebileceği kanaatindeyiz. Ancak tartışma bölümünde belirtilen konuların daha detaylı araştırmalar ile aydınlatılması gerektiği de ortadadır.

6. KAYNAKLAR

1. Gerber JM, Qui L, Kowalski J et al. Characterization of chronic myeloid leukemia stem cells Am. J. Hematol. 2011; 86: 31–37.
2. Nicholson E, Holyoake T. The Chronic Myeloid Leukemia Stem Cell. Clinical Lymphoma and Myeloma. 2009; 9: 376-381.
3. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. NEJM. 1999; 341: 164-172.
4. Fernandez HF, Kharfan-Dabaja MA. Tyrosine kinase inhibitors and allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myeloid leukemia: targeting both therapeutic modalities. Cancer Control. 2009; 16: 153-157.
5. Leber B. Kml biology for the clinician in 2011: six impossible things to believe before breakfast on the way to cure. Current Oncology. 2011; 18: 185-190.
6. Kim JA. Targeted therapies for the treatment of cancer. Am J Surg. 2003; 186: 264-8.
7. Wei G, Rafiyath S, Liu D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. J Hematol Oncol. 2010; 3: 1-10.
8. Baran Y, Gündüz U. Kronik myeloid lösemi genetiği. Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics. 2007; 3: 50-55.
9. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. Ann Intern Med. 1999; 131: 207-219.
10. Jamieson CH. Chronic myeloid leukemia stem cells. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008: 436-442.
11. Chonell JC, Turhan A. Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. Oncotarget. 2011; 2:713-727.
12. Nerlov C. Targeting a chronic problem: elimination of cancer stem cells in CML. The EMBO Journal. 2009; 28: 167–168.
13. Chen Y, Peng C, Sullivan C, Li D, Li S. Novel therapeutic agents against cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. Anticancer Agents Med Chem. 2010; 10: 111-115.
14. Sell S. On the Stem Cell Origin of Cancer. AJP. 2010; 176: 2584-2594.

15. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414: 105–11.
16. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*. 2006; 66 (4): 1883-90.
17. Buss EC, Ho AD. Leukemic stem cells. *Int J Cancer*. 2011; 129: 2328-36.
18. Lane SW, Gilliland DG. Leukemia stem cells. *Seminars Cancer Biol*. 2010; 20: 71-78.
19. Chen Y, Peng C, Sullivan C, Li D, Li S. Novel therapeutic agents against cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010; 10: 111-115.
20. Goldman JM, Mughal TI. Chronic myelogenous leukemia. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, Eds. *Postgraduate Haematology*. 5. Ed., Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd, 2005: 603-618.
21. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22(1): 14-22.
22. Bhatia R, Radich JP. Chronic myeloid leukemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil S, Furie B, Silberstein LE, McGlave P, Heslop H, Eds. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 5. Ed., Philadelphia: Elsevier Inc. 2009: 1109-1123.
23. Lichtman MA, Liesveld JL. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT, Eds. *Williams Hematology*. 7. Ed., New York: McGraw-Hill Co, 2006: 1237-1294.
24. Lee SJ. Chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 2000; 111: 993-1009.
25. Geary CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol*. 2000;110(1):2-11.
26. Ren R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5: 172-183.
27. Chen Y, Peng C, Li D, Li S. Molecular and cellular bases of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*. 2010; 1:124-132.
28. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 96: 3343-3356.

29. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist*. 2000; 5: 405-415.
30. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996; 88: 2375-2384.
31. Zheng X, Güller S, Beissert T, Puccetti E, Ruthardt M. BCR and its mutants, the reciprocal t(9;22)-associated ABL/BCR fusion proteins, differentially regulate the cytoskeleton and cell motility. *BMC Cancer*. 2006; 6: 262.
32. Quintas-Cardama A and Cortes J. Molecular biology of *bcr-abl*-positive chronic myeloid leukemia *Blood*. 2009; 113: 1619-30.
33. Kurosu T, Wu N, Oshikawa G, Kagechika H, Miura O. Enhancement of imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells by nutlin-3 through synergistic activation of the mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis*. 2010; 15: 608-620.
34. Garcia-Manero G, Talpaz M, Faderl S, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP, Eds. *Blood: Principles and Practice of Hematology*. 2. Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003: 433-454.
35. Chen Y, Peng C, Sullivan C, Li D, Li S. Critical molecular pathways in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010; 24: 1545-1554.
36. Goldman JM, Marin D. Management of chronic myeloid leukemia. *Semin Hematology*. 2003; 40: 1-103.
37. Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol*. 1997; 96(1): 111-6.
38. Kantarjian HM, Cortes J, La Rosée P, Hochhaus A. Optimizing therapy for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer*. 2010; 116: 1419-1430.
39. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 1988; 61(7): 1441-6.
40. Savona M and Talzap M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nature Reviews Cancer*. 2008; 8: 341-350.

41. Baccarani M, Dreyling M; ESMO Guidelines Working Group. Chronic myelogenous leukemia: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2009; 20: 105-107
42. Wang YL, Bagg A, Pear W, Nowell PC, Hess JL. Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001; 32: 97-111.
43. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009: 453-460.
44. von Bubnoff N, Duyster J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107: 114-121.
45. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *NEJM.* 2003; 349: 1451-1464.
46. Corbin SA, Agarwal A, Loriaux M et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *The Journal of Clinical Investigation.* 2011; 121: 396-409.
47. Lee N, Kim KH and Lee SC. Oral chemotherapeutic agents in current use. *J Korean Med Assoc.* 2011; 54(11): 1191-1198.
48. Gencer EB, Ural AU, Avcu F, Baran Y. A novel mechanism of dasatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia; ceramide synthase and ceramide clearance genes. *Ann Hematol.* 2011; 90: 1265-1275.
49. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730–7.
50. Bruce WR, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature.* 1963; 199: 79–80.
51. Stuart SA, Minami Y, Wang JYJ. The CML stem cell: Evolution of the progenitor. *Cell Cycle.* 2009; 8(9): 1338–1343.
52. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 3983–8.

53. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005; 65: 9328–37.
54. Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE. Identification of bronchoalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell.* 2005; 121 (6) : 823-35.
55. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E. Identification and expansion of human colon-cancer –initiating cells. *Nature.* 2007; 445 (7123): 111-15.
56. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 10946–51.
57. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R, et al. Ovarian cancer side population define cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103: 11154–9.
58. Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature.* 2006; 444: 761–5.
59. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res.* 2012; 22: 457–72.
60. Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science.* 2009; 324 (5935): 1670-3.
61. Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1805: 105–17.
62. Notta F, Mullighan CG, Wang JCY, Poepl A, Doulatov S, Phillips LA, et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature.* 2011; 469: 362-7.
63. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007; 58: 267–84.
64. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 2007; 6: 2332–8). Dick JE, Wang JCY. Cancer stem cells: Lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology.* 2005; 15 (9): 492-501.

65. Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cell as a two edged sword from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol*. 2006; 57 (7): 5-16.
66. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ishisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cell from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-72.
67. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M. Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy. *Oncology Journal*. 2014; 28(12): 1101-7.
68. Nievergall E, Ramshaw HS, Yong ASM, Biondo M, Busfield SJ, Vairo G and et al. Monoclonal antibody targeting of IL-3 receptor α with CSL362 effectively depletes CML progenitor and stem cells. *Blood*. 2015; 123 (8): 1218-28.
69. Deeley RG, Westlake C, Cole SPC. Transmembrane transport of Endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*. 2006; 86: 849–99.
70. Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*. 2008; 6: 190–7.
71. Roy S, Srivastava R, Shankar S. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J Mol Signal*. 2010; 5: 10.
72. Guo G, Qiu X, Wang S, Chen Y, Rothman PB, Wang Z, et al. Oncogenic E17K mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 promotes v-Abl-mediated pre-B-cell transformation and survival of Pim-deficient cells. *Oncogene*. 2010; 29: 3845–53.
73. Qiu X, Guo G, Chen K, Kashiwada M, Druker BJ, Rothman PB, et al. A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl induced tumorigenesis. *Neoplasia*. 2012; 14: 547–58.
74. Templeton AK, Miyamoto S, Babu A, Munshi A, Ramesh R. Cancer stem cells: progress and challenges in lung cancer. *Stem Cell Investigation*. 2014; 1: 9-26.

75. Dontu G, Jackson K, McNicholas E, Kawamura M, Abdallah W, Wicha M. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* 2004; 6: R605–R615.
76. Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 3130–40.
77. Zeng YA, Nusse R. Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. *Cell Stem Cell.* 2010; 6: 568–77.
78. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005; 434: 843–50.
79. Celso CL, Scadden DT. Haematopoietic stem cell niche at a glance. *J Cell Sci.* 2011; 124: 3529–35.
80. Konopleva M, Jordon CT. Leukemic stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J Clin Onco.* 2011; 28: 1–9.
81. Peled A, Tavor S. Role of CXCR4 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Theranostics.* 2013; 3: 34–39.
82. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia.* 2008; 23: 43–52.
83. Konopleva M, Tabe Y, Zeng Z, Andreeff M. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat.* 2009; 12: 103–13.
84. Folkens C, Man S, Xu P, Shaked Y, Hicklin DJ, Kerbel RS. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res.* 2007; 67: 3560–4.
85. Özdemir H, Artaç H. Akım sitometri ve temel özellikleri. *Selçuk Pediatri.* 2013; 1 (1): 12–5.
86. DenizG, Yılmaz TM, Yıllar G. Flow sitometri ve tıpta kullanımı. 2004; 1–9.
87. Norman A. Flow cytometry. *Med Phys.* 1980; 7: 609.
88. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from stanford. *Clin Chem.* 2002; 48: 1819–1827.

89. Ibrahim SF, Engh GVD. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 2007; 106: 19–39.
90. Safarik I, Safarikova M, Hafeli U, Schütt W, Teller J, Zbrowski M. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. 1997, Plenum Press, New York, London, p:323.
91. Halbreich A, Roger J, Pons JN, Da Silva MD. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. 1997, Plenum Press, New York, London, p:399.
92. Mykhaylyk OM, Rrazumov ON, Dudchenko AK, Pankratov YV, Dobrinsky EK. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. 1997, Plenum Press, New York, London, p:177.
93. Miltenyi S, Müller V, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 1990; 11: 231-238.
94. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Meth Molec Biol.* 2004; 281: 301-311.
95. Darzynkiewicz Z, Crissman HA, Jacobberger JW. Cytometry of the cell cycle. Cycling through history. *Cytometry.* 2004; 58A: 21–32.
96. Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 676: 137–147.
97. Inzunza J, Gertow K, Stromberg MA et al. Serivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using post natal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cell.* 2005; 23: 544-549.
98. BD Biosciences. Introduction to FACS: A learning guide 2000. Available at: <http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups> Erişim tarihi 25 Ekim 2014.
99. Dresco PA, Zaitsev VS, Gambino RJ, Chu B. Preparation and properties of magnetic and polymer magnetite nanoparticles. *Lengmuir.* 1999; 15: 1945-51.
100. Shay J W, Zou Y, Hiyama E, Wright W E. Telomerase and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 677-685.

7. EKLER

7.1. EK 1:

Karar No:2012/25-10		Tarih: 12.07.2012			
Karar Bilgileri Prof.Dr.Mehmet Ali ÖZCAN'ın sorumlusu olduğu "Kronik Myeloid Lösemi Kık Hücre Hattı Üretimi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy çokluğu ile karar verilmiştir. Tümöröjenite testi için ayrıca Deney Hayvanları Etik Kuruluna müracaat edilmesi gerekmektedir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI		Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu			
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Banu
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐ H ☒	Besti
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Osman
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐ H ☒	Mehtap
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	Reyhan
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Nejat
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Adnan
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Ece
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Hüseyin
Prof.Dr.Refik MAS	İç Hastalıkları (Geriatri B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	Refik
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Mukaddes
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Ayşe
Doç.Dr.Işıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Işıl
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Meltem
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	İhsan

* ŞERH EKTE SUNULMUŞTUR (iki sayfa)

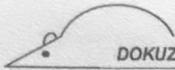
Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

7.2. EK 2:

BİLGİLERİ	Karar No:2013/37-16	Tarih: 10.10.2013				
	Prof.Dr.Mehmet Ali ÖZCAN'ın sorumlusu olduğu "Kronik Myeloid Lösemi Kök Hücre Hattı Üretimi" isimli klinik araştırmaya ait 02.10.2013 tarihli araştırmacı dilekçesine ilişkin olarak; - Sibel Azizenur ÖZTÜRK'un çalışmaya dahil olması ve doktora tezi olarak kabul edilmesi ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Psikiyatri Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

7.3. EK 3:

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 06/04/2014
Toplantı Tarihi : 19 Şubat 2014

Prof.Dr.M.Ali ÖZCAN
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

10/2014 Protokol No’lu; yürütücüsü olduğunuz “Kronik myloid lösemi kök hücre hattı üretimi” isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı (Araştırmacı) Prof.Dr.Alper SOYLU Üye (Topl.katılmadı) Prof.Dr.Tolga Fikri KOROĞLU Üye Prof.Dr.Gülgün OKTAY Üye (Topl.katılmadı) Prof.Dr.Safiye AKTAŞ Üye (Araştırmacı) Prof.Dr.Tonay İNCEBOZ Üye Vet.Hekim Adnan SERPEN Üye Zehra KINAM Üye	Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN Başkan Yardımcısı Prof.Dr.Ayşe GELAL Üye Prof.Dr.Hüseyin BASKIN Üye Prof.Dr.Turna İLKNUR Üye Doç.Dr.Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU Üye Prof.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK Üye Doç.Dr.Türkan ERTAY Üye
--	---

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır

7.4. ÖZGEÇMİŞ:

SİBEL AZİZENUR ÖZTÜRK

TC Kimlik No:	23825050432
Yazışma Adresi :	Devlet Hava Meydanları İşletmesi Genel Müdürlüğü, Çubuk/ANKARA
Telefon :	0535 3459575
e-posta :	sanozturk@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Mezuniyet Yılı
Gazi Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	2012
Erciyes Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Tıp	1994

ARAŞTIRMA DENEYİMLERİ

Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezinde 5 gün süre ile yoğun bir teorik ve pratik uygulamalı eğitime ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik doktora tez dönemimde 40günlük gönüllü pratik eğitime katıldım. Mezenkimal kök hücre kültür yöntemleri, MTT, PCR, ELİSA, monoklonal antikor, caspaz aktivitesi gibi immünohistokimyasal ve moleküler yöntemler; mikroskopik yöntemler rejeneratif kök hücre, doku mühendisliği yöntemleri; Flow sitometri kullanımı ve yöntemleri gibi birçok laboratuvar ve kök hücre alanda bilgi edinme ve uygulama tecrübeleri edindim (2011).

TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Marmara Araştırma Merkezinde 5 gün süre ile yoğun bir teorik ve pratik uygulamalı eğitime katıldım. Uygulamalı olarak farelerden embriyonik kök hücre eldesi, embriyonik kök hücre kültürü, klonlama yöntemleri konusunda temel araştırma bilgilerini öğrendim (2012).

Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ve Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavi Merkezi laboratuvarlarında doktora tezimde, tiroid kanser hücre kültürü; telomeraz aktivitesi için TRAP; apoptoz tayini için AnnexinV Flow Sitometri ve Caspas-3 ELİSA; telomeraz, apoptotik, proliferatif, anjiogenetik, hücre siklusu ve tümör süpressör gen tayini için PCR; hücre canlılığı ölçümü için MTT yöntemlerini kullandım (2010-2012).

KATILDIĞI KURS, WORKSHOP, DERS VE SERTİFİKASYON PROGRAMLARI

Kalıtsal Hastalıklarda Mikroarray Uygulamaları - Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Pediatrik Temel Bilimler ABD Moleküler Metabolizma Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2015, Bahar Dönemi).

İlaç Analizlerinde Spektroskopik Yöntemler - Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya ABD Analitik Kimya Tezli Yüksek Lisans Özel Öğrenci Programı, Ankara (2015, Güz Dönemi).
İmmünotoksikoloji - Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji ABD Toksikoloji Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2015, Bahar dönemi).
Fitotoksikoloji - Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji ABD Toksikoloji Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2015, Bahar dönemi).
CRP Kursu Katılım Belgesi – Ankara Tabip Odası, Ankara (2014, 16 Şubat).
Sağlık Hukuku Sertifika Belgesi – İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, Radikal Akademi, İzmir (2014, 25 Ocak-09 Şubat).
Embriyonik Kök Hücre Kültürü Uygulamalı Eğitim Kursu Katılım Sertifikası - TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Kocaeli (2012, 04-08 Haziran).
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları ve Etik Kursu Sertifikası, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi, Ankara (2012, 29 Nisan-10 Mayıs).
I.Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu Katılım Balgesi–Hücre Ölümü Araştırma Derneği, İzmir (2011, 24-25 Kasım).
II. Kök Hücre Kursu Katılım Belgesi – Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara (2011, 24-25 Haziran).
Nonenzimatik Yöntemle Adipoz Kök Hücre İzolasyonu Kursu – International Cell Assisted Surgery, İstanbul (2011, 29 Mayıs).
XIV.Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Katılım Sertifikası – Kocaeli Üniversitesi Sürekli Eğitim ve Uygulama Merkezi ve Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma Ve Uygulama Merkezi, Kocaeli (2011, 21-25 Mart).
Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi Katılım Belgesi - Kocaeli Üniversitesi Sürekli Eğitim ve Uygulama Merkezi ve Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma Ve Uygulama Merkezi, Kocaeli (2011, 22 Mart).
I.Kök Hücre Kursu Katılım Belgesi – Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara (2010, 25-26 Haziran).
Hücrel Tedavi Kursu Katılım Belgesi – Hücrel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği, Nevşehir (2009, 05 Mart).
Kansere Özel Temel İstatistik Kavramlar - Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2008, Bahar dönemi).
Hücre Membranı ve Sinyal İletimi Mekanizmaları-Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Kanseri Biyokimyası Yüksek Lisans Özel Öğrenci Programı, Ankara (2008, Güz dönemi).
Kanser Biyokimyası 1-Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2007, Bahar dönemi).
Tümör Biyolojisi,Karsinogenez ve Tümör Sitopatolojisi 1- Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2007, Bahar dönemi).

Tümör Biyolojisi,Karsinogenez ve Tümör Sitopatolojisi 1- Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2007, Güz dönemi).
Temel İmmünoloji 2- Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2007, Güz dönemi).
Temel İmmünoloji 1- Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Özel Öğrenci Programı, Ankara (2006, Bahar dönemi).
30. Travma ve Resüsitasyon Kursu Sertifikası – Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Derneği, Ankara (2004, 14-17 Aralık).
İş Hekimliği Sertifikası (62 saatlik teorik ve pratik eğitim kursu-Diploma No: 18197/98) –Türk Tabipler Birliği Merkez Konsey Başkanlığı, Ankara (1998).

KATILDIĞI KONGRE ve SEMPOZYUMLAR

I. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi – Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği, Nevşehir (Kapadokya) (2009, 06-08 Mart).
V. Kök Hücre Sempozyumu Katılım Belgesi – Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara (2010, 25-26 Haziran).
I.International Cell-Assisted Surgery Congress Certificate of Attendance – ICAS (International Cell-Assisted Surgery), İstanbul (2011, 28-29 Mayıs).
VI. Kök Hücre Sempozyumu Katılım Belgesi – Türkiye Bilimler Akademisi, Ankara (2011, 24-25 Haziran).
I. Uluslar arası Kök Hücre Araştırmaları Kongresi Katılım Belgesi – Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Sakarya (Sapanca) (2011, 28 Eylül-02 Ekim).
I. International Conference on Stem Cell Research and Applications Certify of Attendance – Erciyes Üniversitesi, Kayseri (2011, 07-09 Ekim).
Kanser Kök Hücre Sempozyumu Katılım Belgesi – Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği ve Pamukkale Üniversitesi, Denizli (2012, 17-19 Şubat).
Molecular Medicine Conference 2012 Alternative Strategies Against Cancer and Inflammation Certification of Attendance – Faculty of Medicine Siriraj Hospital and Mahidol University, Bangkok (Tayland) (2012, 19-22 Aralık).
4. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi - Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği, Erciyes Üniversitesi, Nevşehir (Kapadokya) (2014, 28 Şubat-02 Mart).
5. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi - Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta (2014, 09-12 Eylül).
II. Uluslar arası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi – Erciyes Üniversitesi, Kayseri (2015, 17-19 Nisan).