



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ISHIKAWA VE HUVEC HÜCRELERİ İLE OLUŞTURULMUŞ SFEROİD
MONO-KÜLTÜR VE SFEROİD KO-KÜLTÜR MODELLERİNİN
MORFOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL (E-KADERİN VE BETA-
KATENİN) OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

SEMİHA MERVENUR KALENDER

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç.Dr. İLKNUR KESKİN

İSTANBUL-2020

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimime başladığım günden itibaren üzerimden bilgi ve tecrübelerini eksik etmeyen, her zaman örnek olmaya çalışan çok değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç.Dr. İlknur Keskin'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca meslek ve hayata dair tecrübelerini her zaman paylaşan değerli hocam Dr.Öğr. Üyesi Seda Karabulut'a,

Hücre kültürünü bana öğreterek gece gündüz demeden tezime benimle birlikte emek veren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen İstanbul Medipol Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Görevlisi M. Volkan Bülbül'e,

Her zaman sorularıma cevap verip bana yardımcı olan İstanbul Medipol Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Bircan Kolbaşı'na

Yüksek Lisans tez sürecim boyunca bana destek olan tüm SABITA çalışanları ve İlayda Aydın'ı ya,

Yüksek Lisans tezim için istatistiksel verilerimi hazırlamamda bana gece gündüz yardım eden Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İstatistik bölümü mezunu sevgili kardeşim Nurefşan Kalender'e,

Eğitim hayatım boyunca bugünlere gelmemde en çok emeği olan maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevgili annem Z. Neslihan Kalender ve babam B. Kudret Kalender'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ	xii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Hücre Kültürü.....	6
4.1.1. Hücre kültürünün tarihi, gelişimi ve günümüzdeki durumu.....	7
4.2. Hücre Kültürü Sınıflandırılması.....	10
4.2.1. Kullanılan hücre kaynağına göre sınıflandırma.....	10
4.2.2. Büyüme şekillerine göre sınıflandırma.....	11
4.2.3. Morfolojilerine göre sınıflandırma	12
4.3. İki Boyutlu Hücre Kültürü	13
4.4. Üç Boyutlu Hücre Kültürü	15
4.4.1. Farklı üç boyutlu hücre kültürü modelleri	16
4.5. Ko-Kültür	29
4.5.1. Direkt ko-kültür modelleri	31
4.5.2. İndirekt ko-kültür modelleri.....	32
4.6. Tümör Mikro Çevresi.....	33
4.6.1. Fibroblast hücreleri	35
4.6.2. Endotel hücreler	36

4.6.3. Adiposit hücreleri	38
4.6.4. İmmün hücreleri.....	39
4.6.5. Ekstrasellüler matriks	42
4.7. Adezyon Molekülleri.....	43
4.7.1. İntegrinler.....	45
4.7.2. İmmünoglobulin süper ailesi (IgSF)	46
4.7.3. Selektinler	47
4.7.4. Kaderinler	48
4.8. Tümör Anjiyogenezi.....	54
4.8.1. Anjiyogenezde adezyon moleküllerinin rolü	57
5. GEREÇ VE YÖNTEM	59
5.1. Gereç	59
5.1.1. Deneylerde kullanılan materyaller.....	59
5.2. Yöntem	61
5.2.1. Hücreler için gerekli besiyeri ortamlarının hazırlanması	61
5.2.2. Hücrelerin çözülmesi	61
5.2.3. Hücrelerin tripsinizasyonu, pasajlanması ve dondurulması	62
5.2.4. Hücrelerin sayılması	62
5.2.5. Yapışkan olmayan yüzey oluşturma	63
5.2.6. Huvec ve Ishikawa hücrelerinin üç boyutlu mono-kültürü	63
5.2.7. Huvec ve Ishikawa hücrelerinin üç boyutlu ko-kültürü.....	63
5.2.8. Huvec ve Ishikawa hücrelerinin iki boyutlu ko-kültürü	64
5.2.9. Üç boyutlu mono-kültür ve ko-kültür sistemlerinde oluşturulan sferoidlerin büyüklüklerinin ölçülmesi	64
5.2.10. Üç boyutlu Huvec mono-kültür, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin E-Kaderin ve β -Katenin immünofloresan boyaması ve görüntülenmesi.....	65

5.2.11. Ishikawa ve Huvec hücrelerinin iki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde E-Kaderin ve β -Katenin immünofloresan boyaması ve görüntülenmesi.....	67
5.2.12. Huvec ve Ishikawa hücreleriyle oluşturulan ko-kültür sferoidlerinin E-Kaderin ve β -Katenin polink ikili boyama sistemi ile boyanması.....	68
6.BULGULAR.....	70
6.1. Üç Boyutlu Mono-Kültür ve Ko-kültür Sisteminde Oluşturulan Huvec ve Ishikawa Sferoidlerinin Büyüklüklerinin Ölçülmesi.....	70
6.1.1.Üç boyutlu mono-kültür sisteminde oluşturulan Huvec sferoidlerinin büyüklüklerinin ölçülmesi	70
6.1.2. Üç boyutlu mono-kültür sisteminde oluşturulan Ishikawa sferoidlerinin büyüklüklerinin ölçülmesi	77
6.1.3. Huvec ve Ishikawa hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu ko-kültür sferoidlerinin büyüklüklerinin ölçülmesi.....	85
6.2. Üç Boyutlu Mono-Kültür ve Ko-Kültür Sistemlerinde Oluşturulan Sferoidlerin Büyüklüklerinin İstatistiksel Analizi ve Karşılaştırılması.....	92
6.3. Huvec Mono-Kültür, Ishikawa Mono-Kültür ve Ko-Kültür Sferoidlerinin E-Kaderin Antikoru ile İmmünofloresan Boyama Görüntülerinin Değerlendirilmesi	94
6.4. Huvec Mono-Kültür Sferoidinin E-Kaderin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-Stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi	96
6.5. Ishikawa Mono-Kültür Sferoidinin E-Kaderin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-Stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi	103
6.6. Huvec ve Ishikawa Ko-Kültür Sferoidinin E-Kaderin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-Stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi	107

6.7. Huvec, Ishikawa Mono-Kültür ve Ko-Kültür Sferoidlerinin Alexa Fluor 488 Intensity Ölçümlerinin İmage J ile Değerlendirilmesi	114
6.7.2. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümlerinin istatistiksel analizi.....	117
6.8. Huvec Mono-Kültür, Ishikawa Mono-kültür ve Ko-kültür Sferoidlerinin β -Katenin Antikoru ile İmmünofloresan Boyama Görüntülerinin Değerlendirilmesi	118
6.9. Huvec Mono-Kültür Sferoidinin β -Katenin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-Stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi..	120
6.10. Ishikawa Mono-Kültür Sferoidinin β -Katenin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi	124
6.11. Huvec ve Ishikawa Ko-kültür Sferoidinin β -Katenin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi	128
6.12. Huvec, Ishikawa Mono-Kültür ve Ko-Kültür Sferoidlerinin Alexa Fluor 488 Intensity Ölçümlerinin İmage J ile Değerlendirilmesi	132
6.12.2. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümlerinin istatistiksel analizi.....	137
6.13. Huvec ve Ishikawa Hücreleriyle Oluşturulan Ko-Kültür Sferoidlerinin E-Kaderin ve β -Katenin Polink İkili Boyama Görüntüleri	138
6.14. Ishikawa ve Huvec Hücrelerinin İki Boyutlu Mono-Kültür ve Ko-Kültür Modelinde E-Kaderin İmmünofloresan Boyama Görüntüleri.....	140
6.14.1. Ishikawa ve Huvec hücrelerinin iki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde Alexa Fluor 488 intensity ölçümlerinin istatistiksel analizi	144
6.15. Ishikawa ve Huvec hücrelerinin iki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde β -Katenin immünofloresan boyama görüntüleri.....	145

6.15.1. Ishikawa ve Huvec hücrelerinin iki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde Alexa Fluor 488 intensity ölçümlerinin istatistiksel analizi	149
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	151
8. KAYNAKLAR	158
9. ETİK KURUL ONAYI.....	167
10. ÖZGEÇMİŞ.....	170



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<u>Semboller</u>	<u>Açıklamalar</u>
2D	İki boyutlu
3D	Üç boyutlu
3p21	Gen bölgesi
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BJ/TERT LT	İnsan fibroblast hücre hattı
Ca ²⁺	Kalsiyum
CO ₂	Karbondioksit
CD2	T hücre reseptörü
CD4	T hücre reseptörü
CD8	T hücre reseptörü
CD62E	E-selektin
CD62L	L-selektin
CD62P	P-selektin
CDH3	Kaderin-3
CHO	Yumurtalık kanseri hücre hattı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Endotelyal büyüme faktörü
FBS	Fetal Sığır Serumumu

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller

Açıklamalar

FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGF-2	Fibroblast büyüme faktörü-2
Hela	Henrietta Lacks
Huvec	İnsan umbilikal ven endotelial hücre hattı
IFN γ	İnterferon γ
IgG	İmmünoglobülin G
IgSF	İmmünoglobülin süper ailesi
IL-4	İnterlökin-4
IL-10	İnterlökin-10
IL-13	İnterlökin-13
Ishikawa	Endometriyum kanseri hücre hattı
kDa	Kilo Dalton
L292	Fare bağı dokusu hücre hattı
M1	Tip-1 makrofaj
M2	Tip-2 makrofaj
MMP	Mariks Metalloproteinaz
MMP-9	Mariks Metalloproteinaz-9
mRNA	Mesajcı-ribonükleik asit
NASA	Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi
NIH 3T3	Fare embriyonik fibroblast hücre hattı

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

Semboller

Açıklamalar

PCL

Poli-kaprolakton

PDGF

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PDMS

Polidimetilsikloksan

PFA

Paraformaldehit

PEG

Polietilen glikol

PGA

Poliglikolik asit

PLA

Polilaktik asit

PLGA

Polilaktik-ko-glikolik asit

PMMA

Polimetilmetakrilat

Poli-HEMA

Poli-2-hidroksietil metakrilat

PVA

Polivinil asetat

SDF-1

Stromal hücre kökenli faktör-1

TCA

Doku Kültürü Derneği

TGF

Transforming büyüme faktörü

TGF- β

Transforming büyüme faktörü

Th1

Yardımcı T hücre-1

Th2

Yardımcı T hücre-2

VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFA

Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A

Wnt

Sinyal yolağı

ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ

Şekil Listesi

- Şekil 4.2.2.1** Yapışık olarak büyüyen NIH 3T3 hücrelerinin çözdürülmesinden 24 saat sonra ve 72 saat sonra gözlemlenen morfolojisi.....11
- Şekil 4.2.2.2** Süspansiyon olarak büyütülen BJ/ TERT LT hücrelerinin morfolojileri.....12
- Şekil 4.2.3.1** Fibroblastik hücre, epitelyal hücre, lenfoblastik hücre, nöronal hücre morfolojisi.....13
- Şekil 4.2.3.2** İki boyutlu hücre kültürü sistemlerinde hücrelerin bulunduğu ortam.....14
- Şekil 4.2.3.3** Tek tabakalı iki boyutlu hücre kültüründe büyütülen hücrelerin değişimi.....14
- Şekil 4.4.1** İki ve üç boyutlu hücre kültürü ortamında bulunan hücrelerin durumu.....16
- Şekil 4.4.1.1.1** İskele tabanlı üç boyutlu hücre kültürü sistemlerinde hücrelerin organizasyonu.....17
- Şekil 4.4.1.2.1** Sferoidlerin besin ve oksijen varlığında oluşan zonlarının gösterilmesi.....20
- Şekil 4.4.1.2.2** Çok hücreli tümör sferoidlerinin oluşumu.....21
- Şekil 4.4.1.2.3** Organotipik çok hücreli Sferoidlerin oluşumu.....21
- Şekil 4.4.1.2.4** Tümör dokusundan elde edilen çok hücreli tümör sferoidlerinin oluşumu.....22
- Şekil 4.4.1.2.1.1** Yapışkan olmayan yüzey üzerinde sferoid oluşturma.....24
- Şekil 4.4.1.2.2.1** Plaka yüzeyinde asılı damlacık tekniği ile sferoid oluşturma.....25
- Şekil 4.4.1.2.3.1** Spinner şişesi biyoreaktörleri ile oluşturulan sferoidler.....26

Şekil 4.4.1.2.3.2 Rotasyonel kültür sistemi kullanılarak oluşturulan sferoidler.....	26
Şekil 4.4.1.2.4.1 Mikroakışkan hücre kültürü tekniği kullanılarak oluşturulan hücre agregatları.....	27
Şekil 4.4.1.2.5.1 Manyetik levitasyon tekniği ile sferoid oluşturma.....	28
Şekil 4.5.1.1 Direkt ko-kültür sistemlerinde hücrelerin bulunduğu ortam.....	32
Şekil 4.5.2.1 İndirekt ko-kültür sistemleri.....	33
Şekil 4.6.1 Tümör mikro çevresinde bulunan hücrelerin gösterimi.....	34
Şekil 4.6.1.1 Kanser ilişkili fibroblastların orijini ve rolü.....	36
Şekil 4.6.2.1 Tümör ilişkili endotel hücrelerin orijini ve rolü.....	37
Şekil 4.6.3.1 Adipositlerin tümör hücresi üzerine olan etkisi.....	38
Şekil 4.6.4.1 Tümör mikro çevresinde bulunan immün hücreleri.....	39
Şekil 4.6.5.1 Tümör mikro çevresini oluşturan ECM matriks elemanları.....	42
Şekil 4.7.1 Dört ana adezyon molekülü ailesi.....	44
Şekil 4.7.1.1 İntegrin reseptörlerinin α ve β alt birimlerinden oluşan heterodimer yapısı.....	45
Şekil 4.7.2.1 Çeşitli hücrelerde eksprese edilen immüoglobulin süper ailesi üyeleri.....	46
Şekil 4.7.2.2 Hücreler arasında bulunan immüoglobulin süper ailesi adezyon molekülü.....	47
Şekil 4.7.3.1 E-, P-, L-Selektin ve bölgeleri.....	48
Şekil 4.7.4.1 Hücre membranı üzerinde kaderin adezyon moleküllerinin organizasyonu.....	48
Şekil 4.7.4.2 Kaderinlerin yapışmasına aracılık eden β -katenin ve α -katenin molekülleri.....	50

Şekil 4.7.4.1.1 E-kaderin adezyon moleküllerinin yapısı.....	51
Şekil 4.7.4.1.2 Sferoid oluşumunda E-kaderinlerin rolü.....	51
Şekil 4.7.4.2.1 N-kaderinin hücre membranı üzerindeki yapısı.....	53
Şekil 4.7.4.3.1 P-Kaderinin hücre membranı üzerindeki yapısı.....	54
Şekil 4.8.1 Anjiyogenez.....	55
Şekil 4.8.2 Tümör tarafından anjiyogenezin başlatılması.....	56
Şekil 4.8.1.1 Adezyon moleküllerinin anjiyogenezde rolü.....	58
Şekil 5.2.10.1. Üç boyutlu mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin E-Kaderin immünofloresan boyamasının şematik olarak gösterilmesi.....	66
Şekil 5.2.10.2. Üç boyutlu mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin β -Katenin immünofloresan boyamasının şematik olarak gösterilmesi.....	66
Şekil 5.2.11.1. İki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür E-Kaderin ve β -Katenin immünofloresan boyamasının şematik olarak gösterilmesi.....	68
Şekil 6.1.1.2 Huvec hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin üç günlük büyümesinin karşılaştırılması.....	77
Şekil 6.1.2.2 Ishikawa hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin üç günlük büyümesinin karşılaştırılması.....	84
Şekil 6.1.3.2 Ko-kültür sferoidlerinin üç günlük büyümesinin karşılaştırılması.....	91
Şekil 6.2.1 Oluşturulan tüm sferoidlerin büyüklüklerindeki günlük değişimleri bir arada gösteren grafik.....	92
Şekil 6.2.2 Her iki sistemde oluşturulan tüm sferoidlerin aynı gün içindeki büyüklüklerini karşılaştıran grafik.....	93
Şekil 6.2.3 Huvec ve ko-kültür sferoidlerinin günlere göre büyüklüklerinin karşılaştırılması.....	93

Şekil 6.2.4 Ishikawa ve ko-kültür sferoidlerinin günlere göre büyüklüklerinin karşılaştırılması.....	94
Şekil 6.4.4. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin E-Kaderin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.....	103
Şekil 6.5.4. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin E-Kaderin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.....	107
Şekil 6.6.4. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin E-Kaderin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.....	114
Şekil 6.7.2.1. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidleri arasında yapılan çoklu karşılaştırma testinin sonucu.....	118
Şekil 6.9.4. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin β -Katenin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.....	124
Şekil 6.10.4. Ishikawa mono-kültür sferoidlerinin Z-stack optik kesitlerinin β -Katenin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.....	128
Şekil 6.11.4. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin β -Katenin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.....	132
Şekil 6.12.2.1. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidleri arasında yapılan çoklu karşılaştırma testinin sonucu.....	138
Şekil 6.14.1.1. İki boyutlu Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür modelinde hücrelerin ortalama intensity değerleri.....	144
Şekil 6.14.1.2. Ölçülen intensity değerleri arasında yapılan çoklu karşılaştırma testinin sonucu.....	145
Şekil 6.15.1.1. İki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde Huvec ve Ishikawa hücrelerinin ortalama intensity değerleri.....	149
Şekil 6.15.1.2. Ölçülen intensity değerleri arasında yapılan çoklu karşılaştırma testinin sonucu.....	150

Tablo Listesi

Tablo 5.1.1.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemelerin Listesi.....	59
Tablo 6.1.1.1. Huvec sferoidlerinin üç gün boyunca ölçülen büyüklük değerleri....	70
Tablo 6.1.2.1. Ishikawa sferoidlerinin üç gün boyunca ölçülen büyüklük değerleri.....	78
Tablo 6.1.3.1. Ko-kültür sisteminde oluşturulan sferoidlerinin üç gün boyunca ölçülen büyüklük değerleri.....	85
Tablo 6.3.1. Tüm sferoidlerin E-Kaderin boyandıktan sonra kaydedilmiş görüntüleri.....	95
Tablo 6.4.1. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerin DAPI görüntüleri.....	97
Tablo 6.4.2. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	99
Tablo 6.4.3. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	101
Tablo 6.5.1. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri.....	104
Tablo 6.5.2. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	105
Tablo 6.5.3. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	106
Tablo 6.6.1. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri.....	108
Tablo 6.6.2. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	110
Tablo 6.6.3. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	112

Tablo 6.7.1. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin aynı kesitlerinde E-Kaderin intensity değerlerinin karşılaştırılması.....	115
Tablo 6.8.1. Tüm sferoidlerin β -Katenin antikoru ile boyandıktan sonra kaydedilen görüntüleri.....	119
Tablo 6.9.1. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri.....	121
Tablo 6.9.2. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	122
Tablo 6.9.3. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	123
Tablo 6.10.1. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri....	125
Tablo 6.10.2. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	126
Tablo 6.10.3. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	127
Tablo 6.11.1. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri...129	
Tablo 6.11.2. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	130
Tablo 6.11.3. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri.....	131
Tablo 6.12.1. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin aynı kesitlerinde β -Katenin intensity değerlerinin karşılaştırılması.....	133
Tablo 6.13.1. Ko-kültür sferoidinin poliink ikili boyama görüntüleri.....	139
Tablo 6.14.1. İki boyutlu hücre kültürü modelinde Huvec hücrelerinin E-Kaderin immüno Floresan boyamasının görüntüleri.....	141
Tablo 6.14.2. İki boyutlu hücre kültürü modelinde Ishikawa hücrelerinin E-Kaderin immüno Floresan boyamasının görüntüleri.....	142

Tablo 6.14.3. Huvec ve Ishikawa hücreleriyle oluşturulan iki boyutlu ko-kültür modelinde E-Kaderin immünofloresan boyamasının görüntüleri.....	143
Tablo 6.15.1. İki boyutlu hücre kültürü modelinde Huvec hücrelerinin β -Katenin immünofloresan boyamasının görüntüleri.....	146
Tablo 6.15.2. İki boyutlu hücre kültürü modelinde Ishikawa hücrelerinin β -Katenin immünofloresan boyamasının görüntüleri.....	147
Tablo 6.15.3. Huvec ve Ishikawa hücreleriyle oluşturulan iki boyutlu ko-kültür modelinde β -Katenin immünofloresan boyamasının görüntüleri.....	148



1. ÖZET

ISHIKAWA VE HUVEC HÜCRELERİ İLE OLUŞTURULMUŞ SFEROİD MONO-KÜLTÜR VE SFEROİD KO-KÜLTÜR MODELLERİNİN MORFOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL (E-KADERİN VE BETA-KATENİN) OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI

Günümüzde giderek artan kanıtlar, üç boyutlu hücre kültürü modellerinin, iki boyutlu hücre kültürü modellerine göre *in vivo* tümör mikro ortamını daha iyi yansıttığını göstermektedir. Ko-kültür modelleri, hücreler ve *in vivo* mikro ortam arasındaki iletişimi daha iyi anlamak için ideal hücre kültürü modelleridir. E-kaderin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, kanser metastazı ve ilerlemesi ile yakından ilişkilidir. β -katenin, E-kaderinin hücre yapışmasına aracılık eder. Endotel hücreler, tümör mikro ortamındaki stromal hücre bileşenleridir. Endotel hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun çok az olduğu veya hiç olmadığı bilinmektedir. Çalışmamızda, hücre etkileşimlerini daha iyi yansıtmak için Huvec ve Ishikawa hücreleri (endometriyal kanser hücre hattı) kullanılarak hem iki boyutlu hem de üç boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelleri oluşturulmuştur. Üç boyutlu hücre kültürü modelinde sferoidler üç gün boyunca takip edildi. Ko-kültür sferoidlerinin boyutu, mono-kültür sferoidlerinden önemli ölçüde daha büyük kaydedildi. E-kaderin ve β -katenin ekspresyon seviyeleri, immünofloresan boyama ile ölçüldü. İki ve üç boyutlu modellerde, Ishikawa hücrelerinin mono-kültüründe E-kaderin ekspresyon seviyeleri, Huvec ve ko-kültür hücrelerinden önemli ölçüde daha yüksek kaydedildi. Benzer şekilde, β -katenin ekspresyon seviyeleri iki boyutlu modellerde Ishikawa hücrelerinin mono-kültüründe daha yüksek iken, üç boyutlu modellerde β -katenin ekspresyon seviyelerinde önemli bir farklılık gözlenmedi. E-kaderin ekspresyon seviyelerinin, Huvec ve Ishikawa hücrelerinin hem iki hem de üç boyutlu ko-kültürlerinde önemli ölçüde azaldığı kaydedildi. Bu sonuçlar, endotel hücrelerinin Ishikawa hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunu baskılayarak endometriyal kanser ilerlemesinde değişikliklere neden olabileceği fikrini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: 3D, E-Kaderin, Ko-kültür, Sferoid, Vaskülarizasyon.

2. ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL (E-CADHERIN AND BETA-CATENIN) COMPARISON OF SPHEROID MONO-CULTURE AND SPHEROID CO-CULTURE MODELS GENERATED WITH ISHIKAWA AND HUVEC CELLS

Increasing evidence shows that three dimensional cell culture models better reflect the in vivo tumor microenvironment than two dimensional cell culture models. Co-culture models are ideal cell culture models for understanding the communication between cells and the in vivo microenvironment better. Changes in expression levels of E-cadherin are closely related to cancer metastasis and progression. β -catenin mediates cell adhesion of E-cadherin. Endothelial cells are stromal cell components in the tumor microenvironment. It is known that there is little or no expression of E-cadherin in endothelial cells. In our study, both two dimensional and three-dimensional mono-culture and co-culture models were created using Huvec and Ishikawa cells (endometrial cancer cell line) in order to better reflect cell interactions. Spheroids were followed for three days in the three dimensional cell culture model. The size of the co-culture spheroids was recorded significantly larger than the mono-culture spheroids. Expression levels of E-cadherin and β -catenin were measured by immunofluorescence staining. In two and three dimensional models, expression levels of E-cadherin in mono-culture of Ishikawa cells were recorded significantly higher than in Huvec and co-culture cells. Likewise, while the expression levels of β -catenin were higher in mono-culture of Ishikawa cells in two dimensional models, no significant difference was observed in three dimensional models. It has been noted that the expression levels of E-cadherin is significantly reduced in co-cultures of Ishikawa cells with Huvec cells in both two and three dimensions. These results support the idea that endothelial cells may cause changes in endometrial cancer progression by suppressing E-cadherin expression in Ishikawa cells.

Key Words: 3D, Co-Culture, E-Cadherin, Spheroid, Vascularization.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser hücrelerinin apoptoz vasıtasıyla ölüme gönderilmesinde klinik olarak çok çeşitli kemoterapötik ajanların kullanıldığı bilinmektedir. Bunlardan en yaygın kullanılanlarından bazıları Cisplatin, Taksol ve Doksorubusin'dir. Günümüzde bunlar gibi birçok molekülün endometriyum kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmaya devam etmektedir. Ancak bu çalışmaların neredeyse tamamı geleneksel olarak tek tabaka halinde birbirleriyle yanal membran bağlantıları haricinde iletişimi olmayan, iki boyutlu hücre kültürü modelleri üzerinde denetlenmektedir(1).

Hücre biyologları kanseri uzun yıllar boyunca tek tabakada yetişen stabilize tümör hücre hatları kullanarak araştırdılar. Her ne kadar bu *in vitro* hücre modeli malign büyümenin temelindeki mekanizmalar hakkında çok değerli bilgiler vermiş olsa da *in vivo* tümörleri tamamen temsil etmek için uygun değildir. Solid tümörlerin üç boyutlu uzaysal düzlemde büyüdüğü, bu tümörlerdeki hücrelerin homojen olmayan oksijen ve besin maddesi dağılımlarının yanı sıra diğer fiziksel ve kimyasal streslere de farklı oranlarda maruz kaldığı unutulmamalıdır. Sonuç olarak, tümörlerin farklı bölgelerinde bulunan büyük mikro-çevresel varyasyonlar nedeniyle önemli hücresel heterojenite ortaya çıkabilir. Oksijen ve besin kaynaklarının düşük olduğu bölgelerde hücre hasarı ve hatta nekroz gelişebilir. Bu detaylara bağlı olarak hücrelerin hepsinin eşit derecede oksijene ve besin maddelerine maruz kaldığı iki boyutlu kanser hücrelerinin büyümesinin, tümör biyolojisinin tüm yönlerinin incelenmesinde kullanılamayacağı açıkça görülmektedir. Ek olarak, tek tabakada yetişen hücreler ile *in vivo* tümörlerde bulunan hücreler arasında gözlenen radyoterapi ve kemoterapiye verilen farklı cevapların çoğunun mekânsal organizasyondaki ve hücre-hücre temaslarındaki farklılıkların doğrudan sonucu olabileceği de varsayılabilir. Böylece, katı tümörlerin üç boyutlu düzenlenmesini dikkate alan daha uygun *in vitro* sistemler tasarlama çabasıyla çok hücreli tümör küreleri geliştirilmiştir. Aslında, tümör küreleri oldukça gerçekçi bir şekilde, katı tümörlerin üç boyutlu büyümesini ve organizasyonunu temsil eder ve sonuç olarak bu tümörlerde bulunan hücre-hücre etkileşimlerini ve mikro çevre koşullarını çok daha kesin olarak yansıtır(2).

İki boyutlu kültürlerde etkisi araştırılan kimyasal hücrelerin üzerine direkt olarak verilir ve tek tabaka halinde bulunan hücrelerin hepsi bu kimyasaldan eşit derecede etkilenir. Fakat *in vivo*'daki üç boyutlu tümör yapıları dıştan içe proliferen olan hücreler, proliferasyon hızı düşük stabil hücreler ve en içte nekrotik hücrelerden oluşan küremsi yapılardır. Bu da etkisi araştırılan kimyasalın aslında *in vivo*'da tüm hücrelere aynı oranda ulaşamayacağını göstermektedir.

Tüm bu sebeplerden dolayı günümüzde avasküler tümör modelleri şeklinde oluşturulan üç boyutlu hücre gruplarıyla yapılan çalışmalar popülerlik kazanmıştır. Oluşturulan üç boyutlu avasküler tümör modelleri üzerinde sitotoksik analizler, gen fonksiyon analizleri, genomik analizler, proteomik analizler, hücre-hücre etkileşimlerinin gösterilmesi, apoptotik-nekrotik hücrelerin gösterilmesi ve doku mühendisliği çalışmaları yapılmaktadır(3).

Karsinomların neredeyse tamamı epitel hücrelerinden köken almaktadır. Ancak bunlar karsinomları oluştururken tek başlarına değil, bir mikro çevreyle etkileşim halindedirler. Epitel olmayan hücreler, fibroblastlar ve endotel hücreler stroma ile dinamik olarak etkileşime girerler. Epitel-stromal etkileşimler büyüme ve ilerleme için çok önemlidir. Örneğin, tümör kitlesi kan akımı olmadan 200 µm'lik bir çapın ötesinde büyüyemez(4).

Oksijenin bulunmaması, kanser hücrelerinde hipoksi ile indüklenebilen faktör (HIF1a) artışına neden olur. Bu da geçici olarak ayrı bir şekilde düzenlenmiş vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) dahil anjiyogenik faktör kaskadı proteinlerinin transkripsiyonunu destekler. Aynı zamanda çoğalan kanser hücrelerine yeterli besin ve oksijen tedarik etmek için yeni damarlar oluşturmak üzere kanser hücrelerine doğru endotelial hücreleri çeker. Büyüme ve vaskülarizasyon döngüsü kanser kütesinin hipoksik merkezi tarafından yayılır. Tümör stroması ayrıca enflamatuar hücreler (makrofajlar, nötrofiller ve mast hücreleri) tarafından da doldurulur. Bunlar anjiyogenezin uyarılması yoluyla tümör agresifliğine katkıda bulunur, çünkü spesifik bölgelerde talep üzerine proanjiyogenik faktörleri (örn. VEGF ve bFGF) sentezlerler(5).

Hücre adezyon molekülleri tümör gelişimlerinin düzenlenmesinde görev alırlar. Kaderinler dokuda dağılımları ve kökenlerine göre 10'dan fazla alt gruba ayrılan hücre adezyon molekülleridir. Buldukları dokuya göre epitelial (E-Kaderin),

nöronal (N-Kaderin), plasental (P-Kaderin) olarak isimlendirilirler. E-Kaderinler epitel hücreleri arasındaki adherens bağlantılarda kritik rol oynarlar. E-kaderinler hücre membranlarının lateralinde lokalizedirler. Hücre iskeleti elemanlarından olan aktin filamentlerle bağlantı kurarak hücre-hücre bağlantılarını sağlarlar. Kateninler alfa, beta ve gama elektroforetik mobilitelere göre sınıflandırılırlar. Beta katenin hücre-hücre adezyonunda kaderinler ve sitoplazma arasındaki bağlantıyı sağlayarak hücre yüzeyinden sitoplazmaya kadar sinyal iletiminde rol alır. Bu nedenle E-Kaderin- β -Katenin bağlantıları tümör invazyonu ve migrasyonunda kritik rol oynarlar(6).

İnsan endometriyum kanseri hücreleri (Ishikawa) ve insan umbilikal ven endotelial hücrelerini (HUVEC) kullanarak üç boyutlu (sferoid) mono-kültür ve üç boyutlu (sferoid) ko-kültür modelleri oluşturularak hücre sayısı, kültüre edilme süreleri, inkübasyon ortamları gibi parametreler sabitlenip her iki grup arasındaki gelişim farkı histolojik açıdan incelenmiştir. Ayrıca her iki modelde oluşturduğumuz sferoidlerde immüno Floresan boyama tekniğiyle, E-Kaderin ve β -Katenin intensity değerleri arasındaki farkların ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çalışma kanser hücre kültüründe iki boyutlu ve üç boyutlu modellemeler arasındaki farkın ortaya çıkarılması, üç boyutlu kültür modellerinin *in vivo*'yu daha iyi taklit edebildiğinin gösterilmesi, modellemelerin vasküler tümörler şeklinde yapılarak klinik için ciddi anlamda ön bilgiler sağlaması açısından oldukça önemlidir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında genellikle doğal ortamlarının dışında büyütülmesi sürecidir. Bu koşullar her hücre tipi için farklılık göstermektedir(7). Hücreler genellikle kültür flaskları veya petri kapları gibi düz bir yüzey üzerinde, tek tabakalı olarak, besin kaynağı bir besiyeri varlığında ve vücut sıcaklığında (37°C) büyütülürler(8). *In vitro* hücre kültürü yöntemleri memeli hücrelerinin büyümesini sürdürmek ve desteklemek için besiyeri ortamını kullanır. Temel besiyeri ortamları genellikle vitaminler, tuzlar, aminoasitler ve glukoz gibi bileşenleri içerir. Bu besin ortamları, hücrelere gerekli enerji kaynaklarını ve hücre döngüsünü düzenleyebilen bileşikleri sağlarlar. Genellikle pek çok hücreyi büyütebilmek için bu besin ortamları yeterlidir. Besiyeri ortamları genellikle hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve işlevlerini destekleyebilen bir ortam oluşturmak amacıyla fetal sığır serumu (FBS) gibi bir serum ile zenginleştirilmelidir. FBS hücrelere kararsız veya suda çözünmeyen besinler için taşıyıcı olarak görev yapar. Hücreler için gerekli olan büyüme faktörleri ve hormonlar gibi proteinleri sağlar(9).

In vitro hücre kültürleri, *in vivo* hücre davranışının altında yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılması için sıklıkla kullanılır. Bu davranışlar biyokimyasal ve biyomekanik çevreden etkilenen hücre farklılaşması, göç, büyüme ve hücre mekaniğini içermektedir(10).

Doku kültürü ve hücre kültürü terimleri her ne kadar aynı şeyi ifade ediyor gibi görünse de birbirinden ayrılması gereken ifadelerdir. Doku kültürü, hücrelerin dokudan bir yüzeye göç ettiği yapay bir ortamda doku parçalarının kültürlenmesidir. Her iki teknik de hayvan deneylerinde canlı hayvanlara uygulanabilecek olandan daha fazla manipülasyona izin verir(11).

4.1.1. Hücre kültürünün tarihi, gelişimi ve günümüzdeki durumu

Hücre kültürü yeni bir teknik değildir. Bilimsel literatürde 1885(12) yılına kadar kullanımıyla ilgili çeşitli referanslar bulunmaktadır. Roux adı verilen bir embriyolog, bir civciv embriyosunun medüller plakasını ılık salin içerisinde birkaç gün koruyabilmiştir. Bu açıklama hücre kültürünün temellerinin ilk başarılı kaydı olmuştur. 1903'te Jolly, semender lökositlerini kullanarak *in vitro* hücre sağ kalımı ve hücre bölünmesi hakkında ayrıntılı gözlemler yapmıştır(13, 14).

Hücre kültürü geçmişten günümüze embriyoloji, gelişim biyolojisi ve kanser araştırmalarında kullanılarak zamanla geliştirilmiştir. Yirminci yüzyılın başında Ross Harrison (1870–1959) ve Leo Loeb (1869-1959) tarafından yapılan deneylerde sıvı ortam olarak kan pıhtıları, agar veya tuz çözeltileri içerisinde canlı tutulan doku veya organ parçaları kullanılmıştır. Harrison, kurbağa sinir liflerinin gelişimini incelerken test tüpünde doku üreten ilk kişidir. Ayrıca dokunun petri kabının ya da test tüpünün kapağının arkasındaki plazmaya gömüldüğü “asılı damlacık tekniği”ne öncülük etmiştir(11, 13, 15).

Bu alandaki bir diğer öncü Alexis Carrel (1873-1944)'dir ve Harrison Metodolojisi'ni geliştirmiştir. Civcivlerden, çeşitli memelilerden ve tümör dokularından gelen doku parçalarını kullanmıştır(11, 14, 15). Carrel'in 34 yıl boyunca aynı hücreyi pasajlamış olması başlangıçta izole edilmiş hücrelerin süresiz çoğaltılabileceği inancına yol açmıştır. Daha sonra yapılan çeşitli analizler ile devamlı olarak yeni hücrelerin kültüre eklendiği ve saflığın bozulduğu fark edilmiştir(13). Carrel ve meslektaşı Montrose Burrows (1884–1947) bu dokuları kaynak aldıkları hayvanın plazmasında, cam kapakların iç yüzeylerinde asılı damlacıklar halinde büyütmüşlerdir(11, 13, 15). Carrel, bugün hücre kültürü için kullanılan flaskların bir prototipi olan, “D-flaskları” adı verilen ilk hücre kültürü kaplarını icat etmiştir. Ayrıca besiyeri ortamını iyileştirmiş, plazma yerine serumun kullanılabileceğini ve farklı memelilerden alınan serumun hücresel büyümeyi desteklediğini göstermiştir. Carrel, ayrıca steril tekniklere duyulan ihtiyacı vurgulamış ve tolüeni bakteriyel kontaminasyonu önleyen bir inhibitör olarak az

miktarlarda kullanmıştır. Carrel'in doku ve hücre kültürüne katkısı çok büyüktür. 1912 yılında Nobel Tıp Ödülü'nü alan ilk Amerikalı olmuştur. İlgi çekici nokta ise Carrel ve Charles Lindbergh (1902-1974) arasındaki iş birliğidir. Carrel ve Lindbergh 1930'larda birçok araştırma makalesi yazmış ve araştırmaları 1950 ve 1960 yılları arasında hücre kültürü tekniklerinde bilgi patlamasına yol açmıştır. Daha sonraki 25 yıl boyunca büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve hücrelerin büyümesini artıran veya inhibe eden bağışıklık sisteminin proteinleri bulunana kadar, doku kültürü alanında çok az değişiklik olmuştur(11). Bir diğer önemli gelişme, hücreleri doku matriksinden kurtarmak için Rous ve Jones tarafından 1916'da tripsin (proteolitik bir enzim) kullanılmasıdır. Sonrasında tripsin yapışık hücrelerin pasajlanması ve alt kültürlerinin oluşturulması için kullanılmıştır. 1950'lerde, homojen hücre suşları üretmek için (hücre tiplerinin bir karışımını içeren doku kültürlerinin aksine) tripsinizasyon tekniğinden yararlanılmış ve bu hücre kültürü tekniklerinin başlangıcını işaret etmiştir(13).

Yıllar boyunca, insan tümör hücrelerini kültürlemek için birçok girişimde bulunulmuş ancak çok fazla başarı sağlanamamıştır. Bununla birlikte, 1951'de kültürde büyüyen ilk insan tümör hücreleri, Henrietta Lacks adıyla genç bir Afrikalı Amerikalı kadının servikal karsinomundan izole edilmiştir. Bu hücreler George Gey tarafından Baltimore'daki John Hopkins Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilmiş ve HeLa olarak adlandırılmıştır. HeLa, hücre kültürü alanının başı olmuştur. Hücre büyümesini ve çoğalmasını incelemek ve elbette virüs üretmek için kullanılmıştır. Kültürde daha önce yetiştirilemeyen birçok virüs HeLa'da yetiştirilmiştir. Bu hücrelerin kültürleri iki kat ila on kat seyreltme şeklinde bölünmüştür. Yeni hücre kültürü kaplarına aktarıldığında tek tabakalı ortamda çok hızlı bir şekilde gelişmiş ve mevcut hücre sayısı çoğalmıştır. Gey bu hücreleri talep eden herkese dağıtmış böylece hemen hemen her hücre kültür laboratuvarı bu hücreleri kullanmıştır. Gey bugün kullanılan hücre kültürü tekniklerinin çoğunu geliştirmiştir. Eşi Margaret ile test tüplerinde hücre büyümesini filme almak ve fotoğraflamak için teknikler geliştirmiştir. Bilim adamlarını hücre kültürü "sanatı"nda eğitmek amacıyla 1946 yılında kurulan bir kuruluş olan Doku Kültürü Derneği'nin (TCA) kurucusu ve ilk başkanıdır. *In Vitro* adlı yeni bir dergi yayınlamıştır; amacı hücre kültüründeki gelişmeleri tanımlamaktır(11). George ve Margaret Gey bir hormonun (insülin)

büyümeye etkisini gösteren, hücre dışı matris bileşenlerinin (kollajen) hücre bağlanmasındaki rolünü ve kültürdeki hücreler tarafından bir hormonun (gonadotropin) üretimini gösteren ilk kişilerdir(16).

William Earle, fare embriyo fibroblastlarından HeLa'nın büyüme potansiyeline benzer bir fare hücre hattı geliştirmiştir. Bunlar L292 hücreleri (L-hücreleri) olarak adlandırılır. Ted Puck, kültürdeki diğer hücrelerin aksine yakın bir diploid kromozom tamamlayıcısı olan “CHO” adı verilen Çin hamsterlarından izole edilmiş bir hücre hattı geliştirmiştir(11).

Günümüzde doku ve organların oluşumu, işlevi ve patolojisinin altında yatan mekanizmalar üzerindeki çalışmalarda farklı hücre kültürü teknikleri kullanılmaktadır. Harrison'un sinir lifleriyle yaptığı çalışmadan günümüze kadar yöntemler geliştirilmeye devam etmiştir. Bu yöntemler hücrelerin vücut dışındaki büyümesi ve farklılaşmasını gözlemek için kullanılmıştır(17). Bugüne kadar hücre temelli çalışmaların çoğunda düz ve katı substratlar üzerinde kültürlen geleneksel iki boyutlu (2D) tek tabakalı hücre kültürü tercih edilmiştir. Zamana bağlı olarak iki boyutlu hücre kültürünün hücre tabanlı çalışmalar için değerli bir yöntem olduğu kanıtlanmış olsa da sınırlamaları giderek daha fazla kabul görmeye başlamıştır. Bu nedenle *in vivo* hücre davranışlarını daha gerçekçi bir şekilde taklit edebilen ve *in vivo* testlerde daha öngörülebilir sonuçlar sağlayabilen *in vitro* hücre tabanlı çalışmalar geliştirilmiştir(18). Daha ayrıntılı olarak bahsedeceğimiz çeşitli sınırlamaların üstesinden gelebilmek için yeni üç boyutlu (3D, sferoid) hücre kültürü platformları geliştirilmektedir. Günümüzde evrensel bir üç boyutlu platform bulunmaması nedeniyle iki boyutlu hücre kültürü hala kullanılmaktadır. Üç boyutlu platformların gelişmesiyle iki boyutlu hücre kültürüne alternatif olarak üç boyutlu hücre kültürünün tercih edilmesi beklenmektedir(10). İlerleyen bölümlerde ayrıntılı bir şekilde bahsedeceğimiz hidrojel tabanlı destek, polimerik sert malzeme bazlı destek, hidrofilik cam elyaf ve organoidler gibi iskele tabanlı teknikler kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak yapışkan olmayan yüzey oluşturma, asılı damla, manyetik levitasyon, mikroakışkan ve ajitasyon temelli yaklaşımlar olmak üzere iskele içermeyen teknikler kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmaktadır(19).

4.2. Hücre Kültürü Sınıflandırılması

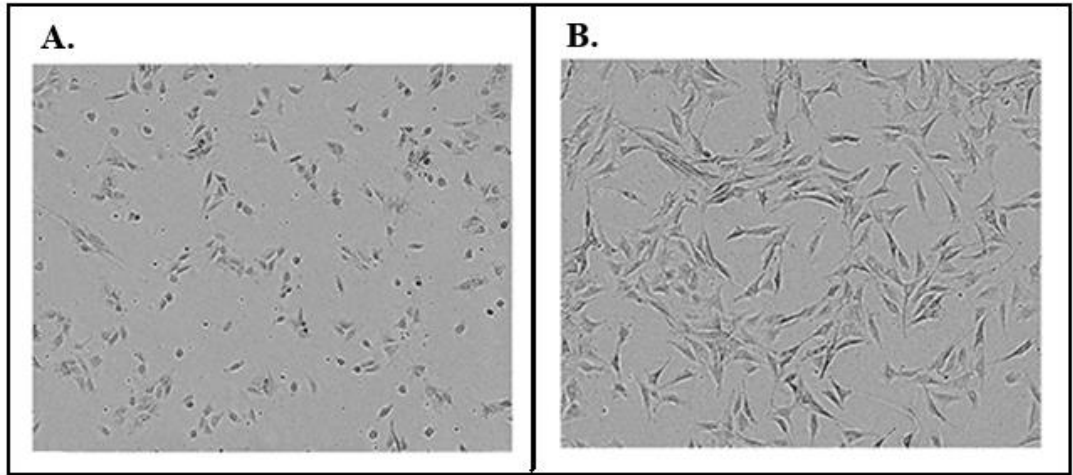
4.2.1. Kullanılan hücre kaynağına göre sınıflandırma

Direkt olarak dokudan kimyasal, mekanik veya enzimatik ayrıştırma ile elde edilen hücrelerin kullanıldığı sistem *primer hücre kültürü* olarak isimlendirilir(20). *In vitro* insan hastalık modellerinin gelişimi hastadan alınan spesifik hücre tipleri ve dokularının mevcudiyetine bağlıdır. Bu modeller, hastalık fenotipleri ve patomekanizmaları hakkında fikir verebilir. Primer hücre kültürleri yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için potansiyel yeni hedefleri ortaya çıkarmaya yardımcı olur. Primer hücre kültürünün avantajlarının yanı sıra çeşitli sınırlamaları da vardır. Hasta dokusundan izole edilen primer hücreleri elde etmek zordur ve bu hücrelerin *in vitro* kültürü sınırlı bir ömre sahiptir. Ek olarak bu biyopsi örnekleri hastalığın genellikle son aşamasında alınabilir. Dolayısıyla etik endişeler ve potansiyel sağlık riskleri nedeniyle sağlıklı bireylerden alınan uygun kontrol dokularına erişilemeyebilir(21).

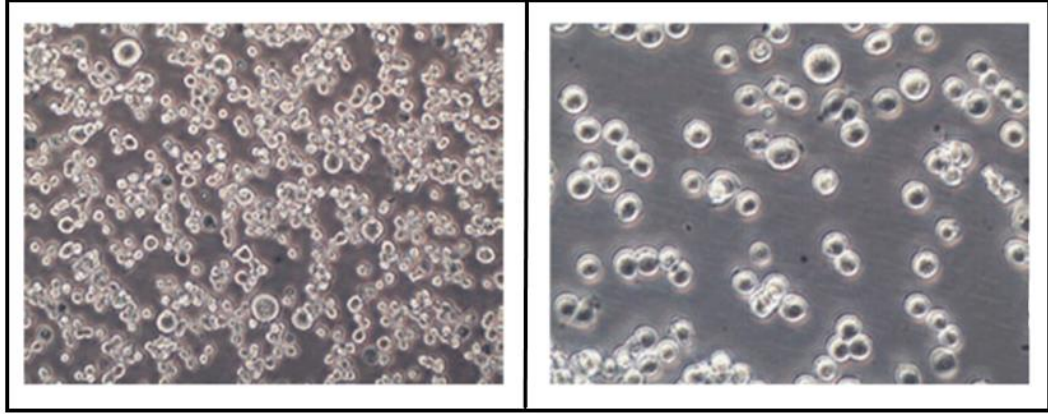
Sekonder hücre kültürü ise hücre hattı terimini karşımıza çıkarmaktadır. İki ayrı hücre hattı kavramı bulunmaktadır. Normal hücreler, çoğalma yeteneklerini kaybetmeden önce sınırlı sayıda bölünür. Bu, yaşlanma olarak bilinen ve genetik olarak belirlenen bir olaydır. Bu hücre hatları sonlu hücre hatları olarak bilinir. Bununla birlikte, bazı hücre hatları, dönüşüm olarak adlandırılan, kendiliğinden meydana gelebilen ya da kimyasal veya viral olarak indüklenebilen bir işleme ölümsüz hale gelir. Sonlu bir hücre hattı transformasyona uğradığında ve sınırsız bir şekilde bölünme kabiliyetine sahip olduğunda sürekli hücre hattı olarak tanımlanır(22). Bu hücre hatlarının uzun ömürlü olması sekonder hücre kültürünün en önemli avantajıdır. Fakat çalışılmadan önce hücre homojenliğinden emin olunmalıdır. Ayrıca bu hücre hatları toksisiteye karşı daha dirençlidir. Sürekli hücre hatları daha hızlı bölünürler ve hayvanlara yeniden verildiğinde tümör oluştururlar(13).

4.2.2. Büyüme şekillerine göre sınıflandırma

Hücreler bir yüzeye yapışık şekilde tek tabakalı veya süspansiyon halinde büyüebilir. Yapışık hücrelerin ankraj bağımlı olduğu söylenir ve bir substrata bağlanmak çoğalma için gerekli ön koşuldur. Genellikle temas inhibisyonuna maruz kalırlar. Birbirlerine değecekleri bir yoğunluğa ulaştıklarında bölünmeyi bırakırlar. Olgun hemopoietik hücreler ve değişim geçirmiş hücreler hariç çoğu hücre bu şekilde büyür (Şekil 4.2.2.1). Ankraj bağımlı hücrelerin aksine kan, dalak veya kemik iliğinden kültürlenmiş hücreler kültür tabağına hiç yapışmazlar. Vücutta bu hücreler süspansiyon halinde tutulur veya sadece gevşek bir şekilde yapışma gösterir. Süspansiyon kültürlerinin çoğaltılması daha kolaydır. Çünkü alt kültür sadece besiyeri ile seyreltmeyi gerektirir. Hücrelerin birbirine veya bir substrata bağlı olduğu kültürlerde hücreler ve substrat arasındaki bağı kırmak için hücrelerin proteolitik bir enzim ile muamele edilmesi gerekir. En yaygın kullanılan enzim tripsindir (kollajenaz, papain, dispaz ve pronaz da kullanılabilir). Sonuç olarak serbest süspansiyona alınmış kültürler tripsinizasyon gerektirmez. Bu nedenle pasajlanması daha kolaydır (Şekil 4.2.2.2)(13).



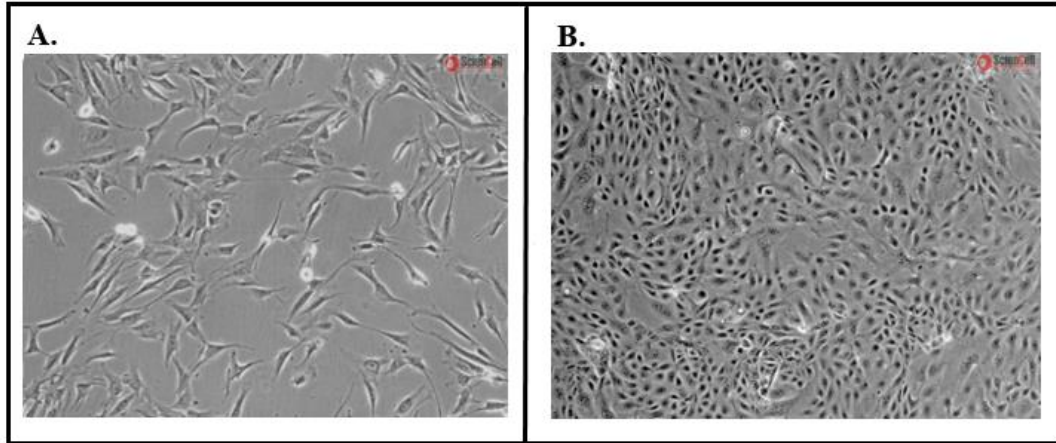
Şekil 4.2.2.1 Yapışık olarak büyüyen NIH 3T3 hücrelerinin çözündürülmesinden (A) 24 saat sonra ve (B) 72 saat sonra gözlemlenen morfolojisi(23).

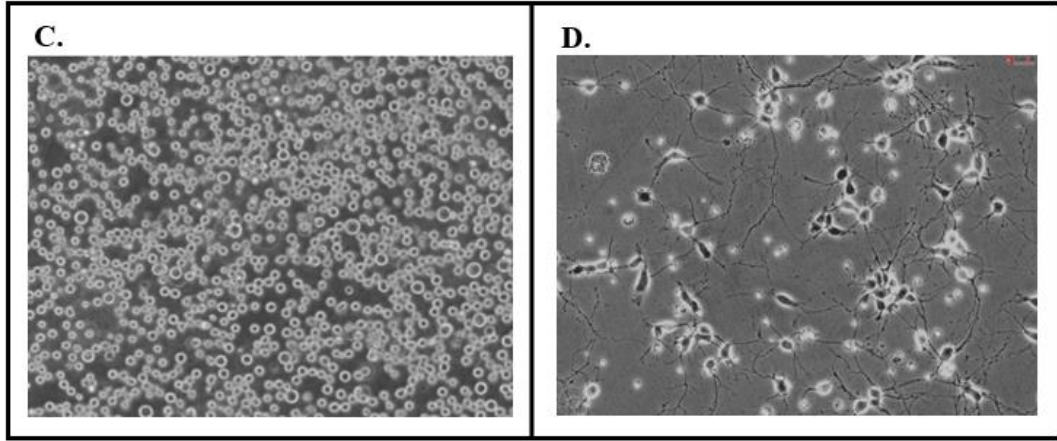


Şekil 4.2.2.2 Süspansiyon olarak büyütülen BJ/ TERT LT hücrelerinin morfolojileri(24).

4.2.3. Morfolojilerine göre sınıflandırma

Hücreler morfolojilerine göre fibroblastik, epitelyal, lenfoblastik ve nöronal olmak üzere dört farklı şekilde gözlenir. Fibroblastik hücreler bipolar veya çok kutupludur. Uzun şekillere sahiptir ve bir substrata bağlanırlar (Şekil 4.2.3.1/A). Epitelyal hücreler daha düzenli boyutlara sahip ve çokgen şeklindedir (Şekil 4.2.3.1/B). Lenfoblastik hücreler küresel şekildedir ve genellikle bir süspansiyon içinde büyütülürler (Şekil 4.2.3.1/C). Nöronal hücreler ise nöronlarda olduğu gibi gövdelerinden çıkan dendrit benzeri uzantılara sahiptir (Şekil 4.2.3.1/D)(22).

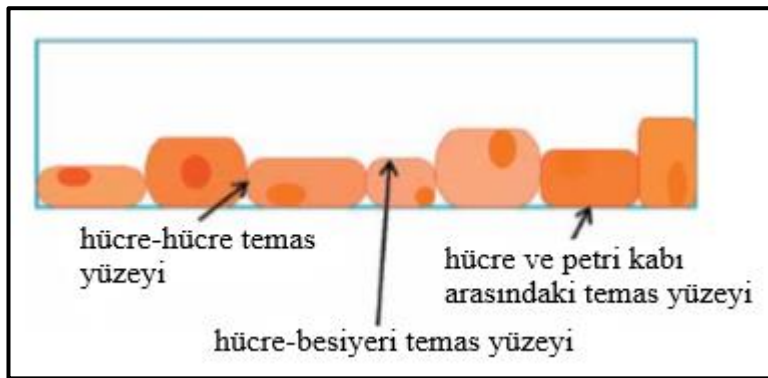




Şekil 4.2.3.1 (A)Fibroblastik hücre (25), (B) Epitelyal hücre (26), (C) Lenfoblastik hücre (27), (D) Nöronal hücre (28) morfolojisi.

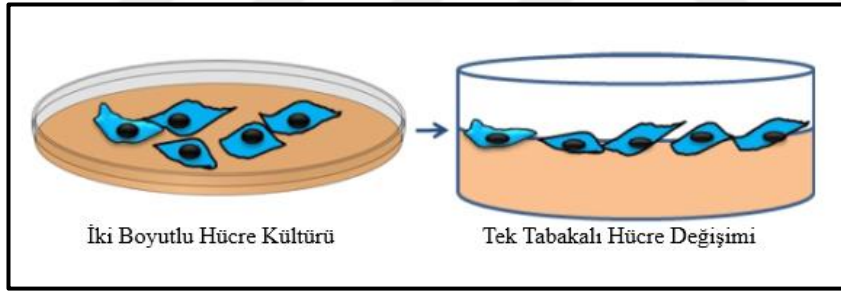
4.3. İki Boyutlu Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarının büyük bölümü kolaylığı ve yüksek hücre canlılığı nedeniyle mikro kuyucuklu plakalar, doku kültürü flaskları ve petri kapları gibi iki boyutlu yüzeyler üzerinde çalışılır(29). Bununla birlikte iki boyutlu hücre kültürleri, hücre-matriks arasındaki ve bitişik hücrelerin arasındaki iletişimin incelenmesi için çeşitli sınırlamalara sahiptir(30). Hücreler doğal ortamlarının aksine plastik veya cam yüzeyler üzerinde büyümeye alışık değildir. Genel iki boyutlu hücre kültürü koşullarında hücreler, atıkları uzaklaştırmak ve besinleri yenilemek için birkaç günde bir değiştirilen sıvı besiyeri ortamına direkt olarak maruz bırakılırlar (Şekil 4.2.3.2)(31).



Şekil 4.2.3.2 İki boyutlu hücre kültürü sistemlerinde hücrelerin bulunduğu ortam(17).

İki boyutlu sistemler hücre biyolojisi alanında, hücre mimarisinin, moleküler yapının, protein etkileşimleri ve sinyal iletim yollarının aydınlatılmasını sağlayan araştırmalarda önemli bir yere sahiptir. Ayrıca iki boyutlu kültür sistemleri hastalık modellenmesi için çeşitli araçlar, ilaç geliştirme ve toksisite testleri için yüksek verimli platformlar sağlamaktadır(32). İki boyutlu hücre kültürü yüzyıldan fazla süredir biyofiziksel ve biyokimyasal olaylardan gelen uyarılara verilen hücresel yanıtları incelemek için *in vitro* model olarak kullanılmıştır. Son yıllarda iki boyutlu sistemlerin *in vivo* yanıtı kayda değer ölçüde değiştiren hücre biyoaktivitelerine yol açtığını gösteren bir takım kanıtlar sunulmuştur. Örneğin kanser hücrelerinin bazı önemli özelliklerinin iki boyutlu kültürlerde uygun şekilde modellenemediği gösterilmiştir(10). Dokudan izole edilip iki boyutlu koşullara transfer edilen hücrelerin bölünme şekilleri gibi morfolojileri de değişim göstermektedir. Fenotip kayıpları da iki boyutlu kültürün meydana getirdiği olumsuz bir sonuçtur (Şekil 4.2.3.3)(17).



Şekil 4.2.3.3 Tek tabakalı iki boyutlu hücre kültüründe büyütülen hücrelerin değişimi(33).

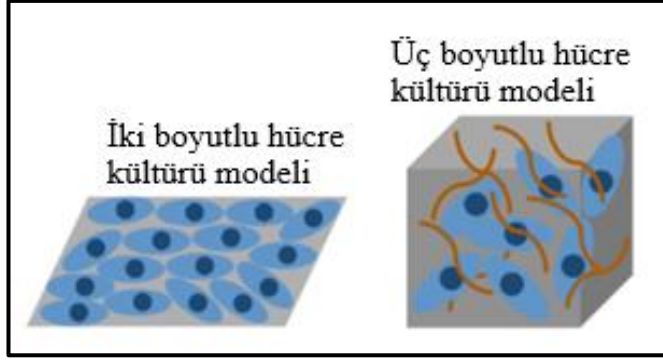
Günümüzde ilaç keşfinde bileşiklerin taranmasının standart prosedürü klinik olarak, iki boyutlu kültür tabanlı sistemler ile başlamakta ardından hayvan modeli deneyleri ile devam etmektedir(18). Hayvan modellerine kıyasla iki boyutlu hücre kültürü insan kaynaklı hücreleri inceleme ve aynı türden hastalık patolojilerini araştırabilme fırsatı sunar(31).

Geleneksel iki boyutlu hücre kültürünün toksik bileşikleri tanımlamak için değerli bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Düşük maliyet ve yüksek test hızı iki

boyutlu hücre kültürünü ilaç keşfinin vazgeçilmezi haline getirmiştir. Bununla birlikte iki boyutlu hücre kültürünün sınırlamaları giderek daha fazla kabul görmüştür. Hücrelere uygulanan doğal olmayan geometrik ve mekanik kısıtlamalar nedeniyle iki boyutlu hücre kültürleri normal dokuların sadece bazı özelliklerine sahiptir. Bu yaklaşım her zaman hücre tipleriyle sınırlı kalmıştır. Diğer hücrelerin ve çevresinin etkisi dikkate alınmaz(34). Bu nedenle günümüzde doku fizyolojisini anlamak ve *in vivo* ortamın daha iyi taklit edilebilmesi için farklı yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

4.4. Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Dokuların nasıl oluştuğunu, işlevini, patofizyolojisini ve canlı organizmanın bir parçası olarak nasıl davrandığını anlayabilmek için, üç boyutlu yapılarını, mekanik özelliklerini ve biyokimyasal mikro çevrelerini incelemek çok önemlidir. Ne yazık ki hücre ve doku regülasyonu ile ilgili çalışmaların çoğu, *in vivo* hücrel mikroy çevreyi oluşturamayan iki boyutlu hücre kültürü modellerinde büyütülen hücrelerin analizine dayanmaktadır. Bu kültürler genellikle hücrelerin farklılaşmış işlevlerini sürdürmez(35). Bu nedenle fizyolojik olarak *in vivo*' ya daha yakın ve iki boyutlu hücre kültürüne alternatif olarak üç boyutlu sferoid modelleri geliştirilmiştir. Üç boyutlu hücre kültürü önemli hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks (ECM) etkileşimlerini dikkate alarak, hücrelerin morfoloji, farklılaşma, polarite, proliferasyon oranı, gen ekspresyonu ve genomik profilleri gibi özelliklerini taklit edebilir. Tümörlerin hücrel heterojenitesi, besin ve oksijen derecesi gibi çeşitli kritik özelliklerinin kopyalanmasına izin verir(36). Bu karmaşık biyokimyasal ve mekanik etkileşimler göz önünde bulundurulmasına rağmen önemli biyolojik özelliklerin sadece iki boyutlu hücre kültürlerinde çalışılmasına devam edilmektedir. Fakat bilindiği üzere iki boyutlu kültürler, aynı zamanda birçok doğal olmayan geometrik ve mekanik kısıtlamayı beraberinde getirir. Bu nedenle üç boyutlu kültürler bu kısıtlamaları ortadan kaldırma görevi görmektedir (Şekil 4.4.1). Üç boyutlu kültürlerde *in vitro* büyüyen hücreler, genetik ve transkripsiyonel olarak protein düzeylerindeki değişikliklerle yeni mikroy çevreye uyum sağlar(37).



Şekil 4.4.1 İki ve üç boyutlu hücre kültürü ortamında bulunan hücrelerin durumu(38).

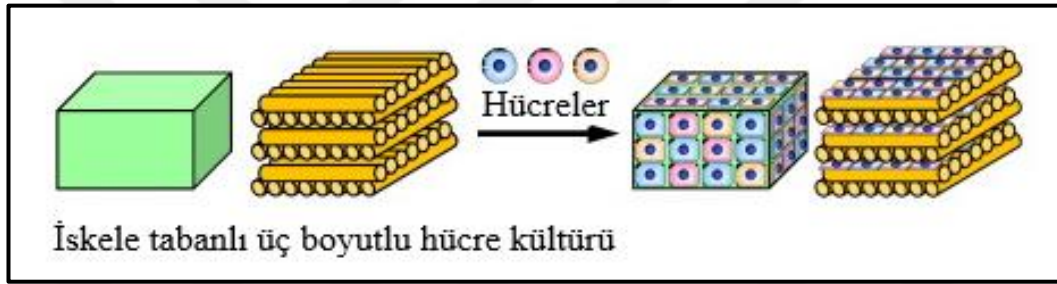
Üç boyutlu hücre kültürü sistemlerinde kanser modellemeleri, özellikle metastaz ve anjiyogenezi incelemek için iyi tanımlanmış hastalık modellerinin olmaması nedeniyle oldukça fazla ilgi görmektedir(39). Farklı deney koşulları altında kanser hücrelerinin plastisitesinin ve komşu hücreler ile çevresindeki stroma arasındaki etkileşimin anlaşılması için üç boyutlu hücre kültürü kullanılmaktadır. Tümörleri etkileyen moleküler ve hücrel mekanizmaların daha iyi anlaşılması için de üç boyutlu kültürler kolaylıkla uygulanabilir(40). Hayvan modelleri, üç boyutlu kültürlerle karşılaştırıldığında insan tümörlerini, terapötik yanıtları, otoimmün hastalıkları ve kök hücre farklılaşmasını yeterince iyi taklit edemeyebilir. Bu *in vitro* üç boyutlu doku modelleri *in vivo* moleküler mekanizmaları anlamak için gerekli yaklaşımlara olan ihtiyacı karşılar. Spesifik dokuları taklit edebilen üç boyutlu modellerin artan kullanımı doku mühendisliği gibi alanların ilerlemesini, yeni terapötiklerin geliştirilmesini ve taranmasını kolaylaştırabilir(41).

4.4.1. Farklı üç boyutlu hücre kültürü modelleri

4.4.1.1. İskele tabanlı üç boyutlu hücre kültürü

Üç boyutlu hücre kültürü sistemleri iskele tabanlı ve iskele tabanlı olmayan yöntemlerden oluşmaktadır. İskeleler, yeterli gaz değişimini, besin desteğini ve büyüme faktörlerini destekleyen biyomateryallerden oluşan üç boyutlu gözenekli yapılardır. Dokuları düzenlemek veya şekillendirmek için gerekli çevresel koşullar

üç boyutlu iskeleler kullanılarak elde edilir(42, 43). Yaygın kullanılan iskeleler agaroz, kollajen, fibronektin, jelatin, laminin ve vitronektindir. Günümüzde hem organik hem de inorganik yapıda 100'den fazla matriks ve yapı iskelesi kullanılmaktadır. Bu matrikslerin ve yapı iskelelerinin seçimi, çalışmanın doğasına ve hücre tiplerine göre belirlenir. Tip I kollajen matriksi üç boyutlu kültür sisteminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni işleme kolaylığı, düşük maliyet ve canlı hücre manipülasyonu için esneklik sağlamasıdır(44). İskelelerin işlevi hedef dokunun ECM' sini taklit etmektir(45)(Şekil 4.4.1.1.1). Üç boyutlu modellerde iskele için kullanılan malzemeler doğal, sentetik ve hibrid biyomalzemeler olmak üzere 3 sınıfa ayrılır(46).



Şekil 4.4.1.1.1 İskele tabanlı üç boyutlu hücre kültürü sistemlerinde hücrelerin organizasyonu(47).

4.4.1.1.1. Doğal materyal tabanlı iskele sistemleri

Doğal malzeme bazlı iskelelerden en yaygın olarak kullanılanı hidrojeldir(46). Hidrojeller sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çözünür faktörlerin doku benzeri jelden geçmesine izin verirler. Hidrojeller ECM'yi taklit etme yetenekleri nedeniyle benzersiz ve çok yönlüdür. Sferoid oluşturmak için kullanılabilirler ve yapılan deneye bağlı olarak çeşitli şekillerde hazırlanabilirler. Doğal jeller yaygın olarak fibrinojen, hiyalüronik asit, kollajen, Matrigel, jelatin, kitosan ve alginat gibi doğal polimerlerle yapılır(19, 48). Kollajen bazlı hidrojeller, fiziksel ve kimyasal\enzimatik çapraz bağlama ile birleştirilebilir ve bu da fibriler bir iskele kurulmasına yol açar. Kollajen, tümör ilerlemesi sırasında örneğin meme, akciğer ve kolon kanserlerinde giderek artan ve biriken tümör mikro-ortamının ortak

bileşenidir. Bu doğal üç boyutlu hücre kültürü platformları hücresel adezyon, *in vivo* benzeri morfoloji ve gen ekspresyonunu uyarabilen tetikleyici sinyal olaylarını içerir. Hiyaluronik asit ise normal ve habis dokularda ECM' de bulunan büyük bir glikozaminoglikandır. Hiyaluronik asit, kanser ilerlemesi ile yakından ilişkilidir. Tümör stromasında yüksek miktarda olması ilerlemiş kanser sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir. *İn vivo* kökenli olması nedeniyle Matrigel bazlı iskeleler, ECM'ye özgü sinyal moleküllerini, laminin, kollajen, elastin, entaktin, fibronektin, fibrinojen ve farklı büyüme faktörlerini sağlar(46).

Aljinat, kitosan ve ipek fibroin, memeli olmayan orijinlerden türetilen doğal biyopolimerlerin örnekleridir. Bu malzemeler *in vitro* hücre kültürü için düşük immünojen ve uygun biyo-uyumluluk gösterir(46). Aljinat jelleri çeşitli hücre tiplerini kapsüllemek için kullanılmaktadır(49). Kitosan, biyolojik olarak parçalanabilir. İmmünojenik olmayan ve katyonik doğası nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. İpek fibroin, proteaz bozulmasına karşı direncinin yanı sıra hücre yapışma özelliklerinden ötürü tercih edilmektedir. Özellikle kanserden kemiğe metastaz gibi çalışmalar için üç boyutlu *in vitro* modellerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır(46).

4.4.1.1.2. Sentetik materyal tabanlı iskele sistemleri

Sentetik hidrojeller, tipik olarak polietilen glikol (PEG), polilaktik asit (PLA) veya polivinil asetat (PVA), poliglikolik asit (PGA), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) ve poli-kaprolakton (PCL)'dan yapılmış sentetik polimerler ile yapılır(19, 46). Polimerik sert iskeleler, ECM' nin yapısını çoğaltma kabiliyeti nedeniyle hücre-ECM etkileşimlerini incelemek için önemli bir araçtır. Ayrıca polimerik sert iskeleler, doku rejenerasyonunun incelenmesi ve tümör hücresi tedavilerinin test edilmesinde son derece faydalıdır. Hidrofilik cam elyaflar, antikorların ve invazyonun test edilmesinin yanı sıra hücre göçünü izlemek için üç boyutlu tümörlerin modellenmesinde önemlidir(19). Bununla birlikte, sadece sentetik platformlarda kültürlenmiş hücreler, *in vivo* tümörlerinkine kıyasla tutarsız tümör oluşumu, metastatik potansiyel veya ilaca dirençli fenotipler sunarak tümör benzeri gen ekspresyon paternlerinden yoksun çoğalırlar(46).

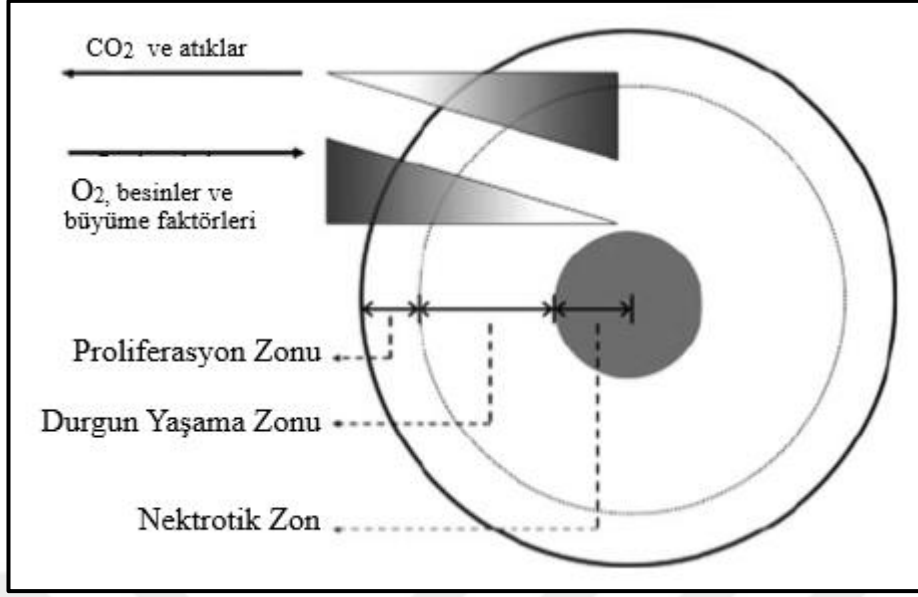
4.4.1.1.3. Hibrid materyal tabanlı iskele sistemleri

Hem doğal hem de sentetik malzemelerin en iyi özelliklerinden yararlanmak ve sentetik malzemelerle elde edilen iskeleler üzerinde kontrol sağlamak için doğal malzemeleri kimyasal olarak değiştirilmesiyle yarı sentetik yani hibrid matriksler geliştirilmiştir(48). Doğal veya sentetik iskele tabanlı yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, gelişmiş hibrid iskele tabanlı üç boyutlu *in vitro* modeller, tümör ilerlemesinin çeşitli yönlerinin yeniden özetlenebileceği daha sağlam platformları temsil eder. Hibrid yapı iskeleleri metastaz veya kanser hücrelerinin çoğalması gibi olaylarda spesifik ECM bileşenlerinin rolünün değerlendirilmesine izin verebilir(46). Örneğin yaygın olarak kullanılan hiyaluronik asit zincirleri, akrilat veya metakrilat ile modifiye edilerek ayarlanabilir mekanik ve degradasyon özelliklerine sahip çapraz bağlanabilen bir hidrojel elde edilebilir(48).

4.4.1.2. İskele tabanlı olmayan üç boyutlu hücre kültürü

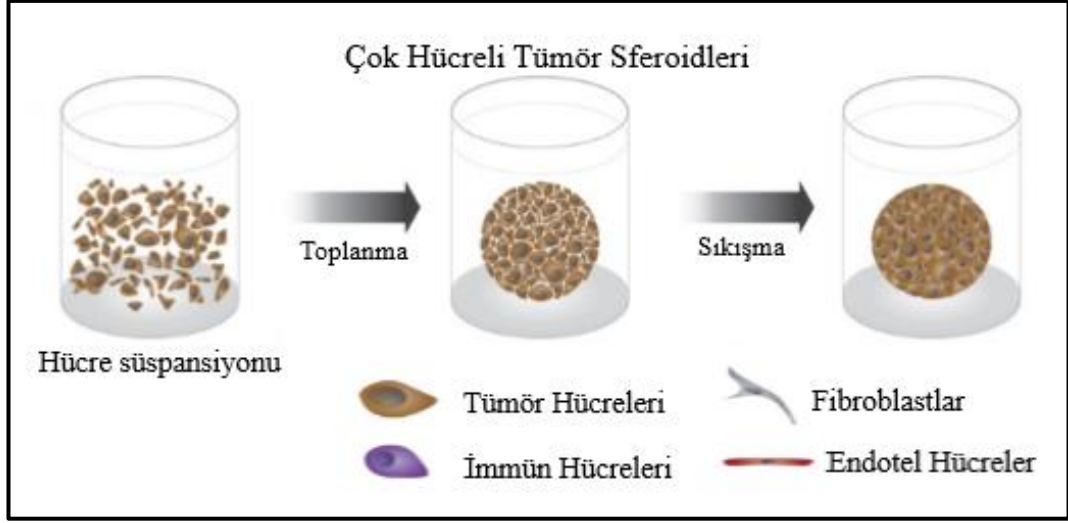
İskele içermeyen yöntemler, yapışkan olmayan koşullar altında hücre kültürlerinin uygulanmasına dayanmaktadır. Bu stratejinin temel amacı, üç boyutlu küresel (sferoidler) veya daha gevşek bir şekilde toplanmış mikro dokuların (hücresel agregalar) üretimini teşvik etmektir. İskele içermeyen yöntemler; çok hücreli tümör sferoidleri, organotipik çok hücreli sferoidler, tümör dokusundan elde edilmiş tümör küreleri olmak üzere üç farklı şekilde sınıflandırılabilir(46, 50).

Sferoid terimi çok düşük yapışma özelliğine sahip bir yüzey üzerine hücrelerin ekilmesi ve kültürlenmesiyle elde edilen küresel hücre topluluğunu açıklar(51). Sferoidlerin yapısı, hücreler arası bağlantıların ve hücreler ile yeni sentezlenen hücre dışı matriks arasındaki etkileşimlerinin oluşumu nedeniyle doğal dokularinkine yakındır(52). Üç boyutlu sferoidlerin kısıtlı oksijen ve beslenme ortamı *in vivo* dokuların mikro çevresini taklit etmektedir(18)(Şekil 4.4.1.2.1).



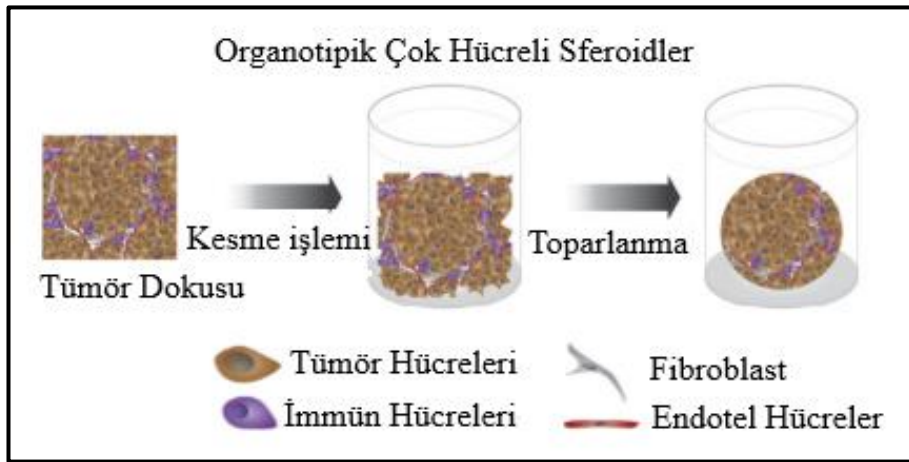
Şekil 4.4.1.2.1 Sferoidlerin besin ve oksijen varlığında oluşan zonlarının gösterilmesi. Proliferasyon zonu; hücre proliferasyonunun devam ettiği kısımdır. Durgun yaşama zonu; hücrelerde herhangi bir aktivite olmayan bölümdür. Nekrotik zon ise oksijen ve besin az ulaştığı için hücre ölümlerinin gerçekleştiği bölümdür(3).

Çok hücreli tümör sferoidleri, *in vivo* tümörlerin özelliklerini aşamalı olarak taklit etmek için geçerli bir üç boyutlu kanser modeli olarak kabul edilen heterojen hücre agregatlarıdır. Tümör mikro çevresini hücresel heterojenite açısından daha doğru bir şekilde yansıtır(Şekil 4.4.1.2.2). Çok hücreli tümör sferoid modelleri, iki boyutlu modellerin basitleştirilmiş yapısı ile katı tümörlerin karmaşıklığı arasındaki boşluğu doldurur(53). En önemli fonksiyonları hücre-hücre yapışması yoluyla hücrenin hayatta kalım mekanizmasını destekleyebilen bir *in vivo* tümör mikro ortamı yaratmaktır. Bu nedenle bir sferoidin işlevi, belirli hücre-hücre yapışma moleküllerinin ekspresyonuna ve aktivitesine bağlıdır(54).



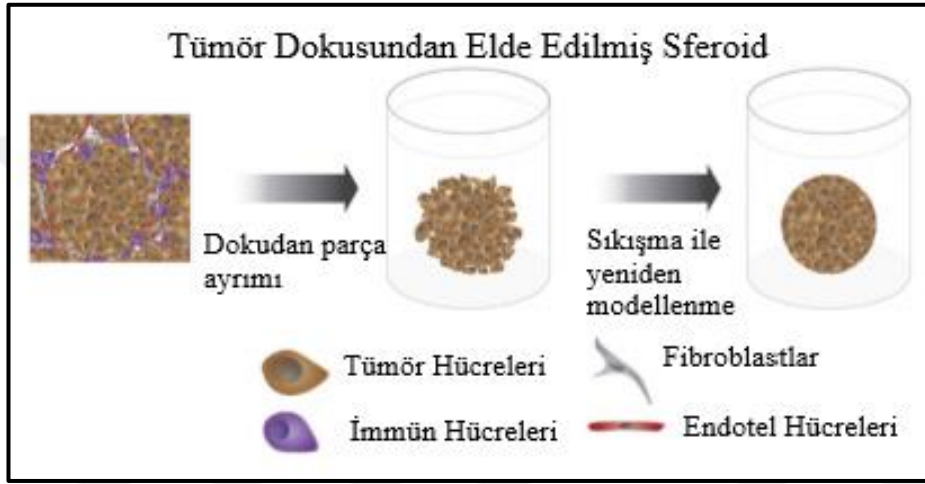
Şekil 4.4.1.2.2 Çok hücreli tümör sferoidlerinin oluşumu(50).

Organotipik çok hücreli sferoidler, *in vivo* tümörlere en yakın sferoidlerdir. Organotipik çok hücreli sferoidlerin kesin özellikleri henüz rapor edilmemiştir. Bu model hakkındaki çoğu bilgi Rolf Bjerkvig'in grubu tarafından elde edilmiştir. *Ex vivo* tümör dokusunun elde edilir. Morfolojileri genellikle orijinal tümör dokusuna benzer. Organotipik çok hücreli sferoidler, vasküler elemanları çevreleyen fibroblastlar ile birlikte kolajen lifleri olan damarların ve makrofajların varlığını koruyarak tümörlerin orijinal heterojenliğini sağlarlar(50)(Şekil 4.4.1.2.3).



Şekil 4.4.1.2.3 Organotipik çok hücreli Sferoidlerin oluşumu(50).

Tümör dokusundan elde edilmiş sferoidler, büyük ölçüde kolorektal kanser için karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, akciğer, mesane, prostat ve meme kanseri dokusu ve uveal melanom da dahil olmak üzere çeşitli kanser dokularının ayrışmasından elde edilmiştir. Tümör dokusundan elde edilmiş sferoidler kısmi doku ayrışmasından sonra yeniden doku modellenmesi ve sıkıştırma ile oluşturulur (Şekil 4.4.1.2.4)(50, 55).

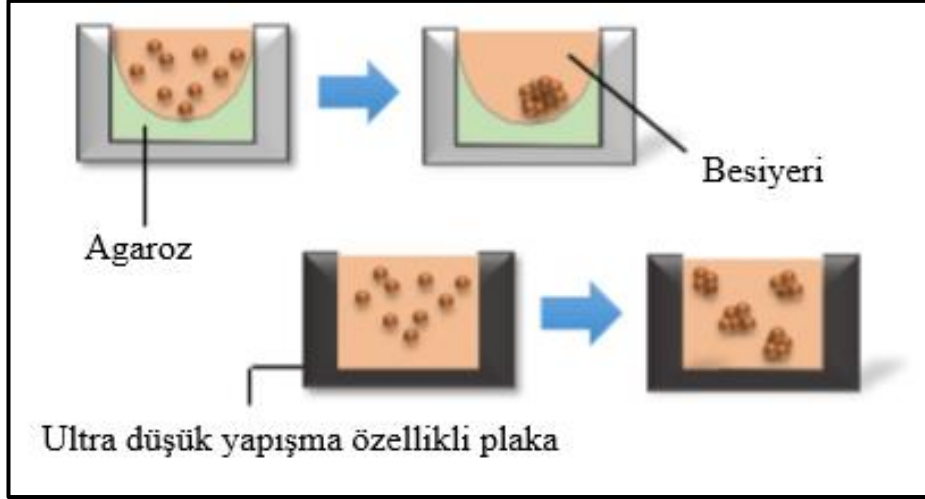


Şekil 4.4.1.2.4 Tümör dokusundan elde edilen çok hücreli tümör sferoidlerinin oluşumu(50).

Bu mikro dokuların *in vitro* kültürlenmesi kolaydır. İlaç taraması ve temel biyoloji çalışmaları için üç boyutlu *in vitro* hastalık modellemesi alanında yaygın olarak kullanılmaktadır(46). Bu mikro dokuları elde etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında yapışkan olmayan yüzey oluşturma, asılı damlacık, ajitasyon temelli teknikler, manyetik levitasyon ve mikroakışkan(55) sistemler bulunur(8, 56).

4.4.1.2.1. Yapışkan olmayan yüzey oluşturma tekniği

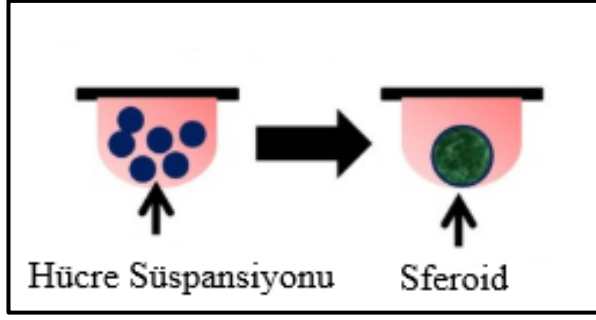
Üç boyutlu sferoidlerin üretilmesi için nispeten basit bir yöntem, yüzeyi modifiye ederek hücrelerin bağlanmasını önlemek ve zorla yüzmesini sağlamaktır(8). Yapışkan olmayan yüzey oluşturma veya zorla yüzdürme olarak adlandırılan yöntem, kaplanmamış plakalar (polistiren yüzeyin düşük yapışma özelliklerine sahip olması gibi) veya ultra düşük bağlantı plakaları gibi hücre-substrat etkileşimlerini baskılayan bir hidrofilik polimer ile kaplanmış plakalar kullanılarak gerçekleştirilir(57). Bu yaklaşım çok hücreli sferoid oluşumunu destekleyen hücre-hücre temaslarını destekler. Bu yaklaşımı kullanarak Ivascu ve Kubbies, kanserli ve kanserli olmayan hücrelerden üç boyutlu sferoidlerin üretilmesi için yuvarlak veya konik tabanlı 96 kuyulu plakalarda sferoidlerin hızlı üretimini sağlayan bir yöntem geliştirmişlerdir. Sferoidler üretilirken her kuyuya eşit sayıda hücre ekilebildiği için basit ve genellikle tekrarlanabilirdir. Sferoidlerin boyutları ayarlanabilir, yani daha büyük sferoidler için daha büyük miktarlarda hücreler ekilebilir. Tipik olarak 96 kuyulu bir plakada üretildiğinden morfolojik olarak homojen çok sayıda sferoid kolayca üretilir. Bu sferoidler gen ekspresyonu, hücresel ve biyokimyasal tahlillere yönelik yüksek verimli araştırmalar için idealdir. Kültür kabına hücre bağlanmasını önlemek için, kültür kaplarının yüzeyi agaroz ile kaplanabilir. Agar, yüzeye hücre yapışmasını önleyerek üç boyutlu sferoidlerin oluşmasına neden olur (Şekil 4.4.1.2.1.1). Agaroz dışında poli-HEMA (poli-2-hidroksietil metakrilat) da yüzeyi kaplamak için kullanılmaktadır(8). Ayrıca son zamanlarda hiyalüronik asit, agarozun yerini alabilecek uygun bir alternatif biyomateryal olarak kullanılmaktadır. Kanser ilerlemesi sırasında kanser hücrelerinin yüzey reseptörleri ile etkileşime girebilmektedir. Bu etkileşim proliferasyon, anjiyogenez, sağkalım ve farklılaşma ile ilişkili hücresel sinyallerin transdüksiyonunu ve terapötiklere karşı direnci arttırmaktadır(55).



Şekil 4.4.1.2.1.1 Yapışkan olmayan yüzey üzerinde sferoid oluşturma(46).

4.4.1.2.2. Asılı damlacık tekniği

Asılı damla tekniği, yerçekimini kullanarak hücrelerin kendi kendine toplanma yoluyla sferoid oluşturmada izin verir. Sferoidler, genellikle kültür kaplarının kapağının arka tarafında oluşturulur. Asılı damlacık yöntemleri, tekrarlanabilir olması nedeniyle geniş bir kullanım alanına sahiptir(19). Bu yöntemle üretilen sferoidlerdeki gaz alışverişi nispeten daha yüksektir ve substrat ile temasa bağlı hücreler üzerindeki olası etkilerden kaçınılır. Bununla birlikte, sferoidlerin hücre bazlı analizlerde kullanılmak üzere diğer standart plakalara aktarılması gerekir(8, 57). Bu yöntem için hücreler, süspansiyon olarak hazırlanır ve istenen hücre yoğunluğuna ulaşmak için besiyeri ile seyreltilir. Daha sonra hücre süspansiyonu, pipet yardımıyla bir plakanın kuyucuklarına ekilir. Plakaya bir kapak yerleştirilir ve ters çevrilir. Plaka yüzeyindeki hücre süspansiyonu damlaları, yüzey gerilimi ile ters yüzeyde kalır. Bu yöntemde sferoidler, yüzey gerilimi ve yerçekimi kuvvetinin eşzamanlı etkisi nedeniyle damlacıklar halinde oluşur(Şekil 4.4.1.2.2.1). Bu sistem sayesinde küçük ölçekli deneyler için sferoid oluştururken pahalı veya profesyonel ekipmana ihtiyaç duyulmaz. Çok kanallı pipetler kullanılarak fazla sayıda sferoid kolayca üretilir ve kültür kaplarının kapaklarının kazınmasıyla pasajlama yapılabilir(8, 55).

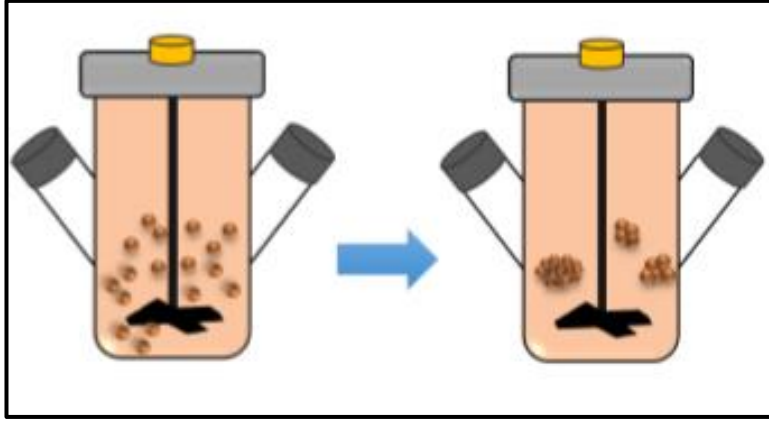


Şekil 4.4.1.2.2.1 Plaka yüzeyinde asılı damlacık tekniği ile sferoid oluşturma(58).

4.4.1.2.3. Ajitasyon temelli teknikler

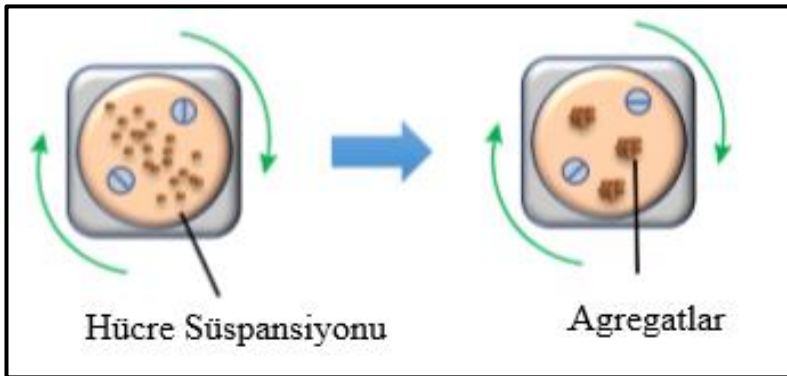
Ajitasyon temelli yöntemlerin ardındaki genel prensip, hücre süspansiyonunun bir kaba yerleştirilmesi ve süspansiyonun hareket halinde tutulması temeline dayanmaktadır. Bu şekilde askıya alınmış hücreler, sürekli hareket halinde buldukları için kabın duvarına yapışmaz ve hücre-hücre etkileşimleri oluşur. Ajitasyon tabanlı yaklaşımlar spinner şişesi biyoreaktörleri ve rotasyonel kültür sistemleri olarak ikiye ayrılmaktadır(8).

Spinner kültür tekniği, spinner şişesi biyoreaktör kaplarındaki hücre süspansiyonunun bir karıştırma çubuğu yardımıyla sürekli karıştırıldığı tekniğe karşılık gelir. Ortaya çıkan sferoid, biyoreaktör kabının büyüklüğüne bağlıdır. Kaplardaki sıvı ve kütlenin koşulları, sferoidi oluşturmak için çok önemli olan karıştırma çubuğunun konveksiyon kuvvetinden etkilenir(Şekil 4.4.1.2.3.1). Yüksek bir karıştırma hızı, sferoid hücrelerine zarar verir. Bununla birlikte son derece yavaş bir karıştırma hızı, sferoid hücrelerinin kabın dibine çökmesine izin vererek kapta sferoid oluşumunun inhibisyonuna neden olur(8, 55).



Şekil 4.4.1.2.3.1 Spinner şişesi biyoreaktörleri ile oluşturulan sferoidler(46).

Rotasyonel kültür sistemleri, daireselliği sabit dönüşle yeniden yapılandırır. Sabit rotasyon nedeniyle, hücreler sürekli olarak kaptaki asılı durumdadır(55). Bu sistemin spinner kültür tekniğinden farkı karıştırma çubuğu kullanmak yerine kabın kendisinin döndürülmesidir(Şekil 4.4.1.2.3.2). 1992 yılında NASA tarafından geliştirilen döner duvar kabı, mikro yerçekimini taklit etmek ve kültürdeki hücrelere düşük bir kuvvet uygulamak için tasarlanmıştır. NASA biyoreaktörünü kullanmanın sınırlaması, özel ekipman gerektirmesidir(8).

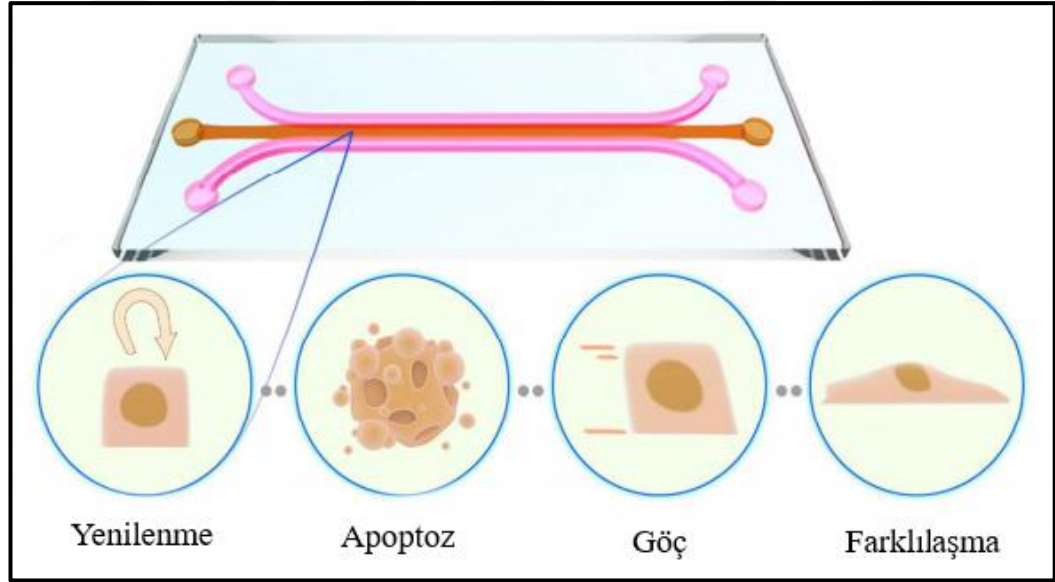


Şekil 4.4.1.2.3.2 Rotasyonel kültür sistemi kullanılarak oluşturulan sferoidler(46).

4.4.1.2.4. Mikroakışkan sistemler

Mikroakışkan hücre kültürü, mikrometre ve nanolitre ölçeğindeki sıvı akışının kesin olarak tanımlanmış geometrilere kontrol edilmesini sağlar. Tek bir hücre seviyesinden daha büyük hücre popülasyonlarına kültürlen dokulara kadar eşzamanlı manipülasyon sağlayarak analizi kolaylaştırır(59).

Bu sistem mikrometre ölçeğinde olan mikro kanallardaki küçük hacimli sıvıların akış davranışının kontrolünü ele alan bilim alanıdır. Üç boyutlu hücre kültürü ve hücre temelli deneyler için sürekli besin ve oksijen tedarikinin sağlanması; hücre kültürü, hücre yakalama, hücre lizisi ve karıştırma gibi çoklu adımların entegrasyonuna ve aynı cihazda algılanmasına izin verir. Polidimetilsiloksan (PDMS) ve polimetil metakrilat (PMMA), yumuşak litografi tekniği ile mikroakışkan cihazları imal etmek için en yaygın olarak kullanılan polimerlerdir. Bu malzemeler oksijen girişine izin verecek şekilde tasarlanmaktadır(60).

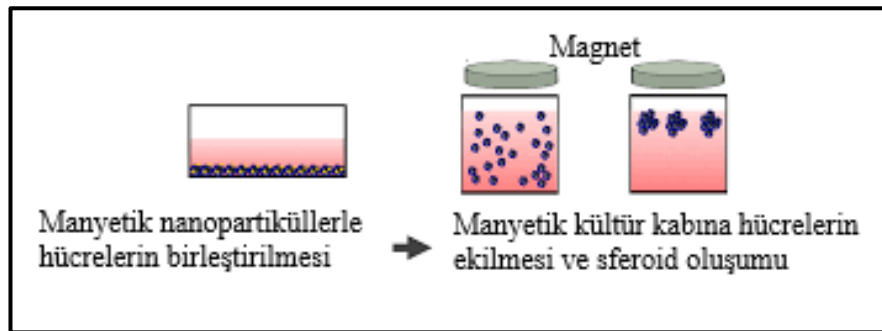


Şekil 4.4.1.2.4.1 Mikroakışkan hücre kültürü tekniği kullanılarak oluşturulan hücre agregatları(55).

Mikroakışkan kültür tekniği, tek hücre analizi, genetik analizler ve ilaç toksisitesi çalışmaları gibi uygulamalar için kullanılır. Ek olarak, mikroakışkan cihazlar, *in vivo* üç boyutlu ortamı taklit ederek ortamın mikro ölçekte kontrolünü kolayca sağlar. Başka bir özelliği ise hücre analizi için oldukça yüksek bir hücre verimi olmasıdır. Mikroakışkan cihazlar proliferasyonu etkileyen büyüme faktörlerini kullanır(55).

4.4.1.2.5. Manyetik levitasyon

Manyetik levitasyona dayalı sistemde, hücreler harici bir mıknatısa maruz kalırlar. Hücrelerle karışarak sferoid oluşmasına izin veren manyetik nanopartiküller enjekte edilerek gerçekleştirilir. Bu durum, ECM'nin sentezlenebileceği konsantrasyonlu bir hücre ortamı yaratır(19). Kültürlenme sırasında oluşan manyetik kuvvet nedeniyle, manyetik parçacıklar ile birleşmiş olan hücreler yer çekimine karşı havaya kaldırılırlar. Bu durum, hücre kitlesinin geometrik değişimini indükler. Hücreler arasındaki teması teşvik ederek hücrelerin birleşmesine yol açar(Şekil 4.4.1.2.5.1). Ayrıca bu sistem, farklı hücre tiplerinin kullanılması ile çok hücreli ko-kültürleri kolaylaştırabilir(55). Harici mıknatıs, daha gelişmiş ortamlara izin vererek üç boyutlu kültürü manipüle etmek için kullanılabilir. Genel olarak, manyetik kaldırma hem temel hem de gelişmiş ortamların çoğaltılmasına izin verir, böylece çok yönlü bir teknik haline gelir(19).



Şekil 4.4.1.2.5.1 Manyetik levitasyon tekniği ile sferoid oluşturma(61).

4.5. Ko-Kültür

Bazı patolojik durumları ve *in vivo*'yu taklit etmek amacıyla iki boyutlu ve üç boyutlu kültürde dahil olmak üzere çeşitli kültür sistemleri geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra birden fazla hücrenin bir arada olduğu ya da fibroblast, vasküler endotelial hücreler gibi destek sağlayan hücrelerle birlikte gerçekleştirilen ko-kültür sistemleri bildirilmiştir(62).

Birlikte kültürleme yani ko-kültür, çok sayıda farklı hücre türünün aynı ortamda doğrudan veya dolaylı olarak büyütüldüğü bir yöntemdir. Doğal hücre etkileşimlerini gözlemleyen deney sistemlerinde ko-kültür yapılması çok önemli bir basamaktır. 1980'lerde hücreler arası iletişim araştırması için tanıtıldığından beri çeşitli çalışma alanlarında kullanılmıştır. Ko-kültür sistemlerini kullanmanın ardındaki temel motivasyon, doğal hücreler ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimleri incelemek ve bu etkileşimleri kullanarak yeni hücre mühendisliği teknikleri geliştirmektir(63).

1978'de Lawrence ve ark. *in vitro* ilk ko-kültür çalışmasını gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada, sıçan yumurtalık granüloza hücreleri(64), hücreler arasındaki bağlantıların oluşumunu gözlemek için fare kardiyomiyositleri ile birlikte kültürlenmişti. Bundan sonra, ko-kültür araştırmasının odağı özellikle implante embriyoların *in vitro* gelişimine kaymıştır. Bu sonuçlar sadece *in vitro* embriyonik ko-kültür yöntemlerinin son yıllarda klinik kullanımına katkıda bulunmakla kalmamış aynı zamanda *in vitro* fertilizasyonun klinik uygulamasını da içermektedir(65).

Ko-kültür modelleri iki boyutlu olarak yapılabileceği gibi çeşitli sınırlamaların oluşmasından dolayı üç boyutlu olarak da gerçekleştirilebilir. Üç boyutlu ko-kültür modelleri, *in vivo* hücre çevresini taklit etmek için kullanılır. Ayrıca hücrelerin normal şekli ve mikro yapısının daha iyi yansıtılabilmesi için dinamik ve mekanik özelliklerin doğal bir şekilde oluşmasına izin verir(66).

Doku, hücrelerden ve hücre dışı matriksten (ECM) oluşan üç boyutlu bir yapıdır. Vücuttaki dokuların çoğu birden fazla hücre tipinden oluşur. Canlı bir doku sürekli olarak çevre hücreler ve ECM ile etkileşime girer. Bu etkileşim, doku ve

organ içindeki hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını etkiler. Ko-kültür, bu *in vivo* etkileşimleri çoğaltmak için kullanılan *in vitro* yöntemlerden biridir(64). Üç boyutlu kültür, hücre fonksiyonu, davranış, morfoloji, gen ekspresyonu, parakrin faktörler ve hücre-hücre etkileşimlerinin *in vivo* koşulları daha iyi temsil eden bir şekilde incelenmesine izin verir. Fare modelleri ile karşılaştırıldığında, üç boyutlu ko-kültürler daha uygun maliyetlidir ve tümör mikro çevresinde meydana gelen çoklu ve eşzamanlı etkileşimlerle belirli hücre tipleri arasındaki hücre iletişiminin çalışılmasını kolaylaştırır(67).

Birden fazla hücre tipi birlikte kültürlendiğinde her biri diğerine yardımcı hücre olarak işlev görmektedir. Yardımcı hücreler, hedef hücrelerde istenen bir dizi davranışın gözlemlenmesini sağlar. Bu davranışlar arasında çoğalma, farklılaşma, doğrudan hücre-hücre teması ile matriks üretimi veya organizasyonu bulunur. Hücrelerin yardımcı hücreler tarafından üretilen hücre dışı matrikslere yapışması veya sinyal moleküllerinin salgılanması da bu davranışlar arasındadır. Destek ve hedef hücreler arasındaki yakın etkileşimler eksojen kontrol yoluyla uygulanamayacak kadar karmaşıktır. Yardımcı hücreler, hedef hücrelerin ihtiyaçlarını sürekli olarak izler ve yanıtlar, böylece ideal olarak kontrol edilen bir kültür ortamı oluşturur(68).

Geleneksel tek tabakalı kültürlerin bir başka potansiyel sınırlaması, *in vivo* ortam ile karşılaştırıldığında diğer hücre tipleriyle etkileşimin olmamasından kaynaklanmaktadır. Örneğin, fibroblastlar ve keratinositlerin ko-kültürü, özellikle yara iyileşmesi sürecinde her iki hücre tipi arasındaki etkileşimi anlamak için incelenmiştir. Matriks metalloproteinazlara ve metalloproteinazlara karşılık gelen doku inhibitörlerinin dengesinin, hem hücre tipleri arasındaki etkileşime bağlı olduğu hem de mono kültürler ile ko-kültürler arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Keratinositler ve fibroblastların hücre göçünün, farklılaşmasının ve çoğalmasının her iki hücre tipi arasındaki sinyal molekülleri ve parakrin büyüme faktörü döngülerinin karmaşık ağları tarafından düzenlendiği gösterilmiş ve böylelikle ko-kültürün etkisi de ortaya konmuştur(69).

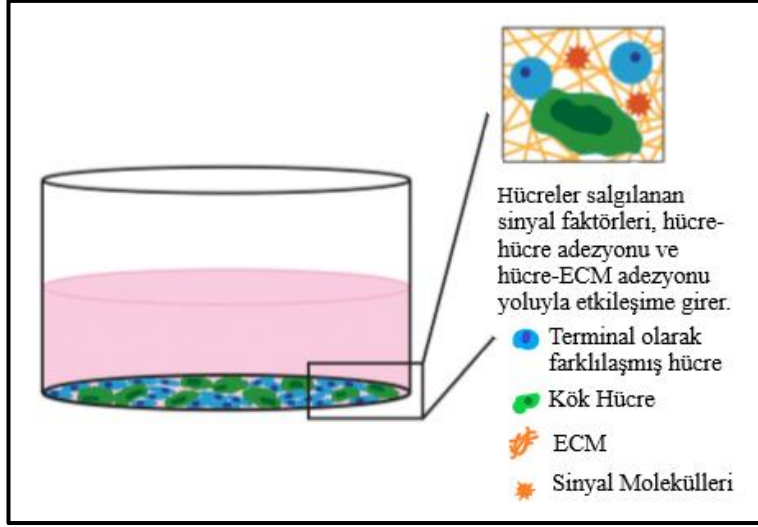
Çoğaltılmış fizyolojik parametrelere sahip iyi karakterize edilmiş bir *in vitro* üç boyutlu tümör ko-kültür modeli, patolojik olarak ilgili ve iyi tanımlanmış kültür

koşulları altında tümör oluşumunu anlamak ve yeni ilaçların taranmasını sağlamak için kullanılabilir. Ayrıca böyle bir *in vitro* ilaç test modeli, *in vivo* ortamda vasküler desteği bulunan bir tümörü replike etme kabiliyeti nedeniyle intratümöral ilaç vermeyi gerektirmez(70). İlaçlara karşı kanser hücrelerinin duyarlılığı genellikle tümör mikro ortamına bağlıdır. Preklinik üç boyutlu *in vitro* ko-kültür modellerinin, tek tabakalı kültürlerden daha karmaşık sistemler olduğu ve fizyolojik ortamı en iyi şekilde taklit edebildiği bilinmektedir(71).

Tümör mikro ortamındaki hücrelerin tümörlerle ilişkilerini incelemek için uygun bir şekilde parakrin sinyal değişimini ve matriks sertliğinde değişimler yapılmasını sağlayan ko-kültür sistemleri kullanılmaktadır. Mono kültürlerle kıyasla ko-kültürlerde stromal ve tümör hücrelerinin fenotip farklılıklarının, kanser ilerlemesini teşvik etmede karşılıklı etki ettiği gösterilmiştir(72).

4.5.1. Direkt ko-kültür modelleri

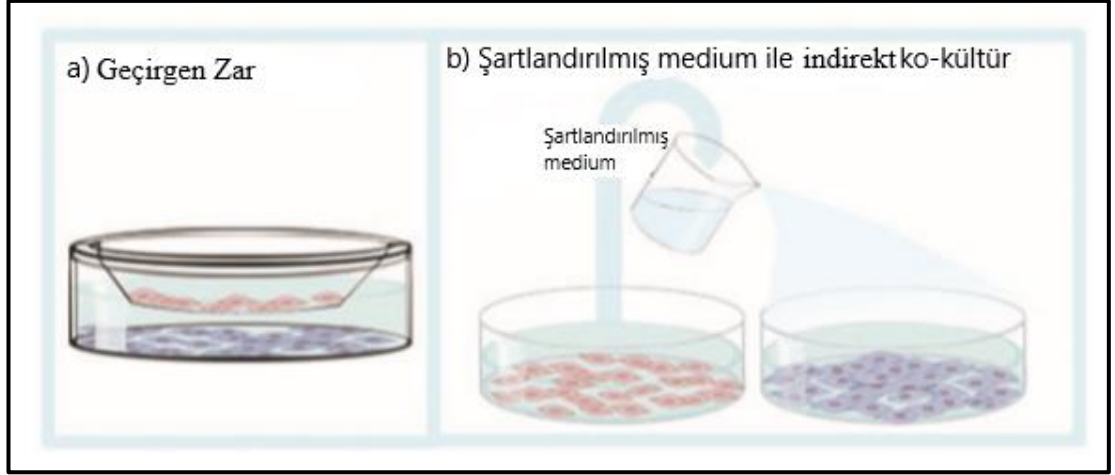
İki ya da daha fazla hücre tipinin hücre-hücre etkileşimlerine izin veren karışık bir popülasyon olarak büyütülmesi direkt ko-kültür olarak isimlendirilir. Membran eklentileri ve şartlandırılmış ortam kullanılarak dolaylı yoldan iletişime izin veren modeller de direkt ko-kültür modelleridir(Şekil 4.5.1.1). Direkt ko-kültürler iki hücreli popülasyonlar arasında fiziksel bir etkileşim gerektiren örneğin; adezyon moleküllerinin incelenmesi, sitokin üretimi ve juxtakrin sinyallerin araştırılması gibi çalışmalar için kullanılır. Direkt ko-kültürler bazı teknik zorluklar gösterir ve genellikle daha çok optimizasyon aşamasına ihtiyaç duyar(67). Ek olarak hücrelerin doğrudan teması fenotip ve fonksiyon değişikliğine neden olabilir(64).



Şekil 4.5.1.1 Direkt ko-kültür sistemlerinde hücrelerin bulunduğu ortam(68).

4.5.2. İndirekt ko-kültür modelleri

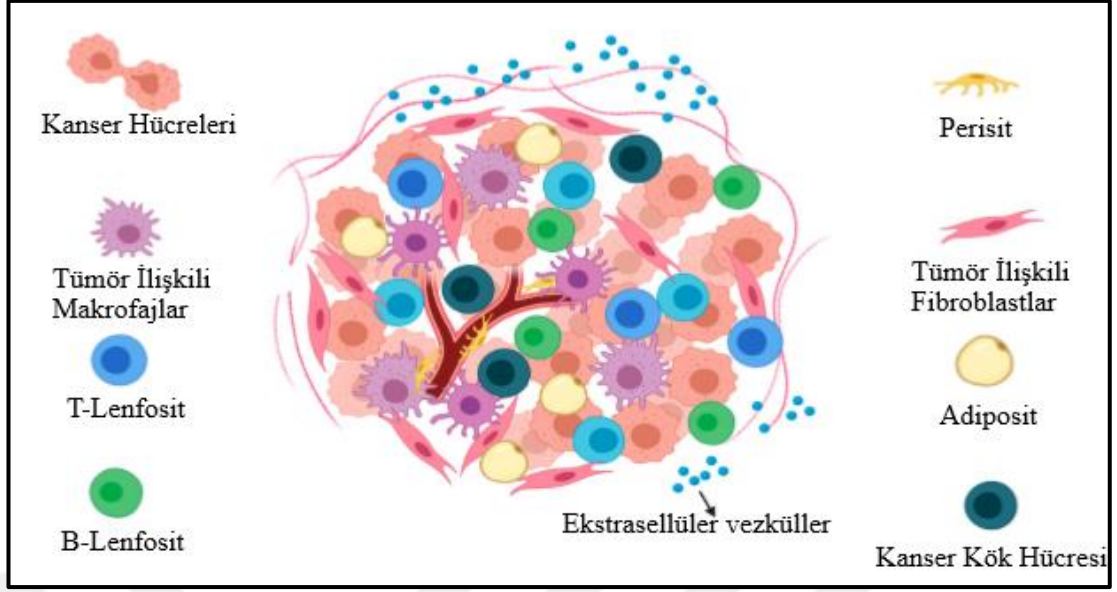
İndirekt ko-kültürler bazen daha fazla tekrarlanabilir sonuç sağladıkları için tercih edilir ancak bunlar hücre-hücre adezyonu, integrin ve notch tipi sinyalleri içermez. İndirekt ko-kültürler salgılanabilir ve çözünür faktörlerin yayılmasına izin veren geçirgen bir zar kullanılarak veya kullanılacak hücre tiplerinden birinin önceden üretilmiş şartlandırılmış ortamı kullanılarak elde edilir(Şekil 4.5.2.1). İndirekt ko-kültürler, popülasyona özgü hücresel değişiklikler üzerinde parakrin sinyalleşmenin değerlendirilmesini içeren çalışmalar için yararlıdır. Ancak şartlandırılmış ortam ko-kültürleri, hücreler arasında muhtemel dinamik geri besleme döngüsünü göz ardı eder(67). Temassız bir kültürde besiyeri ayrı bir plaka üzerinde farklı hücreler arasında paylaşılır. Hücrelerin fiziksel olarak farklı yerlerde bulunması her bir hücre tipinin bireysel fenotip değişikliklerini ve gen ekspresyonunu tespit etmeyi mümkün kılar(64).



Şekil 4.5.2.1 İndirekt ko-kültür sistemleri(64).

4.6. Tümör Mikro Çevresi

Bir tümör hücresi kitlesinin hayatta kalması, büyümesi ve metastazı, kansere bağlı fibroblastlar, makrofajlar, sitokinler, büyüme faktörleri, kan damarları, bağışıklık hücreleri ve hücre dışı matriks proteinleri ile başarılı bir etkileşime dayanır. Bunlar topluca tümör mikro çevresi olarak bilinir(73). Tümör mikro çevresi hücresel ve hücresel olmayan iki farklı bileşenden oluşmaktadır. Hücresel bileşen, kanser ilişkili fibroblastlar, tümör ilişkili endotel hücreler, perisitler, immün stromal hücreler, tümöre bağlı adipositler ve kanser kök hücrelerinden oluşur. Hücre dışı bileşen ise ECM, çözümler faktörler ve eksozomlar gibi hücre dışı veziküllerden oluşur(Şekil 4.6.1)(74).



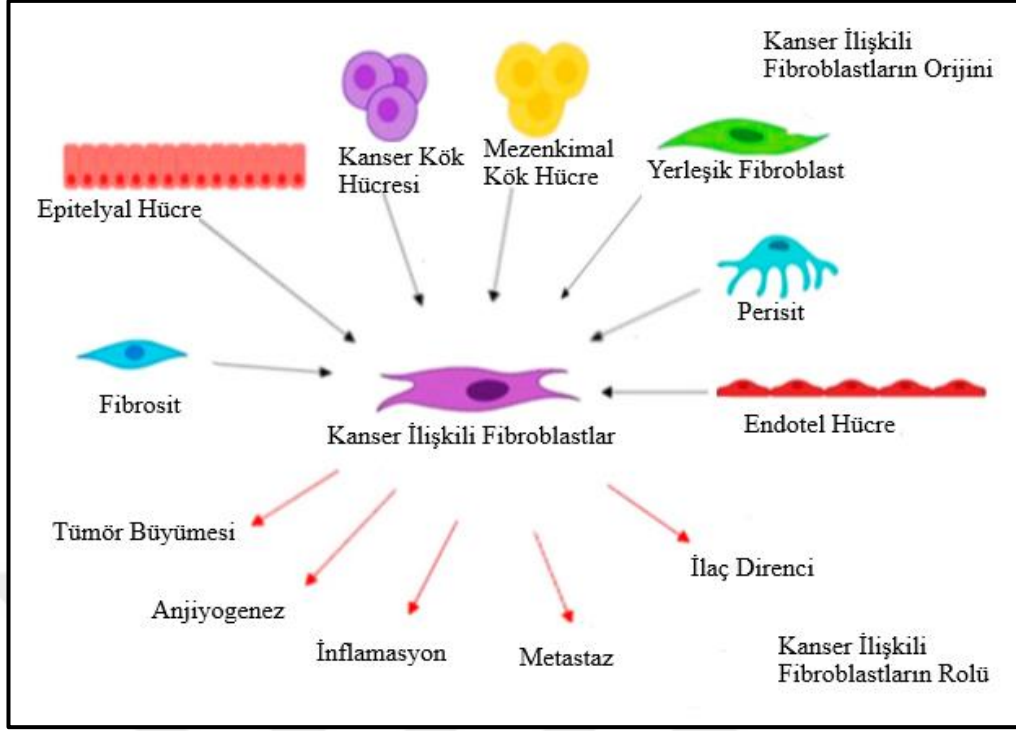
Şekil 4.6.1 Tümör mikro çevresinde bulunan hücrelerin gösterimi(74).

Tümör mikro çevresi zamanla hücrelerde çeşitli değişikliklerin meydana gelmesiyle oluşur. Tümör ilerlemesi sırasında kanser hücreleri, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, perisitler, mezenkimal kök hücreler ve endotelial hücreler gibi stromal hücreleri tümör mikro çevresine alır ve hücresel heterojenliğini artırır. Bu stromal hücreler, kanser ilerlemesinde bir tümörojenik niş sağlamak için fenotiplerini değiştirir. Örneğin, makrofajlar, anjiyogenez, istila ve metastaz yoluyla tümör hücresi yayılımını destekleyen tümörle ilişkili makrofajlara dönüşür(75).

1970’li yıllarda yeni biyomedikal teknolojilerin ortaya çıkması, tümör mikroçevresi ile ilgili araştırmalarda yoğun gelişmeler sağlamıştır. Geçen yüzyılın yetmişli ve seksenli yıllarında tümör mikroçevresi bağlamında incelenen bir hücre türü makrofajlardır. Daha sonra dendritik hücreler incelenmiştir. Seksenli yıllarda, tümör stroma (kansere bağlı fibroblastlar) ile ilişkili fibroblastlar normal deriden farklı olarak karakterize edilmiştir(76). Tümör ve tümör mikroçevresi arasındaki karmaşık etkileşimi anlamak, umut verici terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olmaktadır(73).

4.6.1. Fibroblast hücreleri

Kansere bağı fibroblastlar, tümör mikro ortamının önemli bir oranını temsil eden heterojen ve aktifleştirilmiş hücre popülasyonudur. Örneğin kanser ilişkili fibroblastlar, meme kanserinin %70'ini ve pankreas kanseri tümör kütlelerinin %90'ını oluşturur. Kanser ilişkili fibroblastların tümör oluşumuna, tümör büyümesine, metastazına ve tedaviye direncine katkıda buldukları gösterilmiştir. Ayrıca kanser metabolizmasının düzenlenmesinde, özellikle metabolitlerin salgılanması ve kanser hücresi metabolizmasını etkileyen daha şiddetli ve fibrotik bir ECM' nin üretilmesinde önemli bir rol oynamaktadır(77). Kanser ilişkili fibroblastlar, sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgılayarak tümör hücreleri için optimal bir mikro ortam oluşturur. Epitelyal-mezenkimal geçiş ve immünosupresyon fizyolojik süreçlerine de dahil olur(78). Tümör stromasında daha fazla sayıda kanser ilişkili fibroblast varlığının meme, akciğer ve pankreas kanserinde kötü klinik prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aktif kanser ilişkili fibroblastların çoğu, tümör mikroçevresinde bol miktarda bulunan TGF, FGF ve PDGF gibi birçok büyüme faktörü ve sitokinlere yanıt olarak yerleşik fibroblastlardan türetilir. Kanser ilişkili fibroblastlar ayrıca kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücrelerden de kaynaklanabilir. Epitelyal-mezenkimal geçiş veya endotelial mezenkimal geçiş yoluyla tümör stroması içindeki yerleşik epitel veya endotel hücrelerinden türetilir(Şekil 4.6.1.1)(79). Tümör mikroçevresindeki aktif fibroblastlar normal bir fenotipe geri dönmez veya apoptoza maruz kalmazlar(75). Karsinomun ilerlemesi sırasında kollajen yoğunluğunda artış gözlenir ve kollajenin çoğunlukla kanser ilişkili fibroblastlar tarafından üretildiği gösterilmiştir(77).

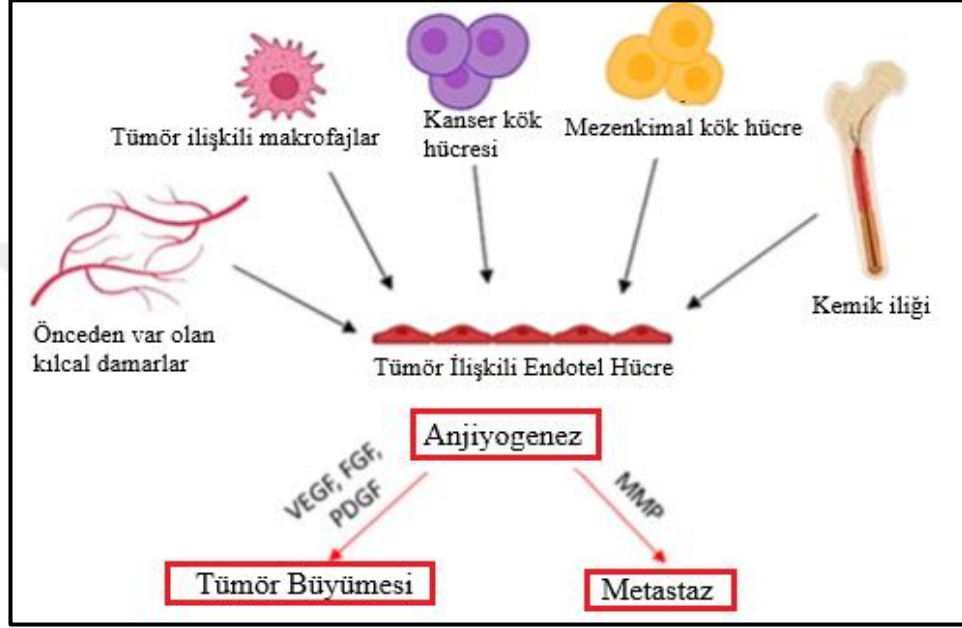


Şekil 4.6.1.1 Kanser ilişkili fibroblastların orijini ve rolü(74).

4.6.2. Endotel hücreler

Yeni kan damarı oluşumu, besin temini, atıkların uzaklaştırılması ve metastatik yayılma için çok önemlidir. Endotel hücreleri, perisitlerle birlikte anjiyogenezden ve tümör büyümesini desteklemekten sorumludur(Şekil 4.6.2.1)(80). Tümöre bağlı endotelyal hücreler proliferasyon, göç, büyüme faktörlerine (yani EGF, VEGF) ve kemoterapötik ilaçlara verilen yanıtlarda normal endotelyal hücrelerden farklılık göstermektedir. Artan kanıtlar tümör hücrelerinin, endotel hücrelerin immünoşüpresif aktivitelerini tetiklediği göstermiştir. Tümöre bağlı endotel hücreler tarafından E-selektin, hücreler arası adezyon molekülü 1,2 ve vasküler hücre adezyon molekülü 1'in ekspresyonunun azalması, tümör spesifik sitotoksik T hücrelerinin tümör lezyonuna alınmasına yol açmaktadır. Ayrıca bu hücreler seçici olarak immünoşüpresif miyeloid hücrelerin kandan tümöre geçişine izin verir ve bu nedenle anti-tümör immün yanıtlarını bozmaktadır(79). Veriler, kemik iliğinden türetilen endotelyal hücrelerin, tümör büyüme faktörü-beta (TGF β) varlığında endotelyal hücreleri, fibroblast benzeri hücrelere dönüştüren bir endotelyal

mezenkimal geçişe maruz kaldığını göstermiştir(81). Tumor anjiyogenezinin, kan damarlarındaki endotel hücrelerinin çoğalmasıyla ortaya çıktığı düşünölmektedir. Tumor ilişkili endotel hücrelerin düzensiz şekli ve boyutu normal endotel hücrelerinden farklıdır(74).

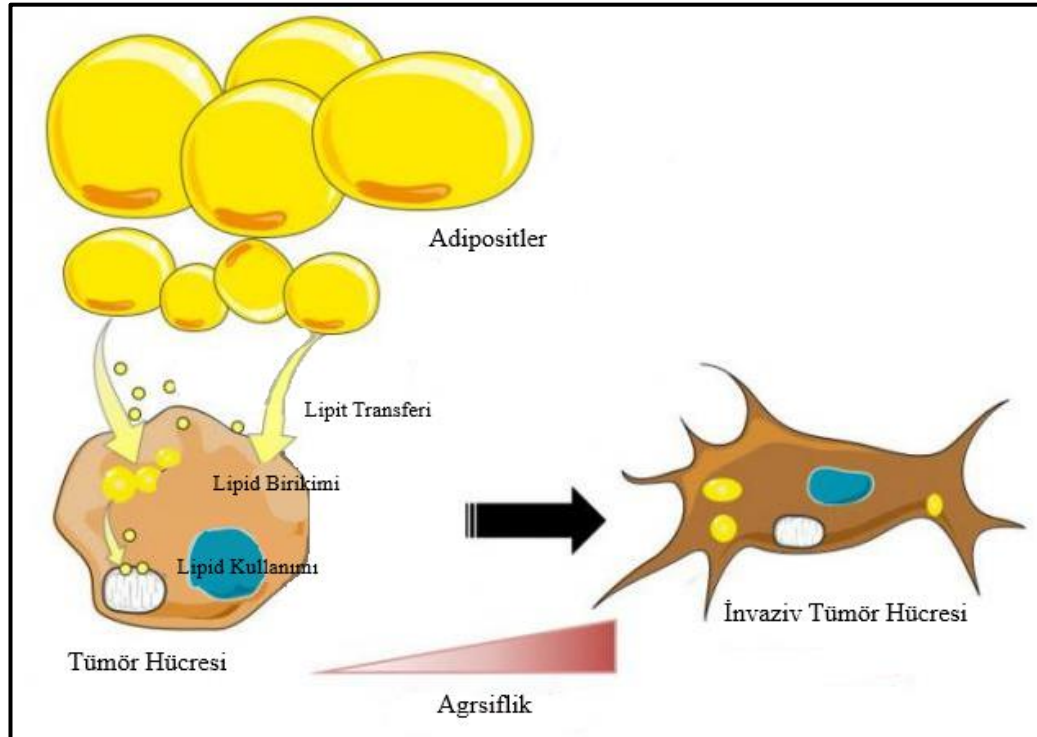


Şekil 4.6.2.1 Tumor ilişkili endotel hücrelerin orijini ve rolü(74).

Perisitler, kılcac damarları saran ve stabilize eden mezenkimal kökenli hücrelerdir. Küçük kan damarlarının taban zarına gömölürler. Endotel hücre büyüme faktörlerini, MMP (matriks metalloproteinaz) inhibitörlerini ve çeşitli ECM moleküllerini salgılayarak kılcac damarların proliferasyonlarını kısıtlarken endotel hücrelerin hayatta kalmasını teşvik ederler. Perisitler ayrıca vasküler geçirgenliği sınırlamak için endotel hücre kavşaklarını stabilize eder(82).

4.6.3. Adiposit hücreleri

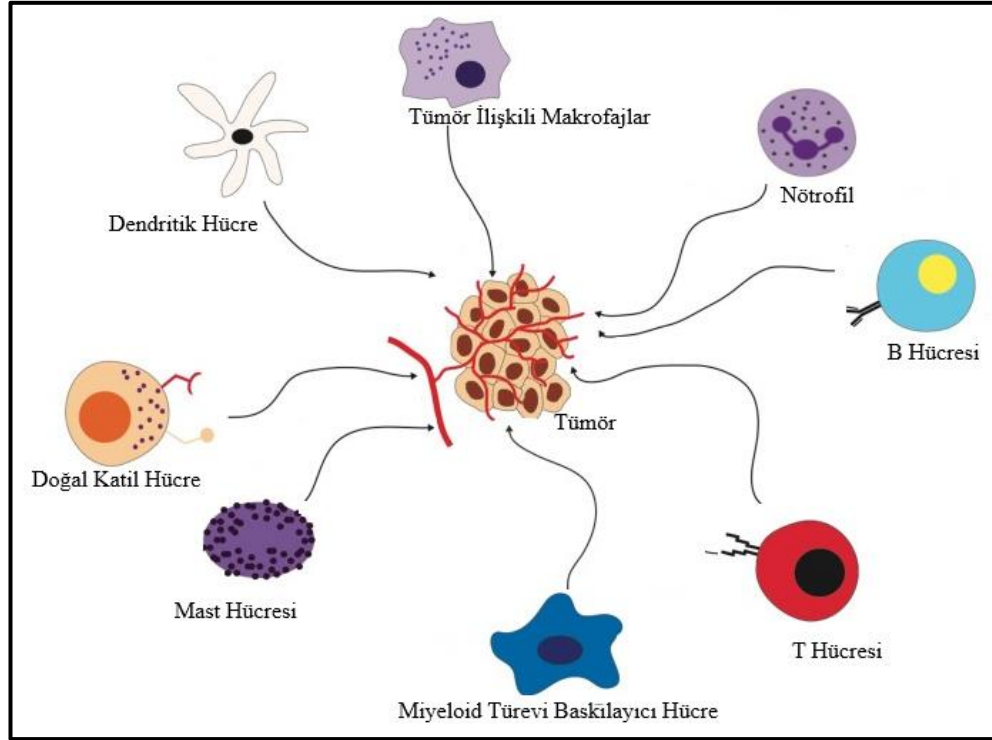
Adipositler, bazı tip kanser hücreleri ile doğrudan bağlantılı olmasına rağmen, tüm kanser türlerinde en az çalışılan stromal hücrelerdir. Yüksek oranda vaskülarize ve anjiyojenik tümör dokularındaki adipositler, tümörlerin genişlemesini ve ilerlemesini desteklemektedir(74). Tümörlerin invaziv cephesinde bulunan adipositlerin, kanser hücrelerinin matriks yeniden modellenmesi, istilası ve hayatta kalması ile ilişkili faktörleri ifade ettiği ve ayrıca epitelyal-mezenkimal geçişe neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.6.3.1). Dirat ve ark. meme kanseri hücreleri ile birlikte kültürlenmiş olgun adipositlerin, matriks metaloproteinazların yanı sıra proenflamatuar sitokinlerin ve interlökin ekspresyonlarını arttırdıklarını göstermişlerdir(81). Son yapılan araştırmalar, tümör hücrelerinin ve komşu adipositlerin tümör stromasında birbirleriyle doğrudan etkileşime girdiğini göstermiştir. Bu etkileşim, genellikle lipoliz, adiposit belirteçlerinde kayıp ve proenflamatuar sitokinlerin aşırı ekspresyonu ile tanınan tümör destekleyici fenotip ile aktifleştirilmiş adipositlere yol açmaktadır. Tümör hücrelerinin komşu dokulara yayılması ve invazyonu, tümör dokusundaki adipositlerin rollerine bağlıdır. Fakat tümör ilişkili adipositlerin kökeni belirsizliğini korumaktadır(74).



Şekil 4.6.3.1 Adipositlerin tümör hücresi üzerine olan etkisi(83).

4.6.4. İmmün hücreleri

Tümör mikro çevresinde doğuştan gelen bağışıklık hücreleri (makrofajlar, mast hücreleri, nötrofiller, dendritik hücreler, miyeloid türevli baskılayıcı hücreler), doğal katil hücreler ve edinsel bağışıklık hücreleri (T ve B lenfositleri) bulunur(Şekil 4.6.4.1). Doğrudan temas yoluyla veya kemokin yoluyla tümör hücreleriyle etkileşime girerler. Tümörün davranışını ve tedaviye cevabını şekillendiren sitokin sinyali yardımıyla tümör hücreleriyle etkileşim kurarlar(79). Tümör mikro çevresindeki bağışıklık hücreleri sadece habis hücre tanıma ve baskılamada değil, aynı zamanda immünolojik kaçışta da önemli bir role sahiptir(80).



Şekil 4.6.4.1 Tümör mikro çevresinde bulunan immün hücreleri(84).

Günümüzde giderek artan kanıtlar, tümör mikro çevresi ve kanser hücreleri arasındaki etkileşimlerde tümöre bağlı makrofajların kritik rollerinin yanı sıra tümör ilerlemesi, invazyonu ve metastaza da güçlü bir şekilde etki ettiğini göstermektedir(85). Tümörle ilişkili makrofajların kaynağı, tümörlerin içindeki

yerleşik makrofajlar yerine dolaşımdaki monositlerdir. Kemik iliğindeki monositler miyeloid progenitörlerden türetilir ve kan dolaşımıyla tümörlere giriş yapar. Daha sonra makrofajlara farklılaşabilirler. Makrofajlar polarizasyon durumlarına göre M1 ve M2 alt tiplerine ayrılabilir. M1 makrofajları Th1 sitokin interferon γ (IFN γ) ve mikrobik ürünler ile aktive edilebilir. Buna karşılık M2 makrofajları, IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi Th2 sitokinlerine yanıt olarak farklılaşır. Tümör ilişkili makrofajlar bağlamında M1 makrofajlarının tümör öldürücü olduğu düşünülmektedir. M2 makrofajlar ise tümör oluşumunu artırır(79). Yüksek makrofaj miktarı sıklıkla insan tümörlerinde artmış vasküler yoğunluk ile ilişkilidir. Tümörle ilişkili makrofajlar, endotel hücrelerin sağkalımı, aktivasyonu ve proliferasyonunu teşvik ederek anjiyogenezi destekleyen büyüme faktörlerini ve inflamatuvar sitokinleri salgılar(82).

Antijen sunan hücreler olarak da bilinen dendritik hücreler, hem edinsel hem de doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini başlatmak ve modüle etmekle görevlidir(85). Dendritik hücre aktivitesi sıklıkla kanserde düzensizdir. Bu da olgun dendritik hücre sayılarında azalmaya, anormal olgunlaşmaya (tolere edici ve immünoşüpresif yeteneklere sahip artan olgunlaşmamış dendritik hücre sayısı) ve bastırılmış farklılaşmaya yol açar(81).

Miyeloid türevi baskılayıcı hücreler, miyeloid progenitör hücreler, olgunlaşmamış makrofajlar, olgunlaşmamış granülositler ve olgunlaşmamış dendritik hücrelerden oluşan hücre popülasyonudur. Bu hücreler tümör oluşumu sırasında genişler ve çeşitli T hücresi yanıtlarını baskılar. Aynı zamanda aktif olarak tümör bölgesine göç edebilir, burada hızla tümörle ilişkili makrofajlara dönüşürler. Tümörle ilişkili makrofajlarla birlikte anjiyogenezi desteklemek için VEGF kaybını telafi eden faktörleri salgılayarak anti-VEGF tedavisine direnç gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca siklofosamid, antrasiklin ve sunitinib gibi bazı anti-kanser ilaçlarına karşı dayanıklılıkta kritik bir rol oynamaktadır(79).

Nötrofiller, insan kanında en bol bulunan granülositik popülasyondur. Genellikle deneysel ve insan kanserlerinde hematopoietik hücre infiltratının önemli bir kısmını oluşturur(82). Nötrofiller enfeksiyona karşı ilk savunma hattı olarak çalışır ve kansere bağlı inflamasyon da dahil olmak üzere çeşitli inflamasyonlara yanıt verir. Çok sayıda inatçı hücre ve aracıdan oluşan tümör mikro çevresinde,

tümörle ilişkili nötrofiller plastisite gösterir. Nötrofiller ayrıca anti-tümör bağışıklığı engelleyen için mitokondriyal DNA olarak aktive edilir(85).

Doğal katil hücreleri en iyi şekilde, interferon γ üretimi ve kanser hücrelerinde doğrudan sitotoksikite dahil güçlü anti-tümör aktiviteleri ile karakterize edilir(85). Her ne kadar doğal katil hücreler uterus vaskülatüründe önemli proanjyogenik rollere sahip olsa da, tümör anjiyogenezine katılımları daha az anlaşılmıştır(82). Tümör dokularında tümör infiltre edici ve tümörle ilişkili doğal katil hücreler olarak adlandırılan alt popülasyon tanımlanmıştır. Bu alt popülasyonlar, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve stromal türevli faktör-1 (SDF-1) gibi artmış pro-anjiyogenik faktör seviyeleri de dahil olmak üzere değişmiş sitokin ekspresyonu sergiler. Bu da sürekli anjiyogenez ve tümör ilerlemesine yol açar(81).

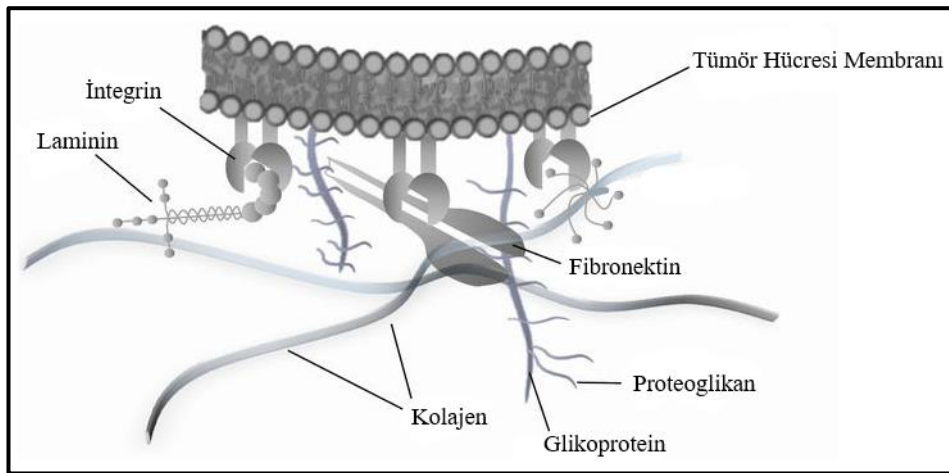
Mast hücreleri, doku anjiyogenezinde olduğu uzun süredir bilinen dokuda yerleşik bulunan granülositlerdir. Mast hücreleri, MMP-9 (matriks metalloproteinaz 9) dahil olmak üzere MMP'lerle birlikte FGF-2, VEGFA ve TNF gibi pro-anjiyogenik faktörleri serbest bırakır. Ayrıca pro-MMP'leri aktive eden spesifik proteazlar (kimaz ve triptaz) üretir(82).

Lenfositler, antijene spesifik bağışıklık cevaplarını gerçekleştiren hücrelerdir. Miyeloid hücre aktivasyonunu modüle ederek, B ve T hücreleri dolaylı olarak tümör anjiyogenezini kontrol edebilir. Ayrıca, bazı lenfosit türevli sitokinler, tümörlerde endotel hücre biyolojisini doğrudan etkiler. B hücreleri, VEGFA, FGF-2 ve MMP-9 dahil olmak üzere çeşitli pro-anjiyogenik araçları ifade ederek tümörlerde anjiyogenezini kolaylaştırabilir. Ayrıca, immünoglobulin G (IgG) ve polarize makrofajlar yoluyla dolaylı olarak tümör anjiyogenezini uyarabilirler(82).

Kanser ilerlemesi ve trombositoz (artan trombosit sayısı) arasındaki bağlantı iyi kurulmuştur. Aktifleştirilmiş trombositler, VEGFA, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF'ler) ve FGF-2 dahil olmak üzere zengin bir pro-anjiyogenik faktör kaynağıdır. Tümörlerde, trombositler, kolajen ve kanser hücreleri ile temas ederek vasküler hiper geçirgen ve plazma kaçağı bölgelerinde aktive edilir(82).

4.6.5. Ekstrasellüler matriks

Normal doku ile karşılaştırıldığında tümör mikro çevresi, tüm hücre tipleri tarafından üretilen değiştirilmiş bir ECM ile ilişkilidir. Bu da sadece tümör hücrelerinin istila etme yeteneğinde önemli bir rol oynamayıp karmaşık bir ağa neden olur ve metastaz meydana gelir. Aynı zamanda ilaç tedavisine duyarlılığı da etkiler(79). ECM, kanser hücresi büyümesi için yapısal destek, biyokimyasal ve biyomekanik ipuçları sağlayan karmaşık lifli proteinler, glikozaminoglikanlar ve matriküler proteinler ağıdır (Şekil 4.6.5.1). Hem vasküler hem de interstisyel ECM'nin kompozisyonu, topografisi ve ligand yoğunluğu tümörlerde değişir. ECM hem pro-anjiyojenik hem de vasküler ağı düzenleyici rollere sahip olabilir. Ekstrasellüler matriks, MMP, VEGFA, FGF, PDGFB ve TGF- β gibi çeşitli proanjiyojenik büyüme faktörleri için bir depo görevi görür(82). ECM'nin her bileşeni kanser ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Bunlar arasında kollajen öne çıkmaktadır. Kollajenin sentezi kanser hücreleri, mutasyona uğramış genler, sinyal yolları / reseptörleri ve transkripsiyon faktörleri ile düzenlenebilmektedir. Kollajen integrinler, tirozin kinaz reseptörleri, disidin alan reseptörleri ve bazı sinyal yollarından tümör hücresi davranışını etkilemektedir. Ayrıca, fibronektin, laminin, hyaluronik asit ve MMP'ler dahil olmak üzere ECM molekülleri ile kolajen etkileşimi kanser hücresi aktivitesini etkilemektedir. Kolajen açısından zengin tümörlerde yaygın olan hipoksi, kanserin ilerlemesini desteklemektedir(86).



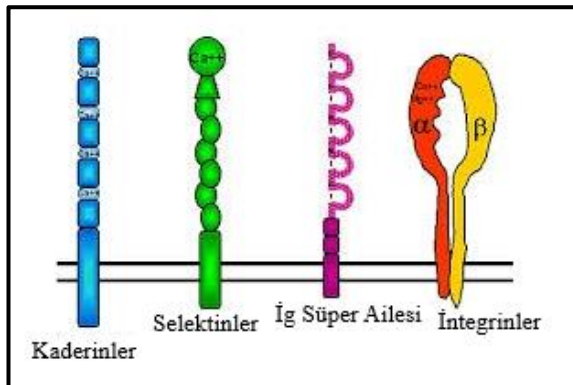
Şekil 4.6.5.1 Tümör mikro çevresini oluşturan ECM elemanları(87).

4.7. Adezyon Molekülleri

Doğada hücreler, hücre yapışma molekülleri aracılığıyla kendilerini çevreleyen hücrelere ve/veya hücre dışı matrikse yapışırlar. Adezyon moleküllerinin rolü sadece hücreler ve çevreleri arasındaki fiziksel bağlantıyı değil, aynı zamanda çeşitli hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu da içerir. Hücre adezyonu embriyonik gelişim, tümör oluşumu, yara iyileşmesi sinyal iletimi, hücreler arası iletişim ve tanıma, enflamatuar bağışıklık tepkileri, apoptoz ve epitelin yapısal bütünlüğünün korunması gibi birçok önemli fizyolojik süreci düzenler(88, 89). Tüm bunlar fonksiyonel dokuların oluşturulmasında adezyon molekülleri aracılı hücre yapışmasının önemini vurgulamaktadır(89). Hücre adezyon molekülleri çoğunlukla normal epitel, endotel ve farklı bağışıklık hücreleri tarafından geniş ölçüde ekspres edilen transmembran reseptör proteinleridir. Bu proteinler üç farklı ortamda; hücre içi alan, zar ötesi alan ve hücre dışı alanda bulunabilir. Hücre içi alan, hücre iskeleti ile doğrudan veya iskele proteinleri aracılığıyla etkileşir ve sinyalleşmeden sorumludur. Hücre dışı alan ise diğer hücre adezyon molekülleri veya hücre dışı matriks ile etkileşime girer. Bu nedenle adezyon molekülleri hücre içi yanıtları, hücre-iskelet organizasyonunu, hücre içi sinyalleri ve gen ekspresyonunu etkilemektedir(90). Biyofiziksel açıdan bakıldığında yapışkan bağlar, kuvvet uygulayabilen dinamik ve mekanik varlıkları temsil eder. Bu bağlara kuvvet uygulanması ayrılmalarına neden olabilir; dolayısıyla yapışma dinamik ve geri dönüşümlü bir işlemdir. Kas hücreleri, cildin epitel hücreleri, akciğer ve bağırsakların mukozal yüzeyleri arasında olduğu gibi bazı yapışkan etkileşimler uzun ömürlüdür. Burada sağlam bir bariyerin kurulması dokunun patojenik mikroorganizmalardan ve çevresel toksinlerden korunabilmesi için kritik olmaktadır. Bu nedenle adezyon moleküllerinde gelişim, organogenez, endotelial ve epitelyal yüzeylerin bütünlüğünün korunması ve konakçı savunması gibi homeostatik süreçler çeşitli temel biyolojik olaylar için önemlidir. Bu geniş kapsamlı fonksiyonlar göz önüne alındığında, adezyon moleküllerinin yapısını ve fonksiyonunu değiştiren genetik mutasyonların immün yetmezlik, şiddetli kanama ve kanser gibi hastalık durumlarına yol açması şaşırtıcı değildir. Terapötik açıdan bakıldığında, adezyon molekülleri inflammatuar ve bağışıklık hastalıkları tedavi etmek ve yeni yaklaşımlar için çekici hedeflerdir(91).

Bugüne kadarki kanıtlar, adezyon moleküllerinin çeşitli insan malignitelerinde invazyon ve metastaz ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, bazı virüsler adhezyon moleküllerini kendi spesifik reseptörü olarak kullanır. Adezyon moleküllerinin bu kadar çeşitli işlevi, kanser tedavisi için onları değerli hedefler haline getirmektedir(88). Hem hücre-hücre hem de hücre-matriks yapışmasında ki değişiklikler, kanser hücrelerinin daha hareketli hale gelmesine, hücre dışı matriksin (ECM) bozulmasına, kanser hücrelerinin dolaşımında hayatta kalmasına ve uzak metastatik bölgelerin kolonize edilmesine izin vererek, çok aşamalı kanser ilerlemesinin meydana gelmesine sebep olur(92). Bu nedenle kanser hücrelerinde homotipik hücre yapışmasına aracılık eden baskın molekülün ve bu hücrelerdeki yapışma varyantlarının kaybının belirlenmesi, insan kanserlerinde hücre yapışmasını ve hücre yayılımını incelemek için hayati önem taşımaktadır(93).

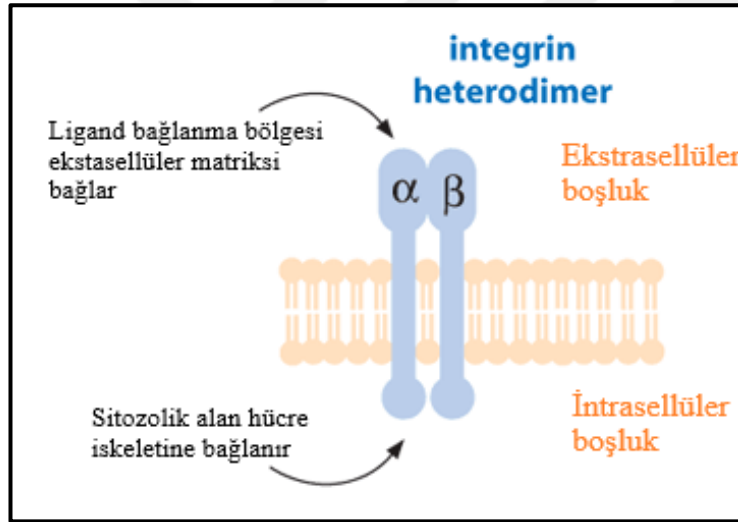
Çok hücreli dokuların oluşumu, organizasyonu ve bakımına büyük ölçüde hücre adezyon molekülleri aracılık eder. Bu moleküller sadece fiziksel uyum için gerekli olan yapışma gücünü sağlamaz, aksine dokuya özgü paterni çözmek için gereken hücre-hücre algılamasını mümkün kılar. Hücre adezyonundaki değişiklikleri başlatan uyarılar, mekanik bozulmadan genişleme faktörü uyarımına ve içsel aktiviteye (hücre bölünmesi veya apoptoz gibi) kadar değişirken, yapışkan etkileşimlerin oluşumuna ve ayrılmasına izin veren temel dinamikler korunur. Hem hücre-hücre hem de hücre-matriks adezyonları bu tür dinamiklere tabidir. Her hücrenin adezyonu dört ana adezyon molekülü ailesinin üyeleri tarafından gerçekleştirilir; kaderinler, immünoglobulin süper familyası (IgSF), selektinler ve integrinler(88, 94, 95) (Şekil 4.7.1).



Şekil 4.7.1 Dört ana adezyon molekülü ailesi(96).

4.7.1. İntegrinler

İntegrin reseptörleri, kovalent olarak ilişkili olmayan alfa ve beta alt birimlerinden oluşan kalsiyum bağımlı heterodimerlerdir(94)(Şekil 4.7.1.1). İntegrinler, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmasını arttıran transmembran reseptörlerini temsil eder. “İntegrin” kelimesi ECM ve hücre iskeleti arasındaki çapraz bağların bütünlüğünün bakımdaki rolünden kaynaklanmaktadır(97). İntegrin ailesi moleküllerinin üyeleri, hücre dışı matriksi (ECM) ve hücre iskeletini birbirine bağlar. Bu aile çift yönlü sinyalleşme yeteneğine sahiptir. Bu da sadece içten dışa sinyalleşme yoluyla yapışma ve göçün fiziksel mekaniği üzerinde değil, aynı zamanda hücre polarite, hücre iskelet yapısı ve dıştan sinyalleşme ile hayatta kalma üzerinde kontrol sağlar(94).



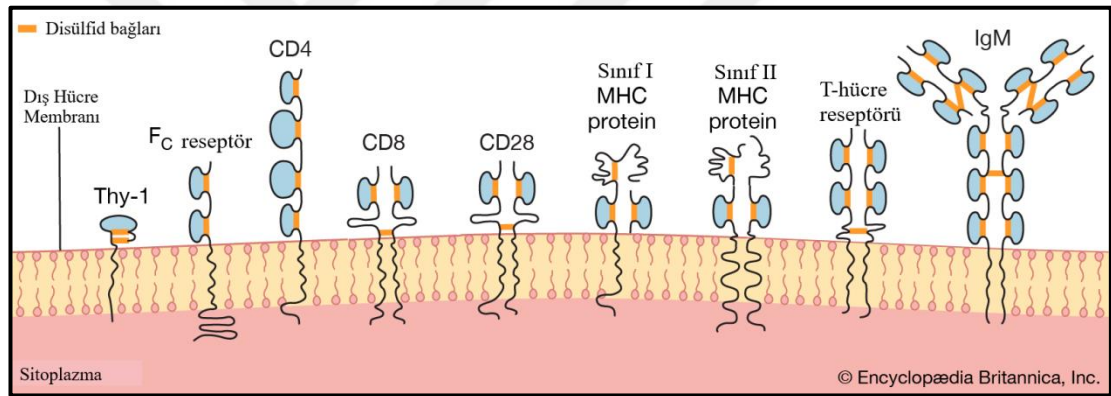
Şekil 4.7.1.1 İntegrin reseptörlerinin α ve β alt birimlerinden oluşan heterodimer yapısı(98).

İntegrinler, dokularda yerleşik hücreler (fibroblastlar, kas hücreleri, endotel hücreleri ve epitel hücreleri) ve nötrofiller, lenfositler, monositler, makrofajlar ve trombositler gibi hematopoietik kökenli hücreler üzerinde eksprese edilir. İntegrinler, ECM için reseptörler olarak işlev gören ve böylece hücre dışı ortamdaki değişiklikleri veya sinyalleri (biyokimyasal veya biyofiziksel) algılayan ve bu bilgiyi hücrenin içine ileten birincil moleküllerdir. İntegrinler, epitelyal, endotelyal ve kas

hücrelerini, bazal membranda bulunan laminin, kollajen ve fibronektin gibi ECM proteinlerine bağlamak için çalışır. Böylece matrikse kuvvet ileten ve potansiyel olarak zararlı dış kuvvetlere karşı koyan fiziksel ekler sağlar(91).

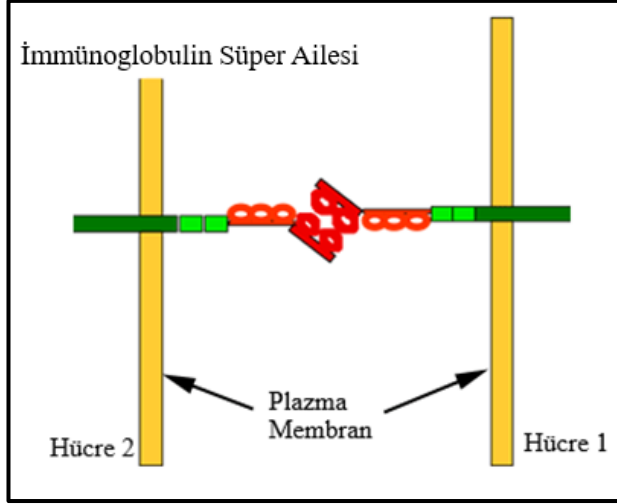
4.7.2. İmmüoglobulin süper ailesi (IgSF)

İmmüoglobülin süper ailesi proteinleri, Ig benzeri alanlar yoluyla kalsiyum bağımsız hücre-hücre yapışmasına aracılık eder ve hem homofilik hem de heterofilik ligandları tanır. Bu etkileşimler kaderin veya integrin aracılı yapışma kadar güçlü değildir. Ancak IgSF üyelerinin, doku oluşumu ve bakımı sırasında bu yapışkan etkileşimlerin ince ayarına, güçlendirilmesine ve düzenlenmesine daha fazla katkıda bulunduğu görülmektedir(94).



Şekil 4.7.2.1 Çeşitli hücrelerde eksprese edilen immüoglobulin süper ailesi üyeleri(99).

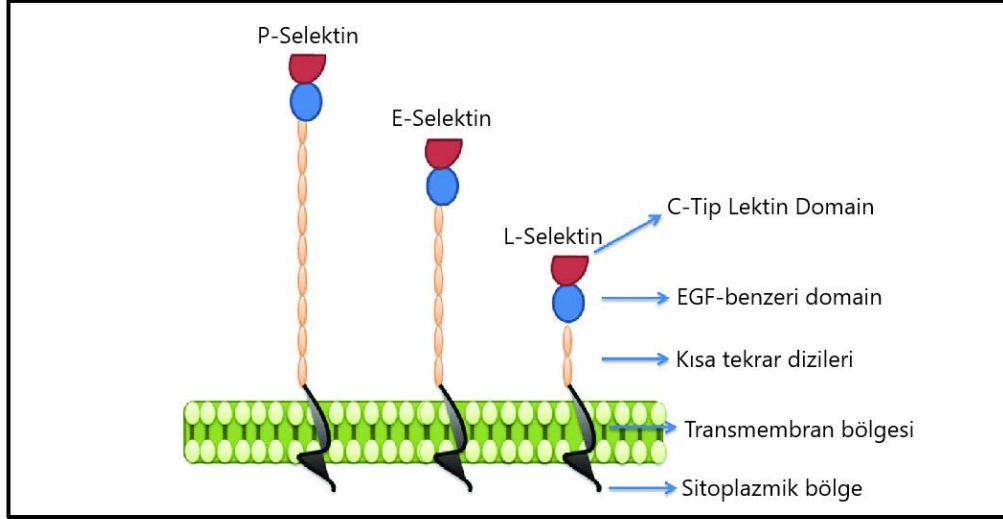
Adezyon moleküllerinin immüoglobulin süper familyası, endotel hücreleri, CD2, CD4 ve CD8 gibi T-lenfositler tarafından eksprese edilen yüzlerce adezyon molekülünü içerir (Şekil 4.7.2.1). İmmüoglobülin süper ailesi adezyon molekülleri, bir immüoglobulin alanı gibi katlanmış bir ila yedi hücre dışı alandan, molekülü plazma membranına tutturarak tek bir transmembran sarmalından ve hücre içi sinyalleşmeye katılabilecek bir sitoplazmik alandan oluşur(91)(Şekil 4.7.2.2).



Şekil 4.7.2.2 Hücreler arasında bulunan immünoglobulin süper ailesi adezyon molekülü(100).

4.7.3. Selektinler

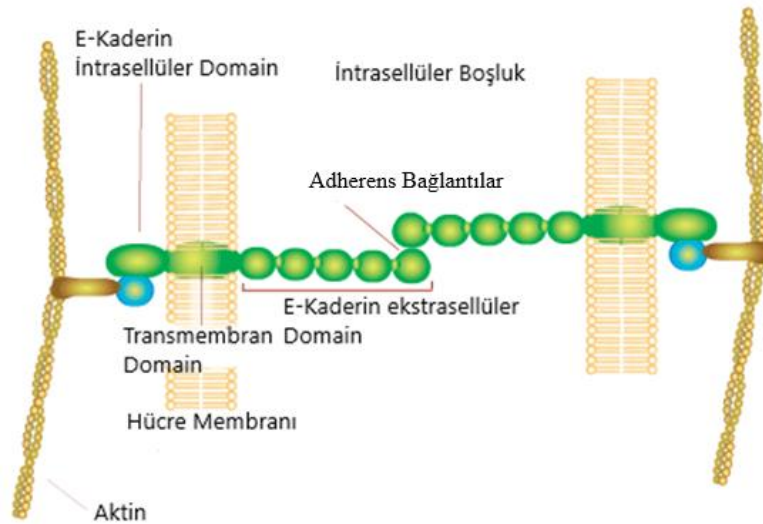
Selektin ailesinin üyeleri, bir N-terminal kalsiyum-bağımlı lektin tipi domain, bir EGF-benzeri domain ve tamamlayıcı-bağlanma dizilerine homolog değişken sayıda kısa tekrardan oluşur (Şekil 4.7.3.1). Bu adezyon molekülü ailesi, iltihaplanma sırasında lökosit göçündeki rolleri ile ünlüdür. Lökositler üzerindeki selinler ve bunların aktifleştirilmiş endotelial hücreler üzerindeki ligandları arasındaki tersinir etkileşimler, integrinlerin aktive edilmesi durumunda sıkı hücre yapışmasını güçlendiren lökosit bağlanmasını kolaylaştırır. Bu, yapısal ve işlevsel olarak farklı ailelerden gelen adezyon moleklleri arasındaki moleküler sinerjinin temsili bir örneğidir(94). Selektinler, komşu hücrelerin yüzeylerindeki spesifik karbonhidrat (şeker) parçalarına bağlanan bir adezyon molekülü ailesini temsil eder. Selektin ailesi, lökositler üzerinde eksprese edilen L-selektin (CD62L), endotelial hücreler üzerinde eksprese edilen E-selektin (CD62E) ve hem endotelial hücreler hem de trombositler tarafından eksprese edilen P-selektin (CD62P) içerir(91)(Şekil 4.7.3.1).



Şekil 4.7.3.1 E-, P-, L-Selektin ve bölgeleri(101).

4.7.4. Kaderinler

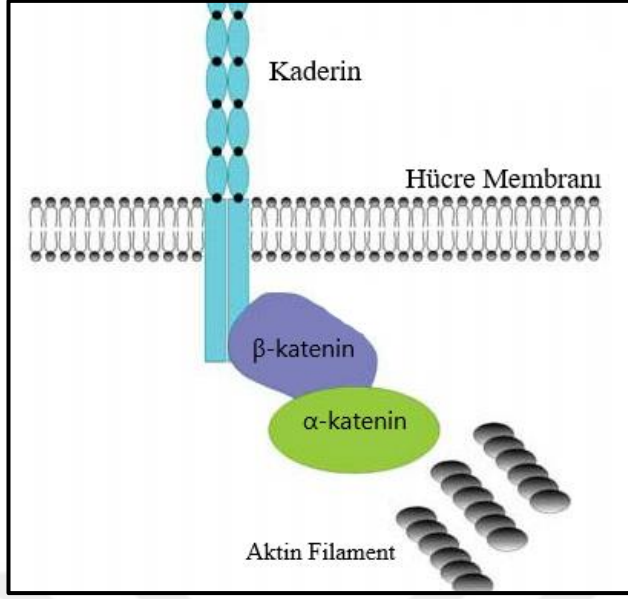
Kaderin ailesinin üyeleri, değişken sayıda kaderin benzeri alan aracılığıyla bitişik hücreler arasında nispeten güçlü, kalsiyuma bağlı, homotipik yapışıklıklar oluşturur. Bu proteinler organogenez ve doku organizasyonunu korumak için çok önemli olan mekanik kohezyonun yanı sıra hücre-hücre tanınmasını da kolaylaştırır(94, 97)(Şekil 4.7.4.1).



Şekil 4.7.4.1 Hücre membranı üzerinde kaderin adezyon moleküllerinin organizasyonu(102).

Kaderinler, E-, N-, P-, T- ve VE-kaderinler(97), protokaderinler, yedi-transmembran kaderin ve FAT ailesi kaderin dahil olmak üzere 80'den fazla kalsiyuma bağlı adezyon molekülü ailesini temsil etmektedir. Kaderin molekülleri, sandviç benzeri bir yapıya katlanmış yaklaşık 100 amino asit kalıntısından oluşan beş veya daha fazla hücre dışı alandan oluşur. Çeşitli kaderin ekspresyonları hücreSEL özgüllük gösterir. Örneğin, epitel hücreleri E-kaderin ifade ederken vasküler endotelial hücreler VE-kaderin ifade eder. Kaderinler, komşu hücreler üzerindeki aynı (homofilik) veya farklı (heterofilik) sınıf kaderin moleküllerine bağlanabilir. Böylece hücreleri birleştirmeye yarayan özel kavşaklarda aderens bağlar ve desmozomlar olarak adlandırılan özel kavşaklarda güçlü hücreler arası bağlar oluşturabilirler. Kaderinler doku bütünlüğünün korunması, hücre-hücre tanıma, sinyal verme, hücreler arası iletişim, gelişim ve anjiyogenez ile ilişkilidir. Embriyogenez sırasında, hücre tipine özgü kaderinler benzer hücre tiplerinin bağlanmasını ve toplanmasını yönlendirir, böylece organ oluşumunu destekler. Kaderinlerin sitoplazmik alanlara, hücre iskeletinin bileşenlerine, özellikle aktin filamanlarına veya ara filamanlara bağlanır. Böylece hücreler arası kavşakları büyük ölçüde güçlendirir(91).

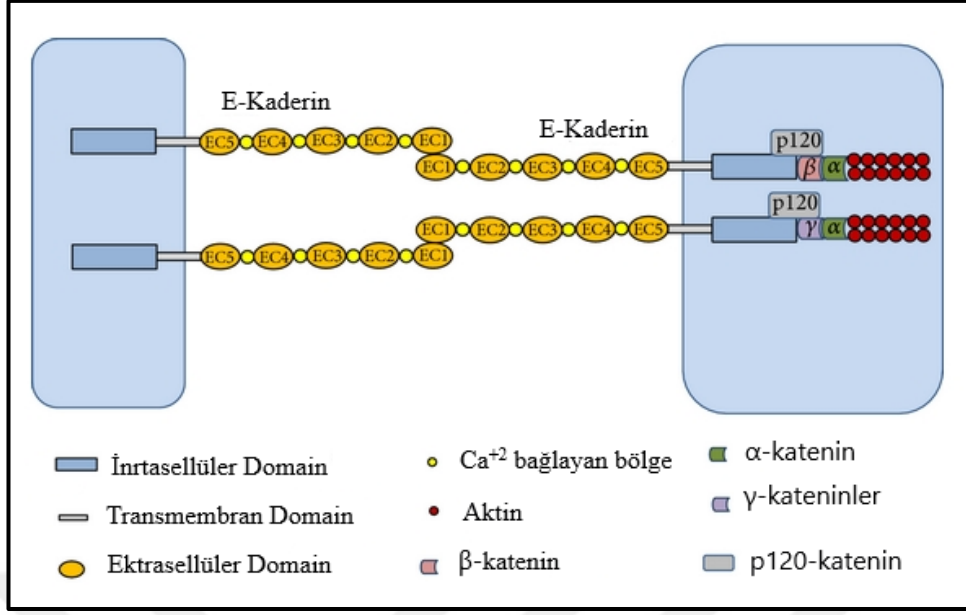
Kaderinler, kendilerini aktin mikrofilamentlerine bağlayan, hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen, sinyal transdüksiyon mekanizmalarına aracılık eden katenin adı verilen bir grup hücre içi protein ile birleşir. α -, β -, γ -katenin olmak üzere üç çeşit katenin tanımlanmıştır. β -katenin ve γ -kateninler, α -katenin ile bir kompleks oluşturarak kaderin moleküllerinin sitoplazmik karboksi-terminal bölgelerine bağlanırlar (Şekil 4.7.4.2). Kateninlerin kaderinlere bağlanması, sağlam yapışma komplekslerinin işlevinde önemli bir adımdır. Katenin moleküllerindeki değişiklikler, hücre-hücre yapışmasının bozulmasına neden olarak neoplastik hastalıkta tümör agresifliği ve invazivliğine yol açabilir. Kaderin genleri tümör baskılayıcı genler olarak kabul edilir. Ekspresyon ve fonksiyonlarındaki kusurlar tümör ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Tümör hücrelerinde kaderin ekspresyonunun, örneğin tümörlerin benzer fenotip ancak farklı histogenezleri arasında ayırıcı tanısal belirteçler olarak kullanılabilmesi ve tümörlerin histolojik kökenini izlemeye yarayabileceği belirtilmiştir(88).



Şekil 4.7.4.2 Kaderinlerin yapışmasına aracılık eden β -katenin ve α -katenin molekülleri(103).

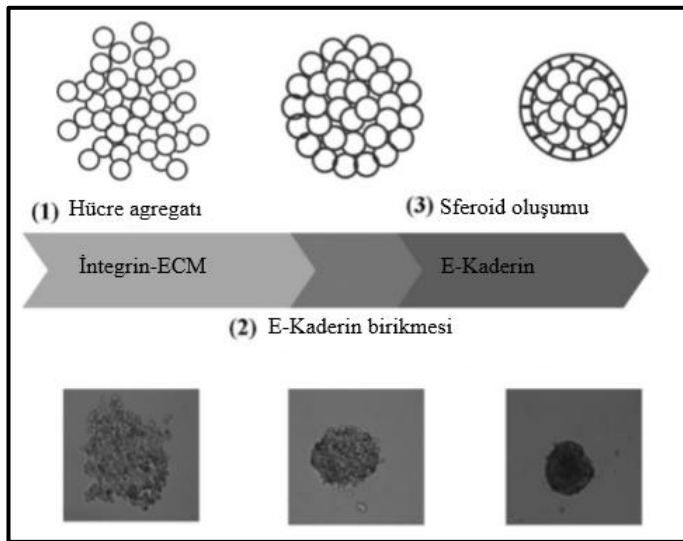
4.7.4.1. E-Kaderin

Tip I klasik bir kaderin olan epitelyal kaderin, epitelyal dokularda adherens bağlantılarının oluşumunda anahtar bir bileşendir (Şekil 4.7.4.1.1). Yıllar boyunca çok sayıda veri, E-kaderin' in kanserde tümör invazyon baskılayıcı rolü olduğunu belgelemiştir. E-kaderin ekspresyonu epitelioid ve iyi diferansiye fenotip, düşük invaziv kapasite ve fonksiyonel hücre-hücre birleşimlerini indükler. Bununla birlikte, bu proteinin azalması veya işlev kaybı, mezenkimal ve daha az farklılaşmış bir fenotipe, hücre göçünün artmasına, komşu dokuların invazyonuna ve nihayetinde metastaza yol açar. Meme kanserinde E-kaderin kaybı lobüler karsinomların ayırt edici özelliğidir(92).



Şekil 4.7.4.1.1 E-kaderin adezyon moleküllerinin yapısı(104).

Diferansiyel E-kaderin ekspresyon seviyeleri, baş ve boyun karsinomu hücre hatlarında değişen sferoid oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca hepatosellüler karsinom hücre hatlarında ve renal hücre karsinomunda kompakt sferoid oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (Şekil 4.7.4.1.2). *In vivo* olarak, değiştirilmiş E-kaderin ekspresyonu, epitelyaldan mezenkimal geçiş sırasında kanser gelişimini ve E-kaderin kaybını baskılar, artan hareketlilik tümör ilerlemesi ve metastaz ile ilişkilidir(93).



Şekil 4.7.4.1.2 Sferoid oluşumunda E-kaderinlerin rolü(3).

4.7.4.1.1. Kateninler

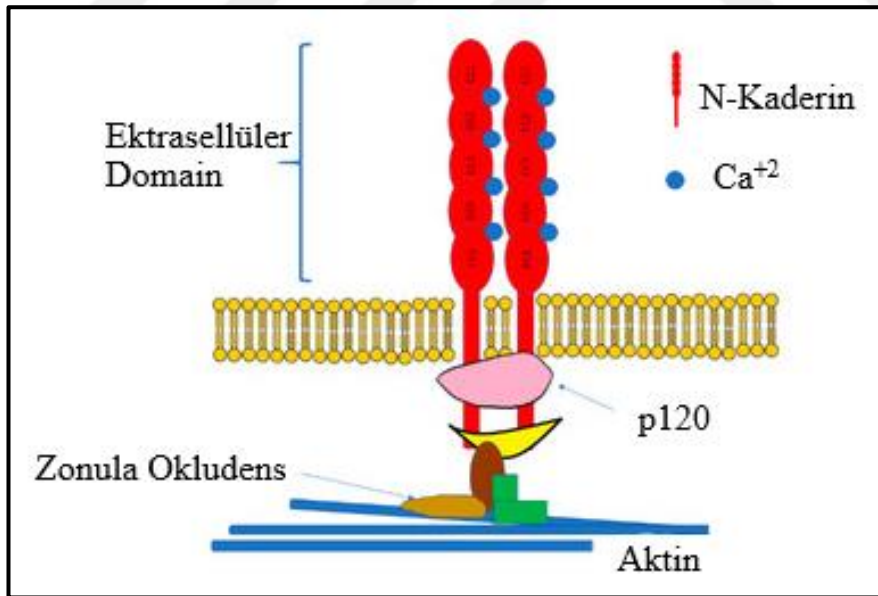
E-kaderin dahil olmak üzere kaderinler, kendilerini hücre iskeletinin mikrofilamentleri ile birleştirmek için hareket eden α -katenin (102 kDa) ve β -katenin (95 kDa) dahil olmak üzere bir grup katenin ile ilişkilidir. α -katenin adherens bağlantı ve fokal temasta lokalize olan vinkuline homologdur. Takuyama ve ark. E-kaderinin aracılık ettiği kanserlerde adezyon sisteminin α -katenin ekspresyonunun azalmasından etkilendiğini ayrıca α -kateninin kanser hücrelerinin invaziv veya metastatik davranışını etkileyebileceğini önermişlerdir(105).

β -Katenin, normal epitel hücrelerinde çoğunlukla adherens bağlantılarında E-kaderin sitoplazmik uzantısına bağlı olan, hücre iskeletiyle ilişkili bir proteini kodlayan protoonkogendir(106). β -katenin geni kromozom 3p21'de lokalizedir ve ürünü 92-kDa bir proteindir. Protein başlangıçta Ca^{2+} bağlı transmembran yapışma moleküllerinin (kaderin) etkileşimine aracılık eden sitoplazmik bir protein olarak tanımlanmıştır. E-kaderin sitoplazmik alanı olan kateninin, hücre-hücre birleşiminin yapışkan özelliklerinde önemli bir rol oynadığı ve böylece epitel hücrelerinin normal fenotipinin korunmasını sağladığı gösterilmiştir. Kaderin-katenin kompleksinin yapışkan özelliklerinin kaybının, insan karsinomlarının patojenleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(107). β -katenin, Wnt yolu dahil olmak üzere birçok sinyal iletim yolunda önemli bir ara maddedir. Plazma zarında hücre-hücre yapışmasının kritik bir düzenleyicisi olan E-kaderin ile etkileşir ve hücre polaritesinin korunmasından sorumludur. Anormal Wnt sinyalinden veya β -katenin geninin mutasyonundan kaynaklanan β -katenin birikimi meme kanserine yol açar. Nükleer β -katenin ayrıca pro-invaziv proteinlerin ekspresyonunu da düzenler. Bu nedenle, β -katenin'in hücre altı dağılımı, tümör hücrelerinin fenotipini ve davranışını önemli ölçüde etkiler(108). Zhou ve ark. daha önce β -katenin ablasyonunun dermal fibroblastları deaktive ettiğini, hücre büyümesini bastırdığını ve ECM proteinlerinin yanı sıra parakrin faktörlerinin üretimini azalttığını bildirmişlerdir(109). Moleküler düzeyde, β -katenin görünüşte bağımsız iki işlemde yer alır, hücre-hücre yapışması ve sinyal iletimi, β -katenin transkripsiyon aktivasyon yolunda rol oynar. Daha önce Lee ve diğerleri oral kanserde anormal β -katenin ekspresyonunun yaygın olduğunu, bu değişikliğin malignite indeksi ve hasta prognozu ile korele olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, oral kanserde β -katenin ekspresyonuna yol açan moleküler mekanizmalar

belirsizdir. β -kateninin hedef genlerin aktivasyonunu teşvik ettiği mekanizmalar iyi anlaşılammıştır. Örneğin endometriyal kanserlerde, 20 vakanın 12'sinde (% 60) çekirdekte β -katenin birikimi görülmüştür, Ancak bu vakaların sadece ikisinde β -katenin geninde mutasyonlar görülmüştür(110).

4.7.4.2. N-Kaderin

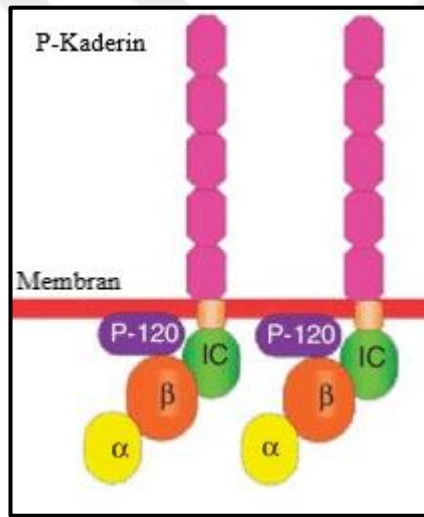
N-Kaderin, nöroektoderm ve mezoderm kökenli dokularda eksprese edilir. Yüksek invaziv meme tümörlerinde, N-kaderinin hücre-hücre temaslarında E-kaderin' in yerini aldığı gösterilmiştir. N-kaderinin, meme stromal hücreleri ile karsinom hücre etkileşimine aracılık ettiği ileri sürülmüştür. Bu kaderin molekülünün, meme stroma yoluyla karsinom hücre göçünü kolaylaştırarak ve metastazda homofilik hücre-hücre yapışmasını yeniden sağlayarak meme kanseri metastazının teşvik edilmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür(88)(Şekil 4.7.4.2.1).



Şekil 4.7.4.2.1 N-kaderinin hücre membranı üzerindeki yapısı(111).

4.7.4.3. P-Kaderin

P-kaderin fare plasentasında, akciğer epitelinde, cildin bazal hücrelerinde ve meme bezinin miyoepitelyal hücrelerinde bulunur. P-kaderinin epitelyal dokularda ekspresyonu proliferatif potansiyeli olan hücre popülasyonlarının karakteristiğidir ve hücreler farklılaştıkça ekspresyonu azalır(88). P-kaderin (veya plasental kaderin), ekspresyonu normal yetişkin epitel dokularında ve zayıf diferansiye karsinomlarda yüksek oranda farklılaşmış hücrelerle ilişkili olan CDH3 geni tarafından kodlanan klasik bir hücre-hücre yapışma molekülüdür. Meme kanserinde P-kaderin, invaziv karsinomların yaklaşık% 30-40'ında eksprese edilir ve bu hastalıkta kötü bir prognostik faktördür(92)(Şekil 4.7.4.3.1).

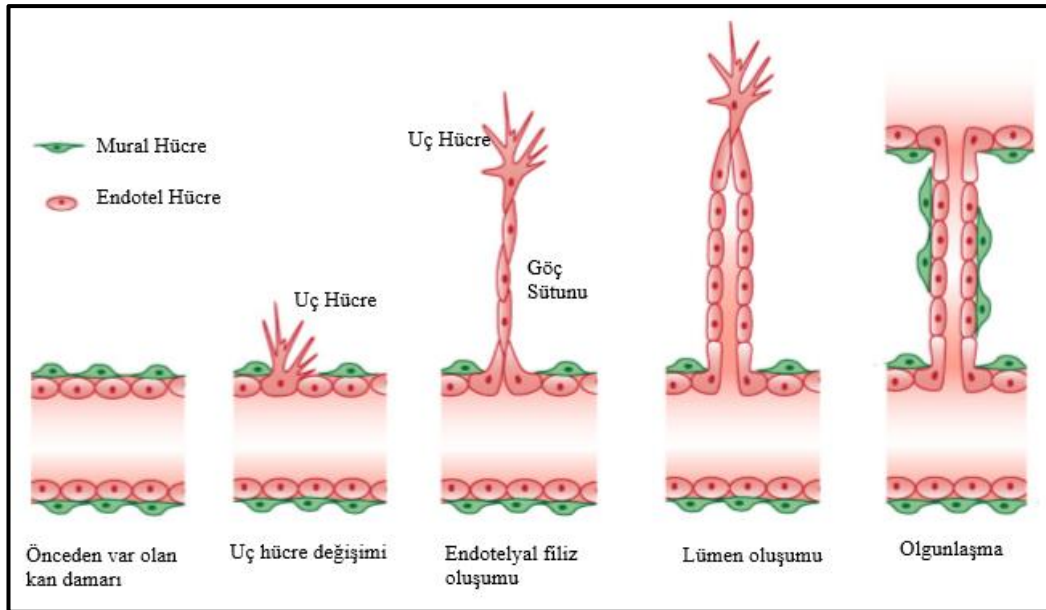


Şekil 4.7.4.3.1 P-Kaderinin hücre membranı üzerindeki yapısı(112).

4.8. Tümör Anjiyogenezi

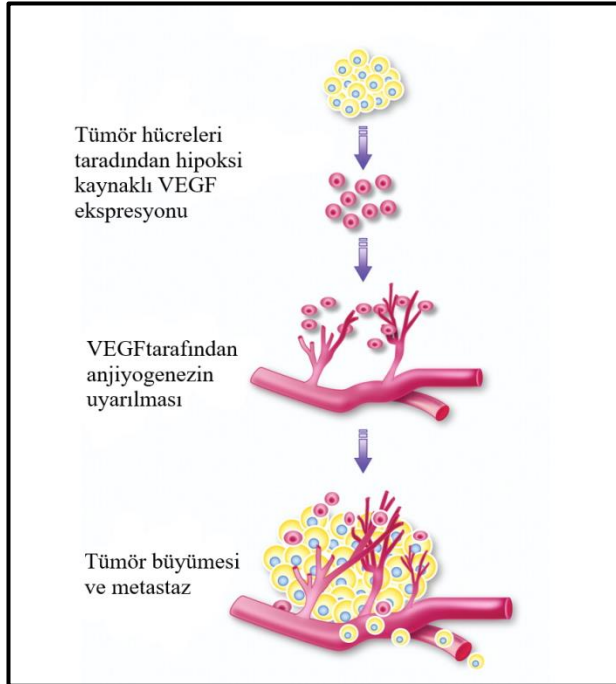
Anjiyogenez yeni kan damarlarının oluşum sürecidir. Endotel hücrelerinin çoğalmasını, migrasyonunu ve farklılaşmasını içerir(113). Fizyolojik anjiyogenez oldukça karmaşık bir süreçtir. Gelişmekte olan veya iyileşen dokulara yeterli besin ve oksijen temini için gerekli bir işlemdir. Endotelyal hücreler, çözünür büyüme faktörleri, proteolitik enzimler, adezyon molekülleri ve matriks proteinleri (ECM) gibi çeşitli bileşenlerin bir kombinasyonudur. Anjiyogenezin indüksiyonu pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengeye dayanır(114). Bu

faktörler dinamik bir homeostaz altındadır. Bu homeostaz bozulduğunda anjiyogenez süreci başlar. Genetik mutasyonlar (onkogenlerin aktivasyonu veya anjiyogenez regülatörlerinin üretimini kontrol eden tümör baskılayıcı genlerin kaybı), metabolik stres (hipoksi, düşük pH veya hipoglisemi) gibi çeşitli biyolojik aktiviteler bu süreci tetikler. Bunlar arasında hipoksi, tümör anjiyogenezini tetikleyen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve hipoksik hücrelerden diğer anjiyogenez uyarılarının ekspresyonunun artmasına neden olan birincil faktörlerden biridir. Eşzamanlı olarak, özellikle matriks metaloproteinazlar, hücre dışı matriksi bozarak tümör dokusunun mikro çevresindeki değişikliklere aracılık eder. Hipoksi, VEGF' in yukarı regülasyonunu indüklediğinde, vaskülatörün endotel hücrelerini filizlenmeye ve göç etmeye teşvik eden oksijen tedarikini sağlamak için ek aktivasyon ile anjiyogenez başlatılır(115)(Şekil 4.8.1). VEGF ile uyarılan endotel hücreleri, göç eden bir fenotipi sergilemeye başlar. Büyüyen kılcal damarların başında olan bu endotel hücreler, uç hücreler olarak adlandırılmıştır. Uç hücreler hareketli ve invazivdir. Büyüme faktörlerine, hücre dışı matrikse ve çeşitli uyarılara cevap verebilen çok sayıda filopodiyi uzatır. Fizyolojik anjiyogenik büyüme sırasında, endotel hücrelerin bir kısmı uç hücre fenotipine geçerek filizlenmeyi başlatırken, aşağıda bulunan endotel hücreler (sap hücreleri) çoğalır ve yeni ortaya çıkan damarların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunur(116).



Şekil 4.8.1 Anjiyogenez(117).

Tümör ilk aşamada hayatta kalmak ve çoğalmak için oksijen ve besinleri difüzyon yoluyla alır. Geliştiği ortam aşırı metabolik ürünlerin bir sonucu olarak hipoksiye ve asitleşmeye maruz kalmaktadır. Hacmi 1-2 mm³'ü aştığında, tümör anjiyogenik hale gelmeli ve büyümek için vaskülatörlerini kullanmalıdır. Kanser hücreleri, mikro çevresinde bulunan hücrelerle birlikte, çeşitli tümör anjiyogenez mekanizmalarını kullanarak kan damarlarının gelişimini uyarırlar (Şekil 4.8.2)(118). Klasik modelde, ana damarın vazodilatasyonu meydana gelir. Bu da bazal membranın kısmi degradasyonuna ve oradaki endotel hücrelerinin çıkmasına yol açar. Endotel hücreleri birbirleriyle hücre içi bağlantısını kaybetmediği ve paralel olarak göç ettikleri için hücrelerin polaritesi korunur. Aynı zamanda, yeni lümen polarize endotel hücreler tarafından oluşturulur. Perisitlerin göç ettiği bazal zarı yeniden oluşturan proteinleri serbest bırakırlar. Bu fenomen, kılcal damarları stabilize eder ve olgunlaşmasına katkıda bulunur. Yukarıda tarif edilen damar olgunlaşmasının son aşaması kanser anjiyogenez sırasında bozulur. VEGF uyarısına yanıt olarak yeni damarların filizlenmesinin yanı sıra, kan damarları ayrıca endotel hücrelere ayrıştırılmış kemik iliği hücrelerinden veya tümör kök hücrelerinden kaynaklanabilir. Tümör vaskülarizasyonunu indükleyebilen çok çeşitli moleküler yolaklar anti-anjiyogenik tedavileri etkisiz hale getirebilir(118).



Şekil 4.8.2 Tümör tarafından anjiyogenezin başlatılması(119).

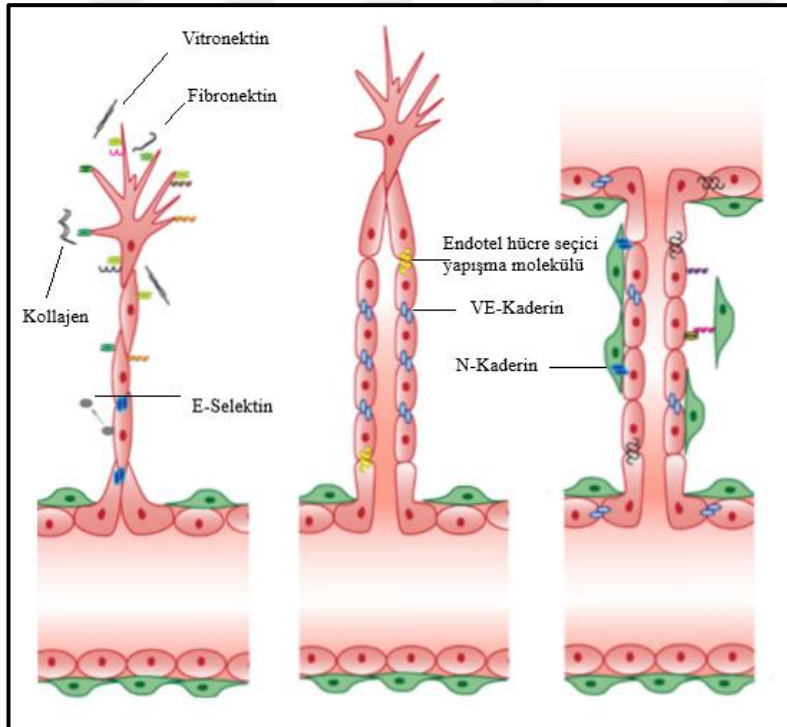
4.8.1. Anjiyogenezde adezyon moleküllerinin rolü

Kan damarlarının büyük çoğunluğu önceden var olan damarlardaki endotel hücrelerinin vasküler ağı genişletmek ve şekillendirmek için yeni dallar oluşturduğu anjiyogenik filizlenme ile oluşur. Aynı zamanda yeni bir vasküler dalı yönlendirmek ve uzatmak için komşu hücrelerin arasında bulunan bağlantıları sürdürmeleri gerekir. Yeni oluşan filizler, lümeni oluşturup genişletirken apikal-bazal polarite kurarak komşu damarlarla anastomoz yoluyla bağlantılar oluşturur. Bu süreç boyunca dinamik hücre-hücre birleşimleri aracılığıyla geçirgenlik bariyeri ve damar bütünlüğünü korunur. Hücreler katlanır, pozisyonları değişir ve çoğalırlar(120).

Tümör anjiyogenezi, endotel hücrelerinin reseptörlerine bağlanan spesifik büyüme faktörlerinin aktivasyonu ile başlar. Anjiyogenik faktörlere yanıt olarak endotel hücrelerin yapışma kapasitesindeki değişiklikler, anjiyogenik aşamaların kontrolünde çok önemlidir. Bu değişiklikler temel olarak hücre yapıştırma moleküllerinin çoğu sınıfının ekspresyonunun ve fonksiyonlarının dinamik regülasyonundan kaynaklanmaktadır(117).

Endotelyumda hücre-hücre yapışmasına vasküler endotelial kaderin bazı adherens bağlantılar, kludininler ve okludininlerden oluşan sıkı bağlantılar ve adezyon molekülleri aracılık eder(120). Heterodimerik yapışma moleküllerinin integrin ailesi, endotel hücrelerinin lümenal ve ablümenal yüzeyleri üzerinde eksprese edilir. Endotel hücre göçüne ve *in vitro* kapiller benzeri tüplerin oluşumuna katıldığı gösterilmiştir. *In vivo* olarak integrinlerin hem anjiyogenez hem de vaskülogenezde rol oynadığı gösterilmiştir. Integrinlerin yanı sıra, bir dizi başka hücre adezyon molekülünde anjiyogenezde işlev gördüğü ileri sürülmüştür(121). Kaderin ailesi üyeleri endotelial hücre bütünlüğü, büyümesi ve genel olarak vasküler gelişimde önemli bir rol oynarlar. Yapıştırıcı özelliklerinin yanı sıra hücre içi sinyalleri, karmaşık bir hücre iskeleti ve sinyal molekülleri ağı yoluyla aktararak hareket edebilirler. N-kaderinin endotelial hücrelerde bolca eksprese edildiği bilinmektedir ancak normal ve patolojik anjiyogenezdeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Son gözlemler, N-kaderinin endotelial hücreler, perisitler ve vasküler düz kas hücreleri gibi duvar hücreleriyle etkileşimlerinde önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir(117). VE-kaderin, vasküler gelişim boyunca eksprese edilir ve

hücre-hücre temas noktalarında lokalizedir. Bu gözlemler VE-kaderin moleküllerinin anjiyogenezde, endotelial hücre organizasyonunu veya olgun damarlara farklılaşmayı belirleyebildiğini düşündürmektedir. Bazı deneysel kanıtlar, selektin yapışma molekülleri ailesinin bir üyesi olan E-selektinin anjiyogeneze katıldığını ortaya koymaktadır. E-Selektin, lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasını teşvik etme kabiliyeti ile bilinen bir endotel membran glikoproteininde bulunur(121). İmmüoglobulin süper ailesinin üyeleri arasında birçok tümör hücresi tipinde bulunan immüoglobulin-1 ekspresyonu, yayılma paterni ve metastaz potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir. İmmüoglobulin-1, kanser damarları üzerinde pro-anjiyogenik faktörlerle yukarı regüle edilebilir. Bu nedenle bu molekülün tümör anjiyogenez süreçlerinde olası bir rol oynadığı söylenmektedir. Endotel hücre seçici yapışma molekülü, yakın zamanda tanımlanmış vasküler endotel hücrelerle sınırlı bir ekspresyon paterni olan immüoglobulin süper ailesinin bir üyesidir. Homofilik, kalsiyumdan bağımsız hücre-hücre etkileşimlerinde yer alır, bu da vasküler bütünlüğün korunmasında veya damar oluşumunda spesifik bir rol aldığını düşündürmektedir(117) (Şekil 4.8.1.1).



Şekil 4.8.1.1 Adezyon moleküllerinin anjiyogenezde rolü(117).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereç

Bu tez çalışması İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilim ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü (SABITA)'nde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi "Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" onayı ile yapılmıştır. (Etik kurul onay numarası: 10840098-604.01.01E.33218).

5.1.1. Deneyleerde kullanılan materyaller

Bu tez çalışmasında insan endometriyum kanseri hücre hattı olan Ishikawa ve insan umbilikal ven endotelial hücre hattı olan Huvec kullanılmıştır.

Tablo 5.1.1.1 Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemelerin Listesi

Ham's F-12K (Kaighn's) Medium	Gibco	GIBCO 21127022
MEM Alpha medium	Biosera	LM-E1149/500
MEM Non Essential Amino Acids	Biosera	XC-E1154/100
Antibiotic-Antimycotic Solution	Biosera	XC-A4110/100
Fetal Bovine Serum (FBS) (EU-approved) sterile-filtered	Biosera	FB-1001/500
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Calcium w/o Magnesium,w/o PHENOL RED	Biosera	LM-S2041/500
D-Phosphate Buffered Saline, with Ca and Mg	Biosera	LM-S2042/500
Trypsin-EDTA (0.25%), with phenol red	Biosera	LM-T1721/100

Agarose, Low-EEO/Multi-Purpose	Fisher Scientific	BP160-100
PFA	Sigma-Aldrich	P6148
E-Kaderin	Cell Signaling- Rabbit Monoclonal	24e10
β -Katenin	Cell Signaling- Rabbit Monoclonal	D10A8
Goat-Anti Rabbit Alexa Fluor 488	Abcam	ab150077
Donkey-Anti Rabbit Alexa Fluor 546	Invitrogen	A-11010
Dilution Buffer	Genetex	GTX30932
Normal Goat Serum	Sigma-Aldrich	G9023
Normal Donkey Serum	Abcam	ab7475
Dapi	Abcam	ab228549
Triton™ X-100	Sigma-aldrich	9002-93-1
Dapi with Fluoromount	Invitrogen	00-4959-52
Petri Dish	Nunc	150460
T25 ve T75 Flask	Nest	VWR-734-2311 / VWR-734-2313
15 ve 50 ml Falcon	Isolab	078.02.002/ 078.02.004
96 well plate	Nest	VWR-734-2327
Removable 8 well chamber	İbidi	80841
Cover slips	Paul Marienfeld	0107032
5, 10 ml Serolojik Pipet	Thermo Fisher Scientific	VWR-612-37027/ VWR-612-3700
Pipet Seti	Mettler Toledo	RAININ XLS
Serolojik Pipet Tabancası	Mettler Toledo	RAININ

Hemositometri	Marienfeld Neubauer-improved	0680030
Sınıf II Biyogüvenlik Kabini	Thermo Maxisafe 2020	51026651
İnkübatör	Thermo Scientific	Heracell 150i CO ₂ İncubator
Santrifüj	Thermo Scientific	SL16R
İnverted Mikroskop	Zeiss	Axio
Konfokal Mikroskop	Zeiss	LSM 800
-80°C Dondurucu	Thermo Scientific	Forma 88000
Mikrodalga		
-20 Buzdolabı		

5.2. Yöntem

5.2.1. Hücreler için gerekli besiyeri ortamlarının hazırlanması

Huvec hücreleri için; 15 mg EGF 5 ml DMEM F12K ile çözdürülür. 50 ml DMEM F12K besiyerine %10 FBS, %1 streptomisin/penisilin ve hazırlanmış olan EGF çözeltisinden %0,2 eklenir.

Ishikawa hücreleri için; 50 ml MEM besiyerine %10 FBS, %1 streptomisin/penisilin, %1 Glutamin, %1 esansiyel olmayan aminoasit eklenir.

5.2.2. Hücrelerin çözülmesi

-80°C veya sıvı nitrojende kriyo tüple bekletilen hücreler 37°C'de hızlıca çözdürülür. Daha sonra üzerine 1 ml besiyeri eklenerek 15'lik tüplere aktarılır. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Pelletin üzerine medium

eklenerek iki adet 25 cm² flask içine eklenmiş mediuma ekimi yapılır. 24-48 saat süreyle 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde büyümesi gözlenir.

5.2.3. Hücrelerin tripsinizasyonu, pasajlanması ve dondurulması

Hücreler ilk kez çözüldüğünde 25 cm² flaslara 5 ml besiyeri içerisine ekilir. Hücreler %70-80 konfluent olduklarında 75 cm² flaslara pasajlanarak 13 ml besiyeri içerisinde büyütülür. Hücrelerin besiyerleri üç dört günde bir taze besiyeri ile değiştirilir. Hücreler dört ya da beş pasajda bir dondurularak (%95 besiyeri, %5 DMSO) 3-4 hafta içerisinde çözülecekse -80°C'de ya da uzun süre saklanacaksa sıvı nitrojende saklanır.

İlk olarak hücrelerin bulunduğu 25 cm² flastan kirli besiyeri serolojik pipet yardımıyla çekilerek atılır. Daha sonra 1X Ca/Mg'siz PBS ile yıkanır. 37°C'de ısıtılmış Tripsin/EDTA eklenerek 5 dakika 37°C, %5 CO₂'li inkübatörde bekletilir. 5 dakika sonra Tripsin/EDTA'yı inhibe etmek için flaska medium eklenerek hücreler toplanıp 15'lik bir tüp içerisine alınır. 1500 rpm'de 5 dakika satrifüj edilir. Daha sonra süpernatant atılır. Hücreler pasajlanacaksa üzerine medium eklenir. Eğer hücreler dondurulacaksa üzerine 1 ml besiyeri eklenir ve 950 µl çekip bir kriyo tüp içerisine konur. Üzerine 50 µl DMSO yavaşça eklenerek kriyo tüp buz üzerine alınır. Kısa süreyle saklanacaksa -80°C'lik dolaba alınır. Uzun süreli olarak saklanacaksa sıvı nitrojene alınır.

5.2.4. Hücrelerin sayılması

Yapılacak tüm denemelerde belirli sayıda hücrenin flaslara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Sayım için hemositometre veya otomatik sayım cihazı kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında hemositometre ve tripan mavi boyası kullanarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin, Tripan mavisini hücre içine almaları ve ölü hücre olarak değerlendirilmeleri veya membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır. Hücrelerin tripsinizasyonu

yapıldıktan sonra santrifüjlenip süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 5 ml besiyeri eklenecek pipetaj yapıldı. Daha sonra 45 µl tripan mavi boyası alınarak bir başka tüp içerisine eklendi. Üzerine besiyeriyle resüspent edilmiş hücre karışımından 5 µl eklenecek pipetaj yapıp 10 µl çekilerek hemositometreye yüklendi. İnverted mikroskop yardımıyla hemositometre üzerindeki 16 karelik 4 alan içerisinde bulunan hücreler sayıldı.

5.2.5. Yapışkan olmayan yüzey oluşturma

Yapışkan olmayan yüzey oluşturabilmek için 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyusu kaplanmalıdır. Kaplama işlemi için %3'lük agaroz hazırlandı. 3 gram agaroz tartılarak 100 ml distile su içerisine eklendi. Mikrodalga fırın içerisinde 45 saniye boyunca 800 w ısı ile kaynatıldı. Daha sonra hafif soğutulur ve her kuyuya 100 µl olacak şekilde kuyucuklar kaplandı. 96 kuyucuklu plaka kaplandıktan sonra soğuması için 5 dakika boyunca +4°C'de bekletildi.

5.2.6. Huvec ve Ishikawa hücrelerinin üç boyutlu mono-kültürü

Daha önceden büyütülmüş olan Huvec ve Ishikawa hücreleri %70-80 konfluent olduklarında buldukları flasklardan tripsinizasyon işlemi ile ayrıldı. Her bir hücre hattı için ayrı bir 96 kuyucuklu plaka kullanıldı. Daha önceden agaroz ile kaplanmış olan 96 kuyucuklu plakalara ekilmek üzere sayma işlemi gerçekleştirildi. Her bir kuyuda 200 µl besiyeri içerisinde 1×10^4 hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak hücreler ekildi. 37°C'de %5 CO₂ bulunan inkübatörde büyümeye bırakıldı. Hücrelerin bu sürede 2 günde bir kirli besiyeri değiştirildi. 100 µl kirli besiyeri aspire edilerek 100 µl 1:1 (50:50µl) oranında taze besiyeri karışımı eklendi.

5.2.7. Huvec ve Ishikawa hücrelerinin üç boyutlu ko-kültürü

Üç boyutlu ko-kültür uygulaması için daha önceden agaroz ile kaplanmış olan 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Flasklarda büyütülmüş olan hücrelerin

tripsinizasyon işlemiyle buldukları yüzeyden ayrılmasından sonra her bir kuyucukta iki hücre hattından 1:1 oranında ($5 \times 10^3:5 \times 10^3$) hücre olacak şekilde sayma işlemi gerçekleştirildi. Daha önceden kaplanmış plakanın kuyucuklarına her iki hücre hattının besiyerinden her bir kuyucukta 1:1 oranında (100:100 μ l) olacak şekilde 200 μ l besiyeri içerisine hücreler ekildi. 37°C'de %5 CO₂ bulunan inkübatörde gün gün sferoid oluşumu gözlenerek çap ölçüleri kaydedildi. Hücrelerin bu sürede 2 günde bir besiyeri değişimi yapıldı. 100 μ l kirli besiyeri aspire edilerek 100 μ l 1:1 (50:50 μ l) oranında taze besiyeri karışımı eklendi.

5.2.8. Huvec ve Ishikawa hücrelerinin iki boyutlu ko-kültürü

2D ko-kültür uygulaması için flasklarda büyütülen hücreler %70-80 konfluent olduklarında tripsinizasyon işlemi ile buldukları flask yüzeyinden ayrıldı. 8 kuyucuklu lamın (İbidi/ kat. no: 80841) her bir kuyusunda 1:1 oranında ($5 \times 10^3:5 \times 10^3$) hücre olacak şekilde her iki hücre hattının besiyeri 1:1 oranında (100:100 μ l) karıştırılarak 200 μ l besiyerinin içerisine ekim yapıldı. Hücrelerin bu sürede 2 günde bir kirli besiyeri değiştirildi. 100 μ l kirli besiyeri aspire edilerek 100 μ l 1:1 (50:50 μ l) oranında taze besiyeri karışımı eklendi.

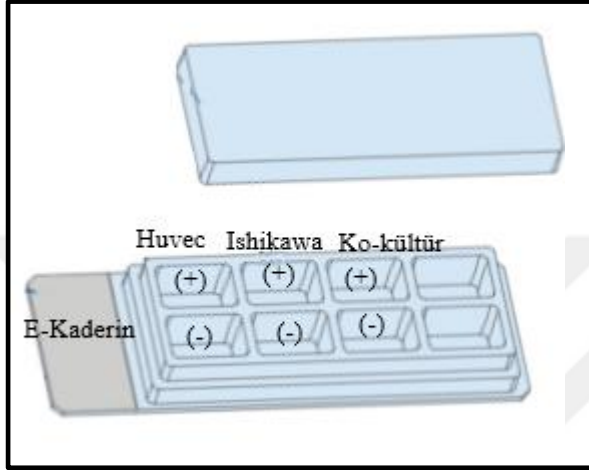
5.2.9. Üç boyutlu mono-kültür ve ko-kültür sistemlerinde oluşturulan sferoidlerin büyüklüklerinin ölçülmesi

Huvec hücrelerinden oluşturulan mono-sferoidlerin büyüklükleri hücre ekiminin yapıldığı günden 48, 72 ve 96 saat sonra olmak üzere üç gün boyunca ölçülmüştür. Ishikawa hücreleri ile oluşturulan mono-sferoidlerin büyüklükleri ekimin yapıldığı günden 24, 72 ve 48 saat sonra olmak üzere üç gün boyunca ölçülmüştür. Huvec ve Ishikawa hücreleri ile oluşturulan ko-kültür sferoidleri ekimin yapıldığı ilk günden 24, 48 ve 72 saat sonra üç gün süreyle ölçülmüştür. Tüm sferoidlerin büyüklüklerini ölçme işlemi Zeiss Axio inverted mikroskopu ve Zen Lite programı kullanılarak kaydedilmiştir.

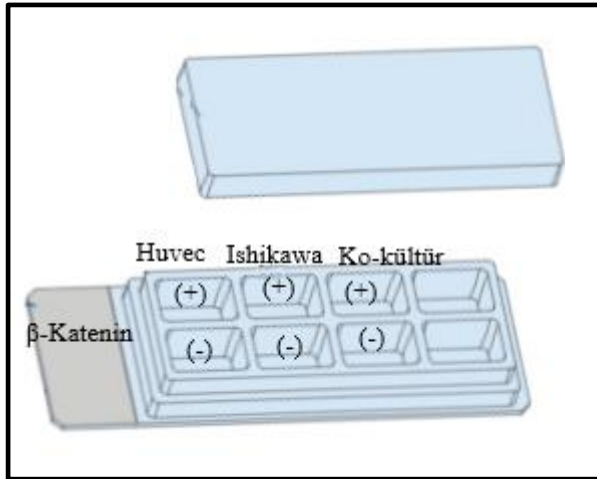
5.2.10. Üç boyutlu Huvec mono-kültür, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin E-Kaderin ve β -Katenin immünofloresan boyaması ve görüntülenmesi

Bu deney için oluşturulan sferoidler uygun ölçülere ulaştıklarında 8 kuyucuklu lam içerisine aktarıldı. Sferoidler fiksasyon işlemi için 1X PBS ile seyreltilmiş %4' lük PFA ile 25 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. %4'lük PFA aspire edildikten sonra 1X PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Daha sonra bloklama solüsyonu hazırlandı. Bloklama solüsyonu 1X PBS içerisinde %5 normal goat serum, %0,3 TritonX olacak şekilde hazırlandı. Bir petri ile hazırladığımız nemli ortamda oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda primer antikor hazırlandı. Primer antikor için E-Kaderin rabbit monoklonal ve β -Katenin rabbit monoklonal antikorları dilüsyon solüsyonu içerisinde 1:200 oranda hazırlandı. Bloklama solüsyonu aspire edildikten sonra 1X PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı. Primer antikor eklendikten sonra 24 saat boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol olarak belirlenen kuyucuklara primer antikor yerine 1X PBS eklenerek inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra sekonder antikor hazırlamak için goat-anti rabbit Alexa Fluor 488 1:200 oranında dilüsyon solüsyonu içerisinde hazırlandı. Primer antikor aspire edildikten sonra 3 defa 5'er dakika 1X PBS ile yıkama yapıldı. Sekonder antikor kuyucuklara eklendikten sonra 2 saat boyunca nemli ortam içerisinde oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 3 defa 5'er dakika 1X PBS ile yıkama yapıldı. Ardından DAPI içeren kapatma solüsyonu ile bir lamel yardımıyla lamın üzeri kapatıldı. Preparatın kurumasını takiben Lazer taramalı konfokal mikroskopunda (Zeiss LSM 800) 488 nm eksitasyonla uyarılarak elde edilen görüntüler kaydedildi. İmmünofloresan görüntüleme Zeiss Lsm 800 lazer taramalı konfokal mikroskobu aracılığıyla optik kesit alma prensibiyle gerçekleştirildi. Z-stack işlemi (uzaysal z düzleminde optik kesitler alma) ile sferoidlerin üç boyutlu görüntüleri ortaya konulur. Bu yöntemle üç boyutlu yapı, histolojik kesitler alma mantığıyla oluşturulacağı için her kesitteki E-Kaderin ve β - Katenin lokalizasyonlarının ayrı ayrı incelemesi sağlanır. E-Kaderin boyaması yapılan 264 μ m kalınlığındaki Huvec mono-sferoidlerinden Z-stack işlemiyle 67 tane optik kesit, 180 μ m kalınlığındaki Ishikawa mono-sferoidlerinden

46 tane optik kesit ve 356 μm kalınlığındaki ko-kültür sferoidlerinden 90 tane optik kesit alınmıştır. β -Katenin boyaması yapılmış 72 μm kalınlığında olan Huvec ve Ishikawa mono-sferoidlerinden 19 tane, 68 μm kalınlığında olan Ko-kültür sferoidlerinden 18 tane optik kesit alınmıştır.



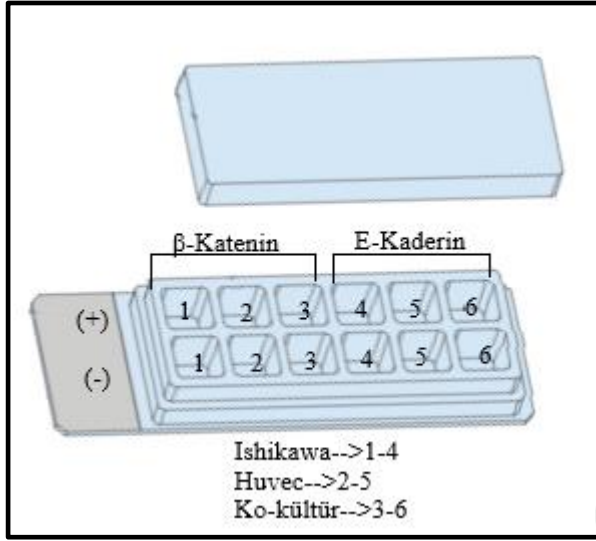
Şekil 5.2.10.1. Üç boyutlu mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin E-Kaderin immüno Floresan boyamasının şematik olarak gösterilmesi(122).



Şekil 5.2.10.2. Üç boyutlu mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin β -Katenin immüno Floresan boyamasının şematik olarak gösterilmesi(122).

5.2.11. Ishikawa ve Huvec hücrelerinin iki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde E-Kaderin ve β -Katenin immünofloresan boyaması ve görüntülenmesi

Bu deney için T75 flaskta büyütülen hücreler %90 konfluent olduklarında trispinize edilerek 12 kuyucuklu lama ekildi. İki gün boyunca kuyucuklarda bulunan hücrelerin konfluent olması beklendi. Daha sonra kuyucuklarda bulunan besiyeri çekilip atılarak hücreleri fikse etmek için %4 PFA kuyucuklara eklendi ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. %4 PFA çekilip atılarak 1X PBS ile 5'er dakika boyunca 2 kere yıkama yapıldı. Daha sonra 1X PBS içerisinde %0,3 Triton X, %5 normal goat serum olacak şekilde bloklama solüsyonu hazırlandı. Her kuyuya eklendikten sonra 1 saat boyunca hazırladığımız nemli petri kabı içerisinde inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda bloklama solüsyonu kuyucuklardan çekilip atıldı. Primer antikoru hazırlamak için E-Kaderin rabbit monoklonal ve β -Katenin rabbit monoklonal antikoları 1:200 oranında antikor dilüsyon solüsyonu ile hazırlandı. Daha sonra pozitif örnek olarak belirlenen kuyucuklara 200'er μ l eklendi. Negatif örneklerin bulunduğu kuyucuklara 1X PBS eklendi. 12 kuyucuklu lam nemli petri kabına alınarak aliminyum folyo ile kaplandı ve 24 saat boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra kuyucuklardan primer antikor ve PBS çekilip atılarak 3 defa 5'er dakika 1X PBS ile yıkama yapıldı. Sekonder antikoru hazırlamak için goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 dilüsyon solüsyonu 1:200 oranında ile seyreltilerek hazırlandı. Hazırlanan sekonder antikor bütün kuyucuklara 200'er μ l eklendi. 2 saat boyunca nemli petri kabına konulduktan sonra aliminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda sekonder antikor kuyucuklardan çekilip atıldı. 3 defa 5'er dakika süreyle 1X PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra DAPI içeren kapatma solüsyonu ve bir lamel yardımıyla lamın üzeri kapatıldı. Preparatın kurumasını takiben Lazer taramalı konfokal mikroskobunda (Zeiss LSM 800) görüntüler kaydedildi.



Şekil 5.2.11.1. İki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür E-Kaderin ve β -Katenin immüno Floresan boyamasının şematik olarak gösterilmesi(123).

5.2.12. Huvec ve Ishikawa hücreleriyle oluşturulan ko-kültür sferoidlerinin E-Kaderin ve β -Katenin polink ikili boyama sistemi ile boyanması

Huvec ve Ishikawa hücreleriyle oluşturulan sferoidler 8 kuyucuklu lama aktarıldı. %4 PFA ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında fiksasyona bırakıldı. Süre sonunda PFA aspire edilerek 100 μ l 1X PBS ile 5'er dakika 3 kere yıkama yapıldı. Bloklama solüsyon 1X PBS içinde %5 normal goat serum ve %0,3 Triton X olacak şekilde hazırlandı. 200'er μ l bloklama solüsyonu kuyucuklara eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Primer antikor için E-kaderin rabbit monoklonal antikor 1:200 oranında dilüsyon solüsyonu ile seyreltilerek hazırlandı. Bloklama solüsyonu aspire edilerek primer antikor pozitif örnek kuyusuna eklendi. Negatif örneğin bulunduğu kuyuya 1X PBS eklendi ve nemli bir petri kabının içerisinde 24 saat +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün primer antikor kuyucuklardan aspire edildi. PBS-Tween 20 ile 3 kere 2'şer dakika yıkama yapıldı. Sekonder antikor için 1:100 oranında goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 dilüsyon solüsyonu ile seyreltilerek hazırlandı. Bütün kuyucuklara sekonder antikor

eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sekonder antikor aspire edilerek PBS ile 10 dakika yıkandı. PBS-Tween 20 ile 3 defa 2'şer dakika yıkama yapıldı. Bloklama solüsyon için 1X PBS içerisinde %5 donkey serum, %0,3 Triton X hazırlandı. 200'er µl bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Primer antikor için β-Katenin rabbit monoklonal antikor 1:200 oranında dilüsyon solüsyonu içerisinde hazırlandı. Pozitif örneğin bulunduğu kuyucuğa 100 µl eklendi ve nemli petri kabı içerisinde 24 saat +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün primer antikor aspire edildi ve PBS-Tween 20 ile 3 defa 2'şer dakika yıkama yapıldı. Sekonder antikor için donkey-anti rabbit alexa fluor 546 1:100 oranında dilüsyon solüsyonu içerisinde hazırlandı. Kuyucuklara eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor aspire edildikten sonra PBS-Tween 20 ile 3 defa 2'şer dakika olmak üzere yıkama yapıldı. Her kuyucuğa DAPI eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. PBS-Tween 20 ile 3 defa 2'şer dakika yıkandı. Fluoromount (kapatma solüsyonu) damlatıldıktan sonra lamel yardımıyla lam kapatıldı. Preparatın kurumasını takiben Lazer taramalı konfokal mikroskopunda (Zeiss LSM 800) elde edilen görüntüler kaydedildi.

5.2.13. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Graph Pad Prism 8 istatistik programı kullanıldı. Çalışma grupları tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirildi. Gruplar arası farklılıklar örneklem sayısının eşit olduğu analizlerde Tukey testi, eşit olmadığı analizlerde Bonferroni testi ile karşılaştırılmıştır. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6.BULGULAR

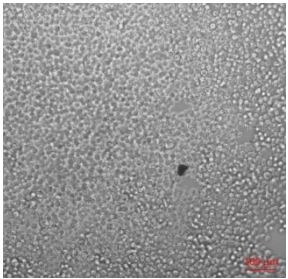
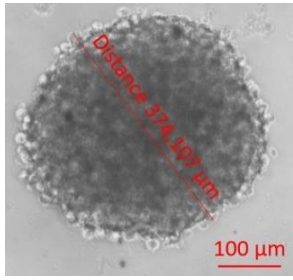
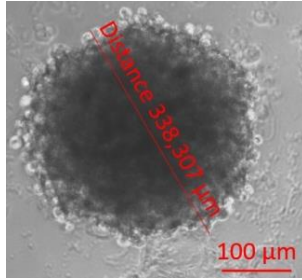
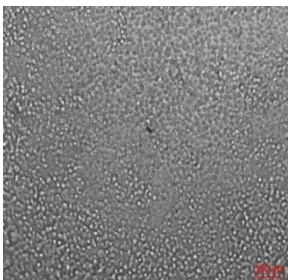
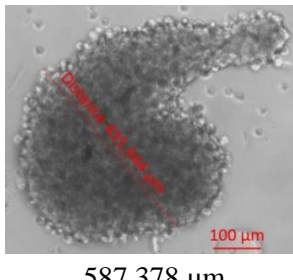
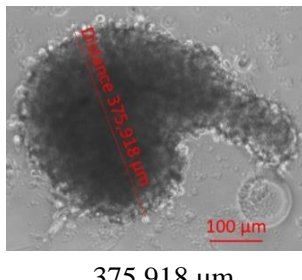
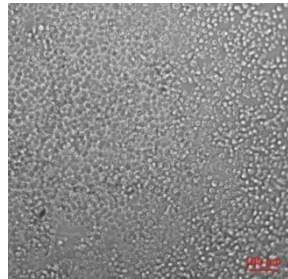
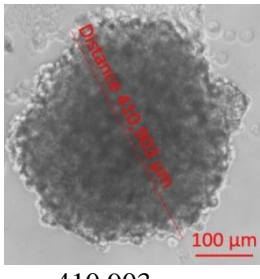
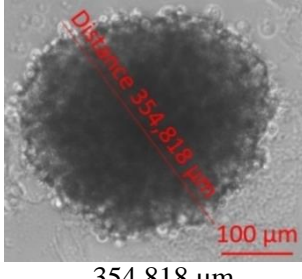
6.1. Üç Boyutlu Mono-Kültür ve Ko-kültür Sisteminde Oluşturulan Huvec ve Ishikawa Sferoidlerinin Büyüklüklerinin Ölçülmesi

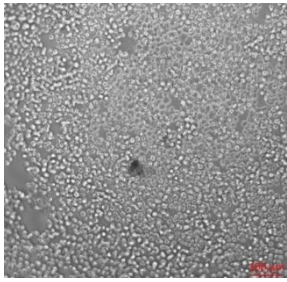
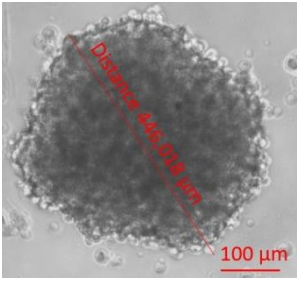
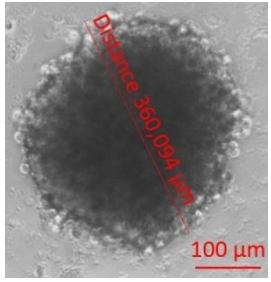
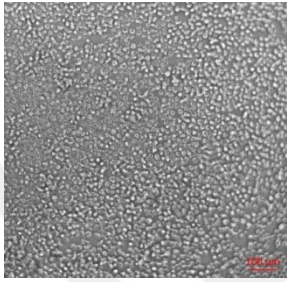
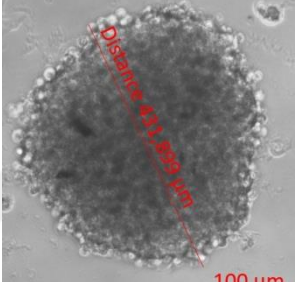
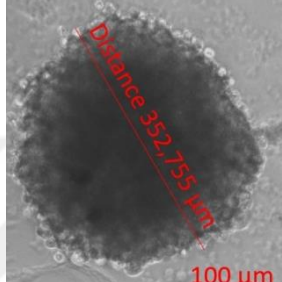
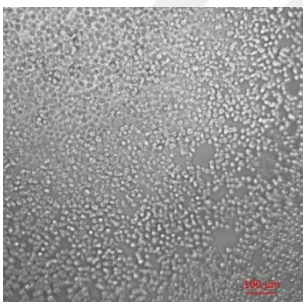
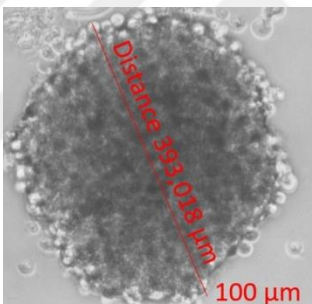
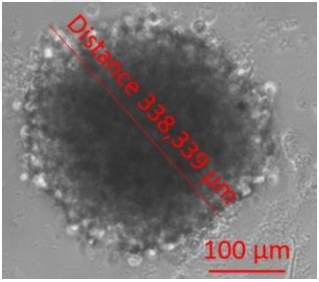
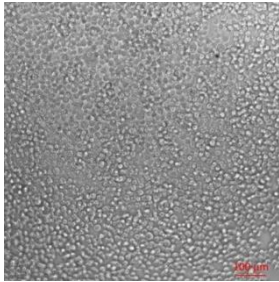
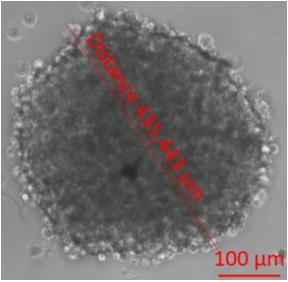
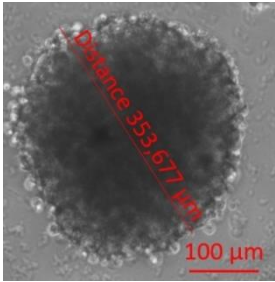
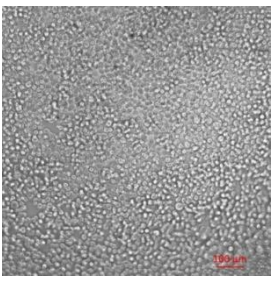
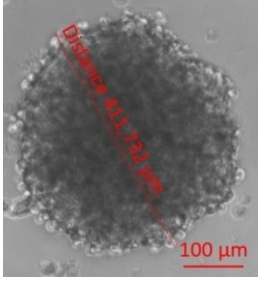
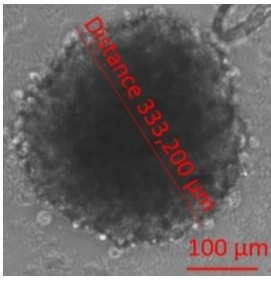
Her iki sistem içinde 96 kuyucuklu plakalarda oluşturulan sferoidlerin büyüklük ölçüleri oluşmaya başladıktan 24, 48 ve 72 saat sonra mikroskop altında Zen Lite programı aracılığıyla oluşan sferoidlerin çap ölçüleri ve görüntüleri kaydedilmiştir. Oluşan her bir sferoidin görüntüleri tablo halinde gösterilmiştir.

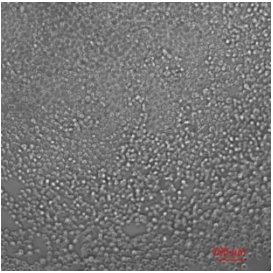
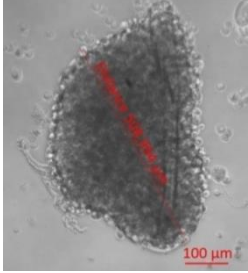
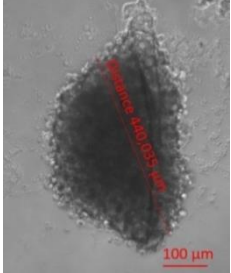
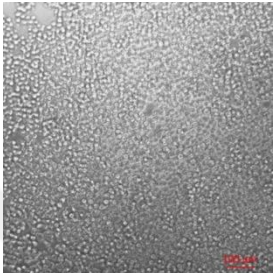
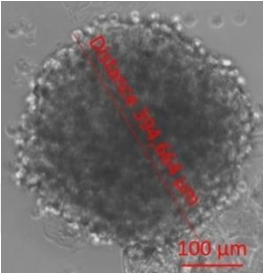
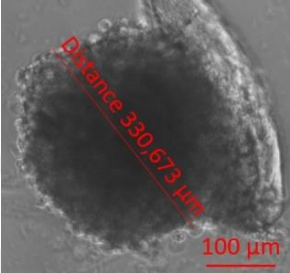
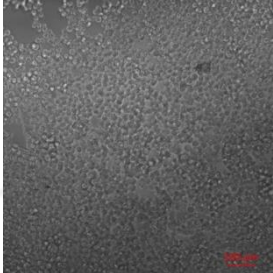
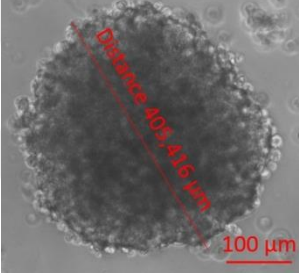
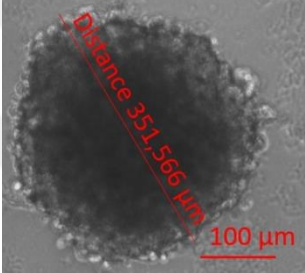
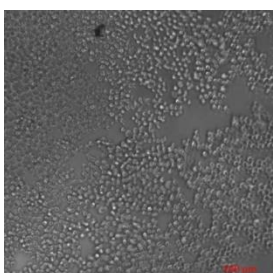
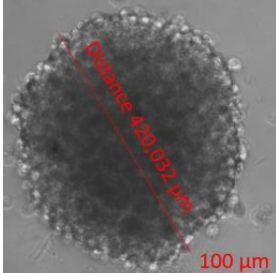
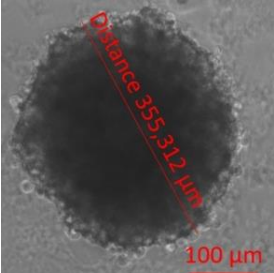
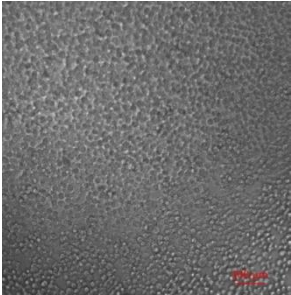
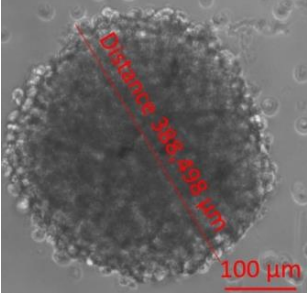
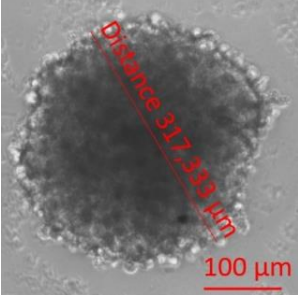
6.1.1.Üç boyutlu mono-kültür sisteminde oluşturulan Huvec sferoidlerinin büyüklüklerinin ölçülmesi

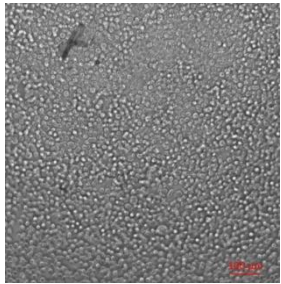
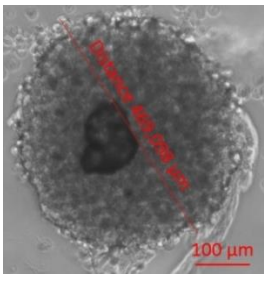
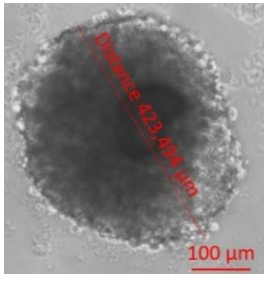
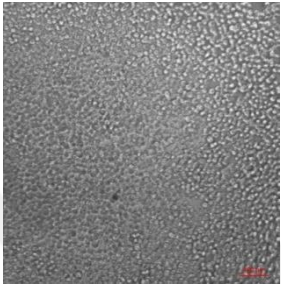
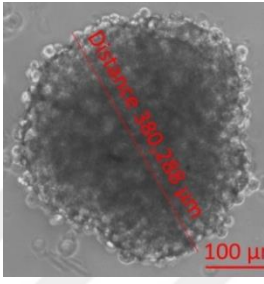
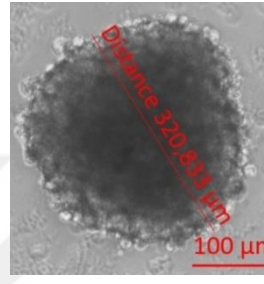
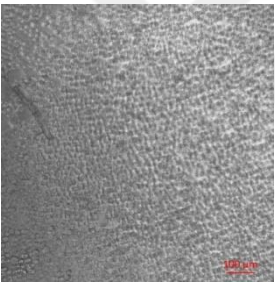
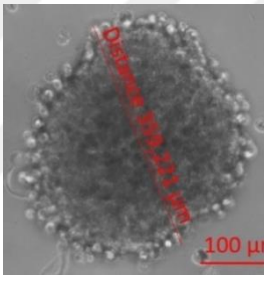
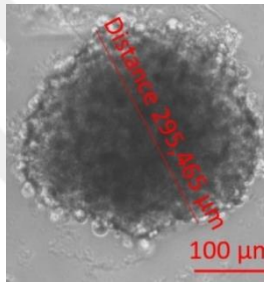
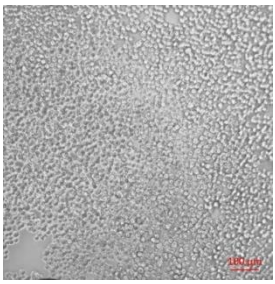
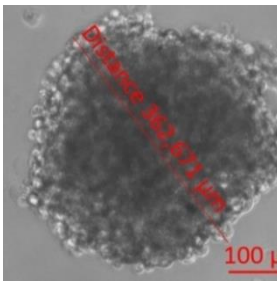
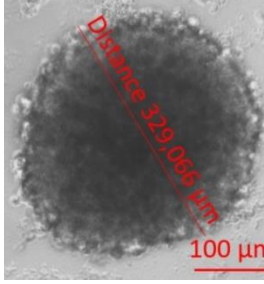
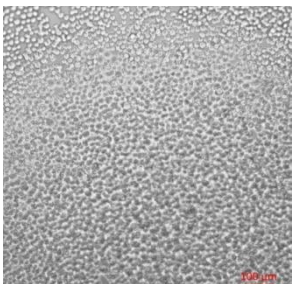
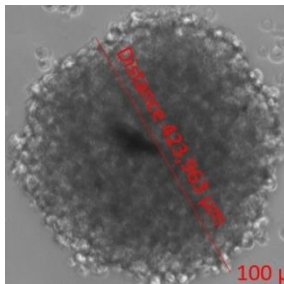
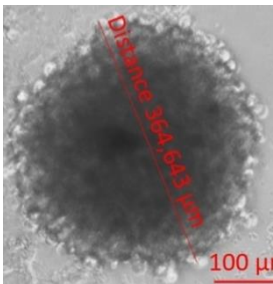
96 kuyulu plakaların her bir kuyusunda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra mono-sferoidlerin oluşumu gözlemlenmiştir. Huvec sferoidlerinin 1, 2 ve 3. günleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür ($p < 0,0001$) (Şekil 6.1.1.2.).

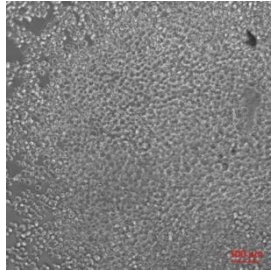
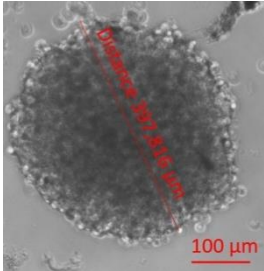
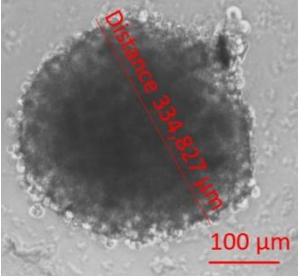
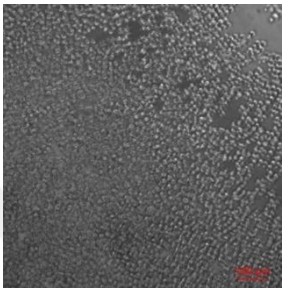
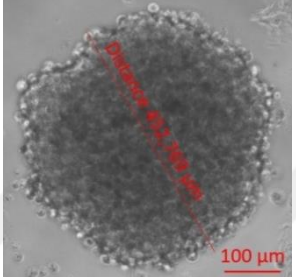
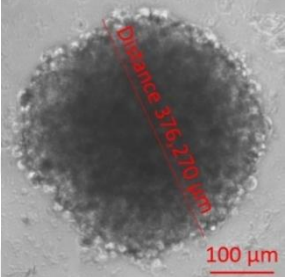
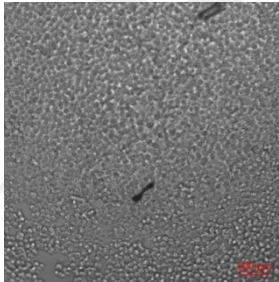
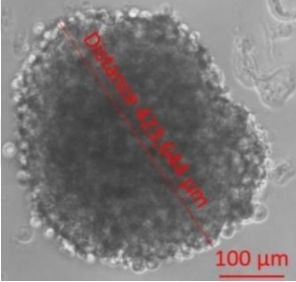
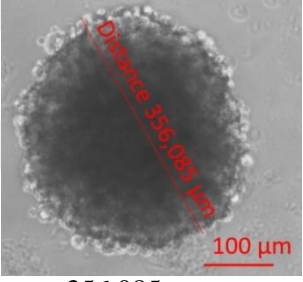
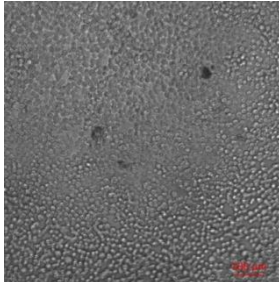
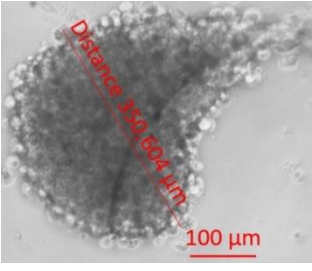
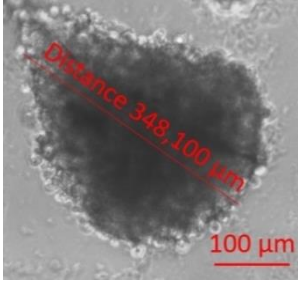
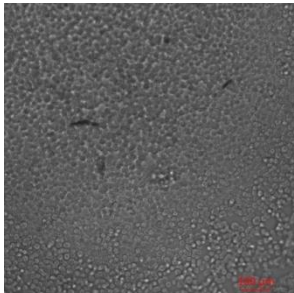
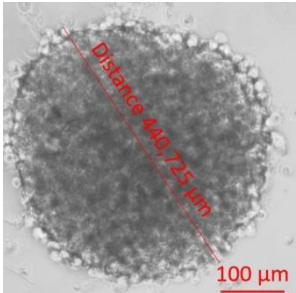
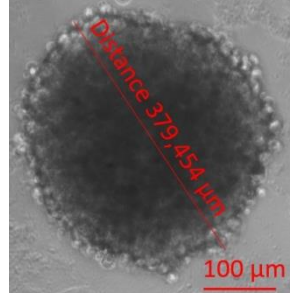
Tablo 6.1.1.1. Huvec sferoidlerinin üç gün boyunca ölçülen büyüklük değerleri (10X).

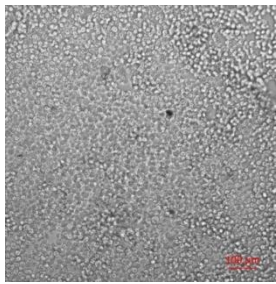
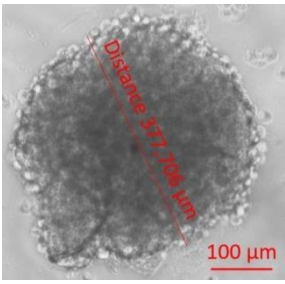
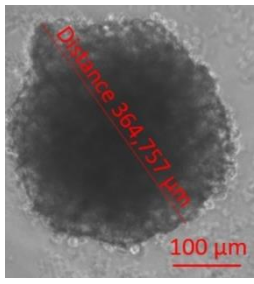
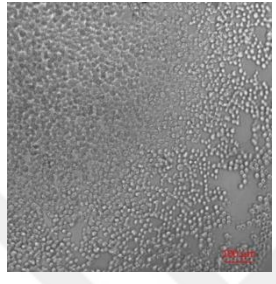
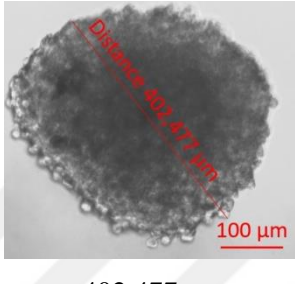
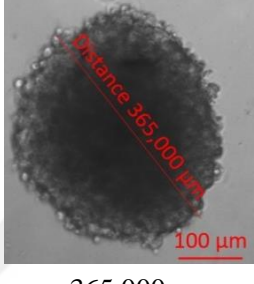
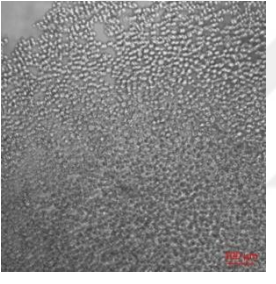
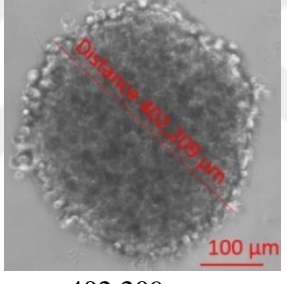
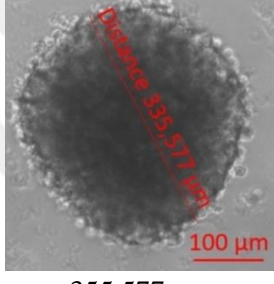
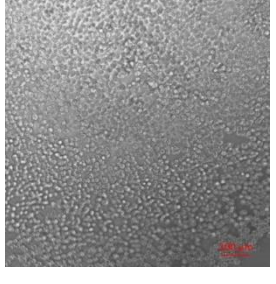
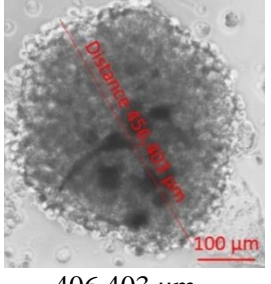
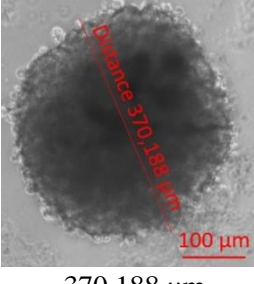
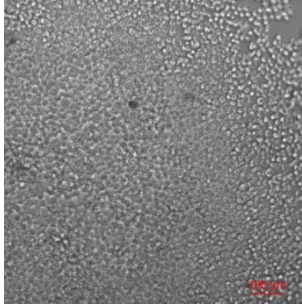
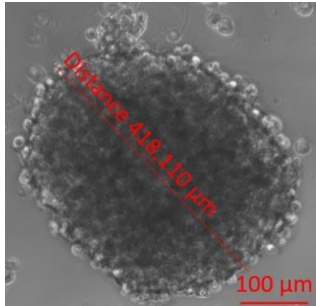
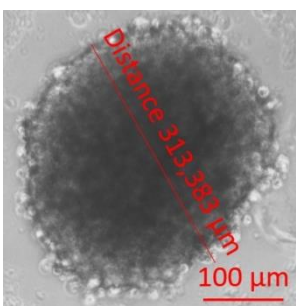
	HUVEC		
	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
1.		 374,107 µm	 338,307 µm
2.		 587,378 µm	 375,918 µm
3.		 410,903 µm	 354,818 µm

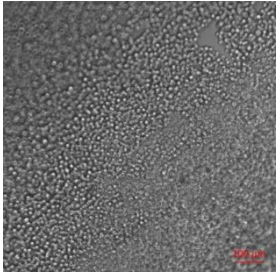
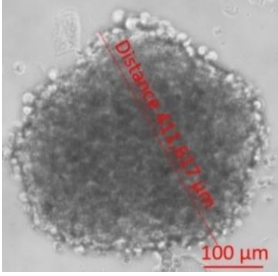
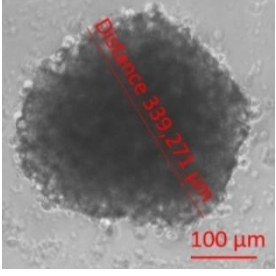
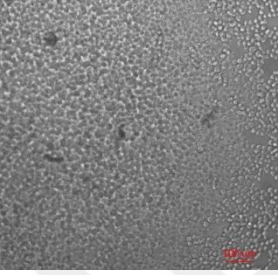
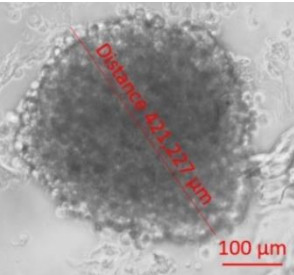
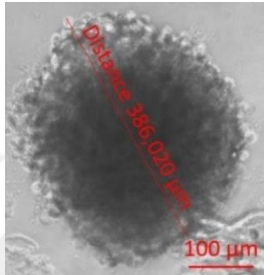
		HUVEC		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
4.		 446,018 μm	 360,094 μm	
5.		 431,899 μm	 352,755 μm	
6.		 393,018 μm	 338,339 μm	
7.		 435,443 μm	 353,677 μm	
8.		 411,732 μm	 333,200 μm	

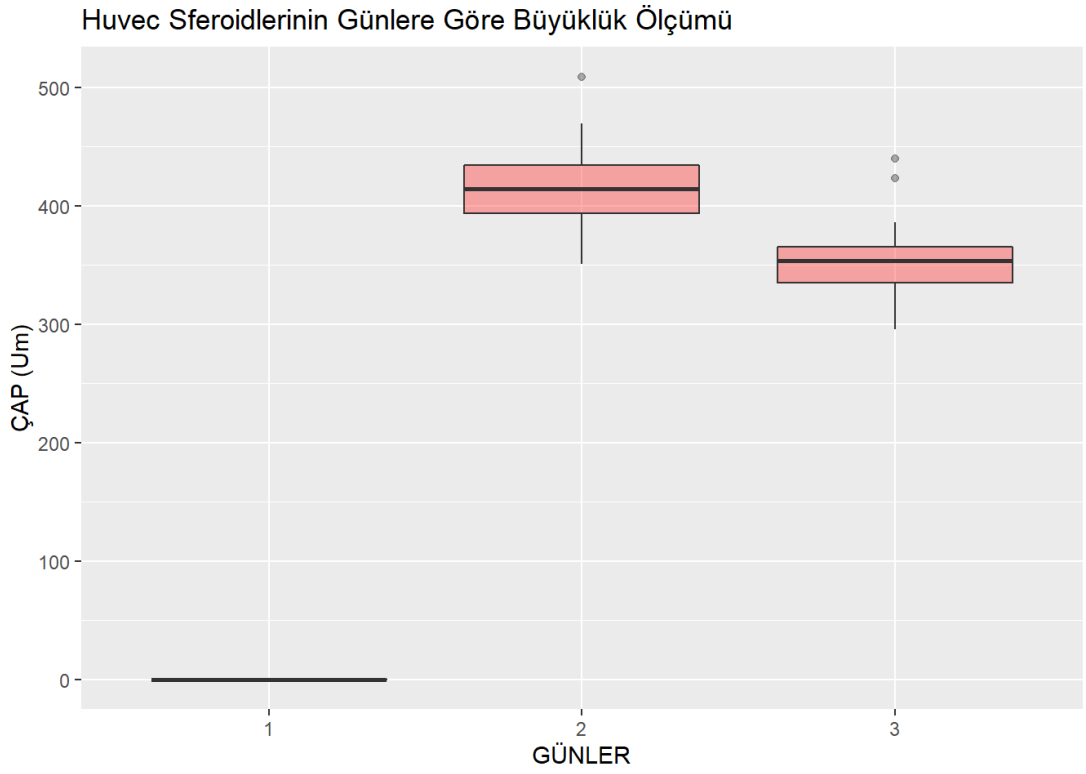
		HUVEC		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
9.		 508,994 μm	 440,035 μm	
10.		 394,664 μm	 330,673 μm	
11.		 405,416 μm	 351,566 μm	
12.		 420,032 μm	 355,312 μm	
13.		 388,498 μm	 317,333 μm	

		HUVEC		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
14.		 469,098 μm	 423,494 μm	
15.		 380,288 μm	 320,833 μm	
16.		 359,211 μm	 295,465 μm	
17.		 362,671 μm	 329,066 μm	
18.		 423,963 μm	 364,643 μm	

		HUVEC		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
19.		 397,816 µm	 334,827 µm	
20.		 452,769 µm	 376,270 µm	
21.		 423,644 µm	 356,085 µm	
22.		 350,604 µm	 384,100 µm	
23.		 440,725 µm	 379,454 µm	

		HUVEC		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
24.				
			377,706 µm	364,757 µm
25.				
			402,477 µm	365,000 µm
26.				
			402,209 µm	355,577 µm
27.				
			406,403 µm	370,188 µm
28.				
			418,110 µm	313,383 µm

		HUVEC		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
29.		 411,617 µm	 339,271 µm	
30.		 421,677 µm	 386,020 µm	

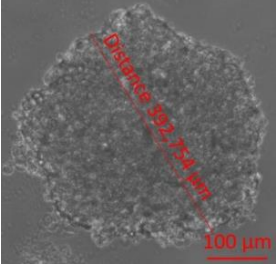
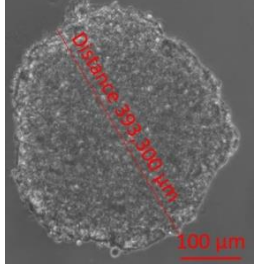
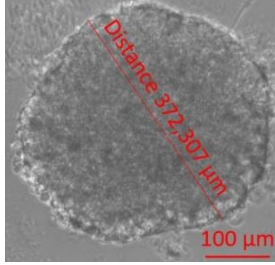
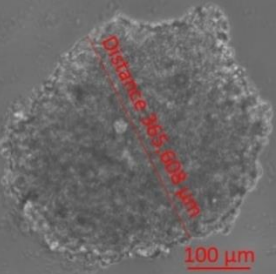
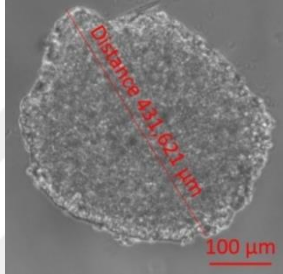
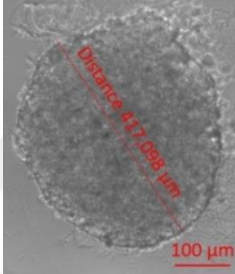
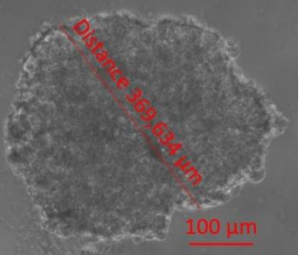
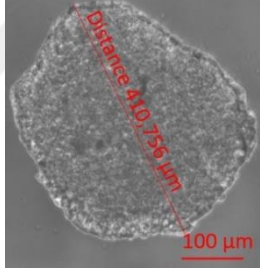
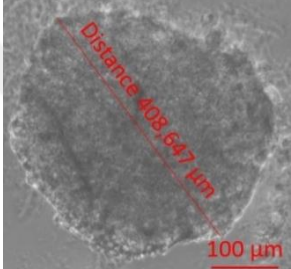
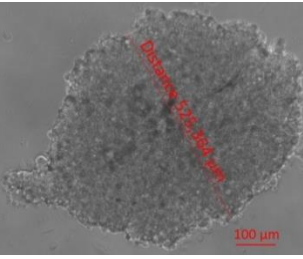
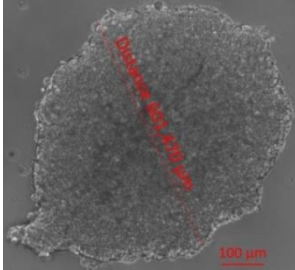
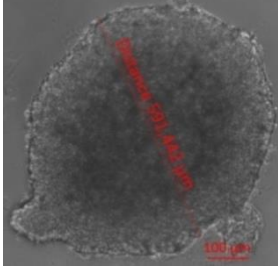
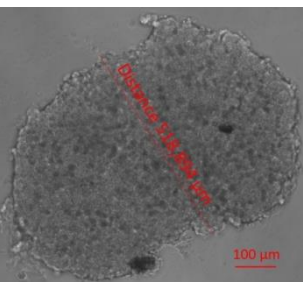
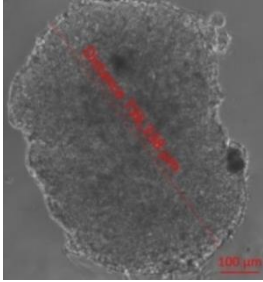
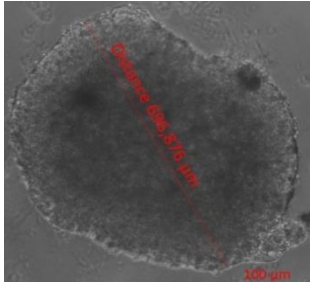


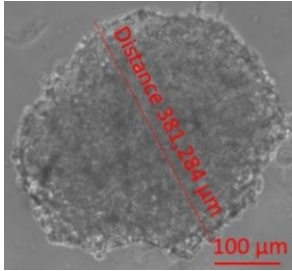
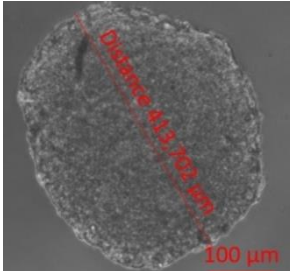
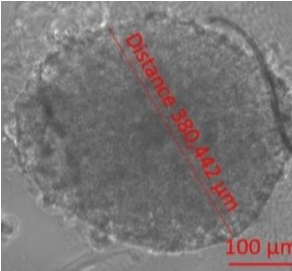
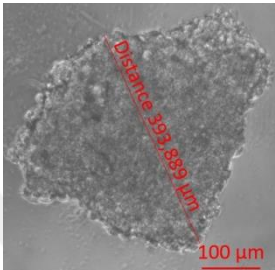
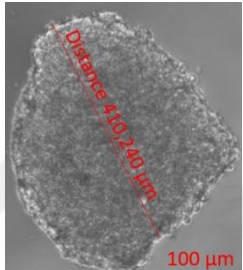
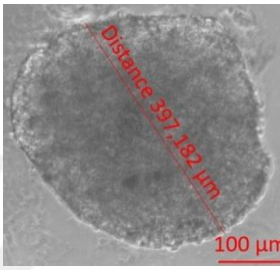
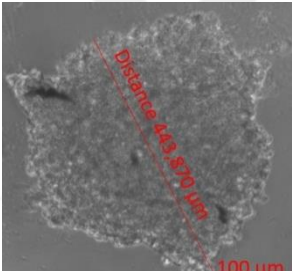
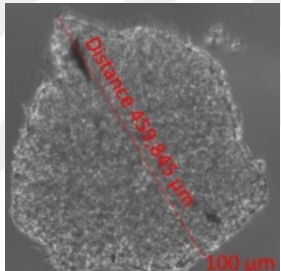
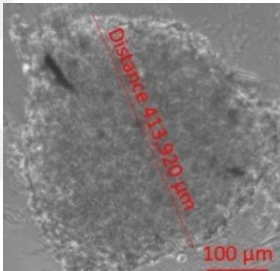
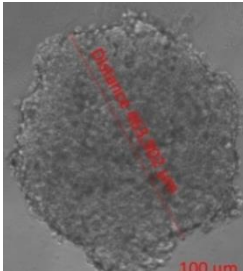
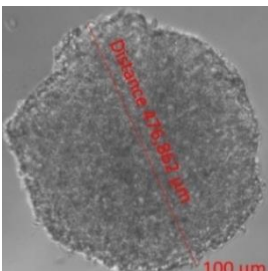
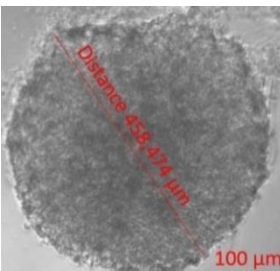
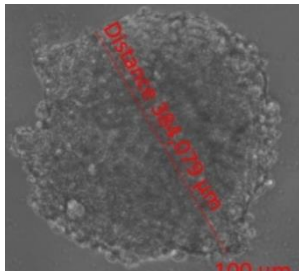
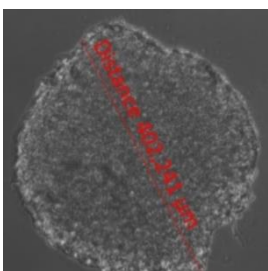
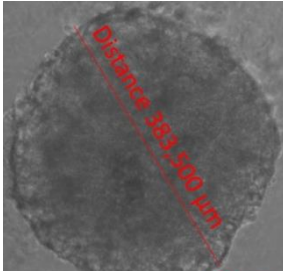
Şekil 6.1.1.2 Huvec hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin üç günlük büyümesinin karşılaştırması.

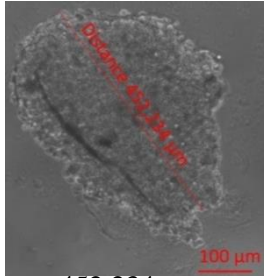
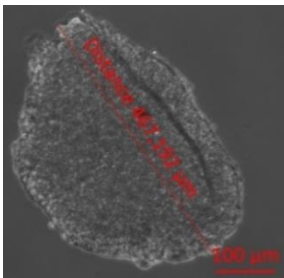
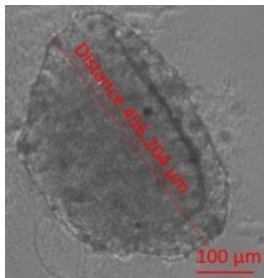
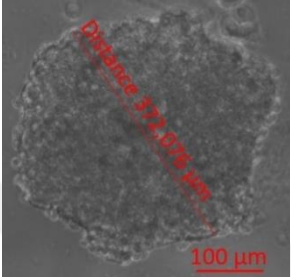
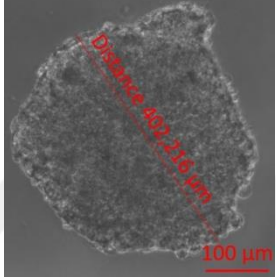
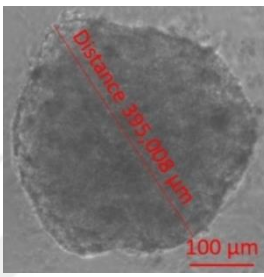
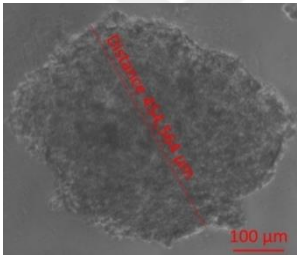
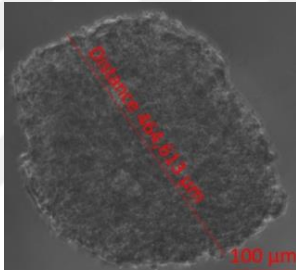
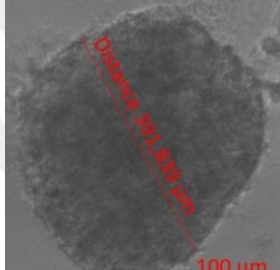
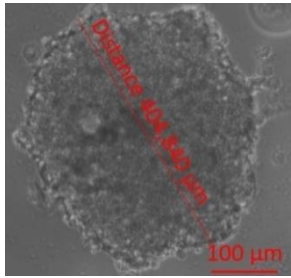
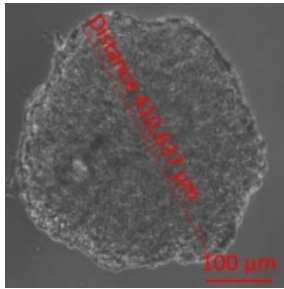
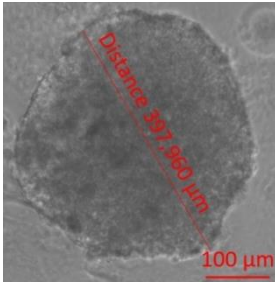
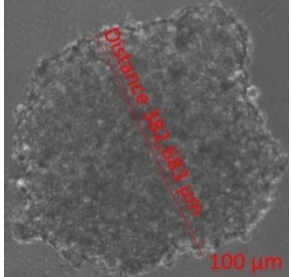
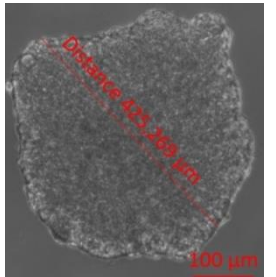
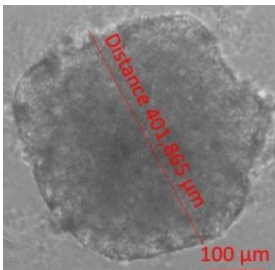
6.1.2. Üç boyutlu mono-kültür sisteminde oluşturulan Ishikawa sferoidlerinin büyüklüklerinin ölçülmesi

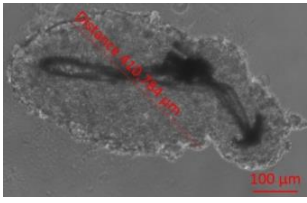
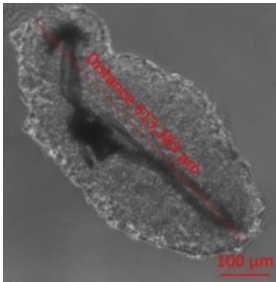
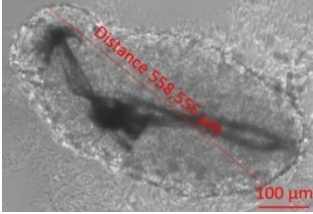
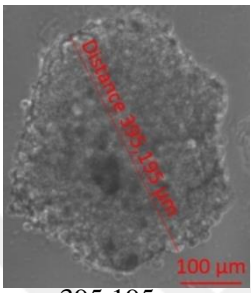
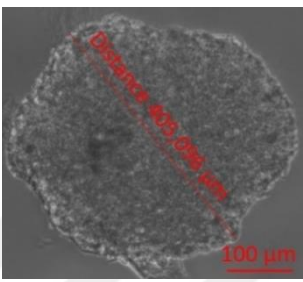
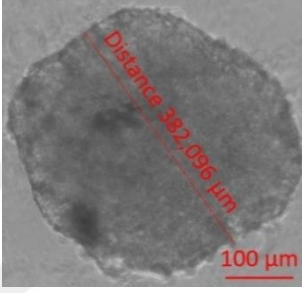
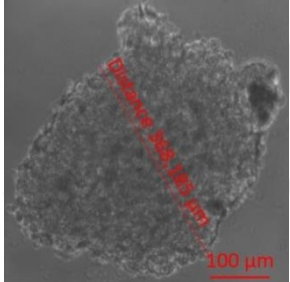
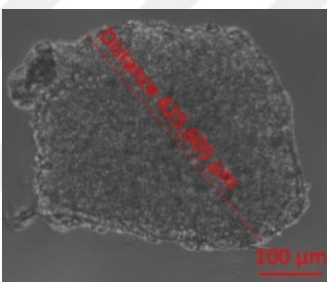
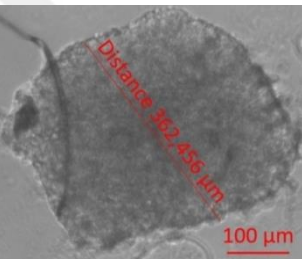
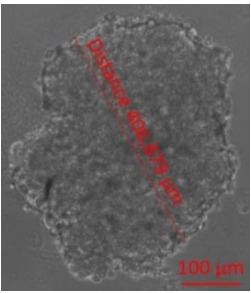
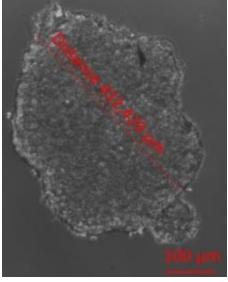
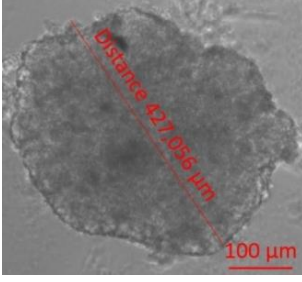
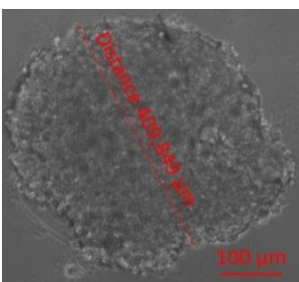
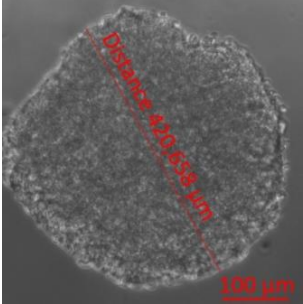
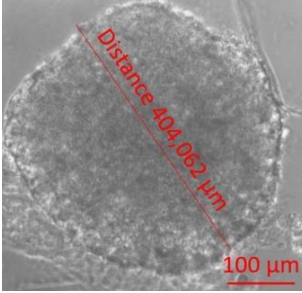
96 kuyulu plakaların her bir kuyusunda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra mono-sferoidlerin oluşumu gözlemlenmiştir. Ishikawa sferoidlerinin 2. günlerinde ölçülen ortalama büyüklüklerinin 1 ve 3. günlerden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur ($p=0,0010$) (Şekil 6.1.2.2.).

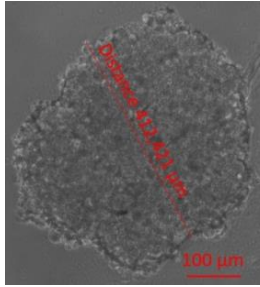
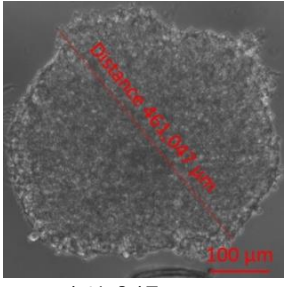
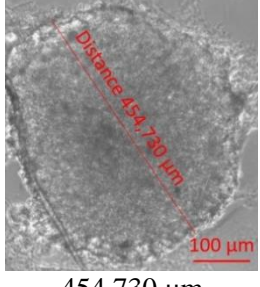
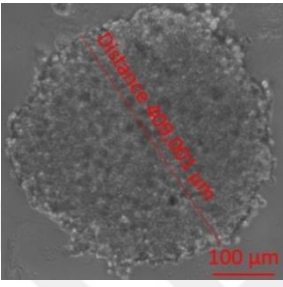
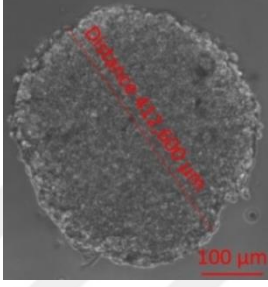
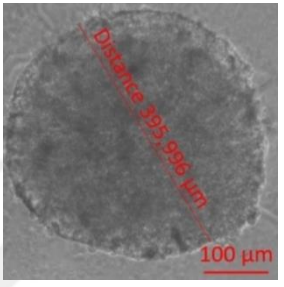
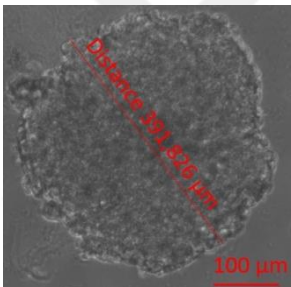
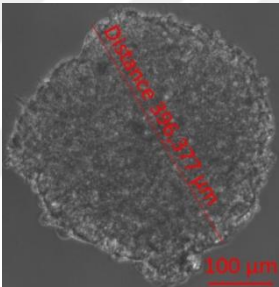
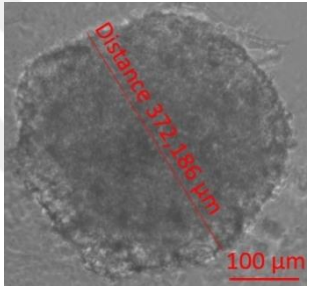
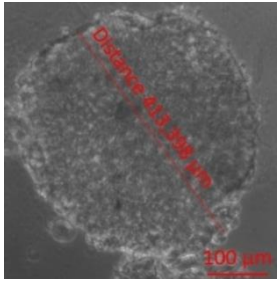
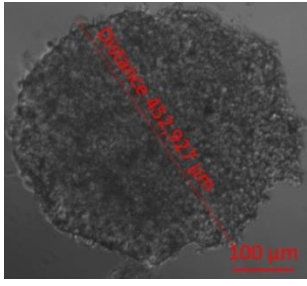
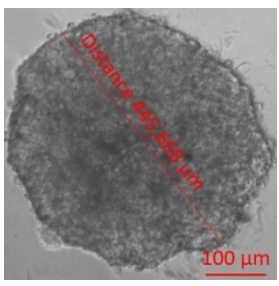
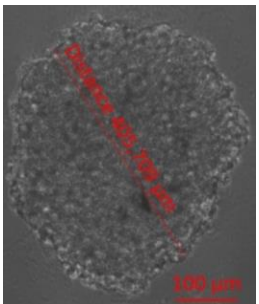
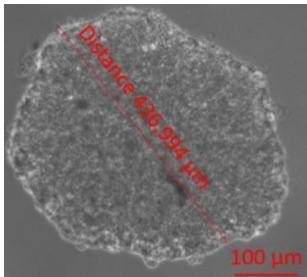
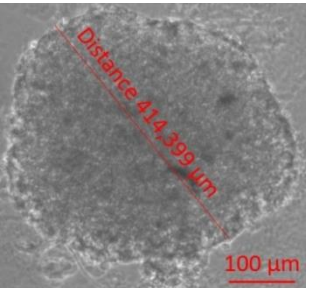
Tablo 6.1.2.1. Ishikawa sferoidlerinin üç gün boyunca ölçülen büyüklük değerleri.

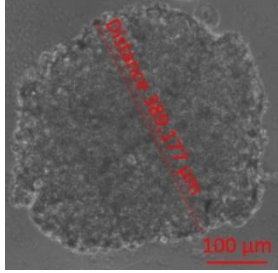
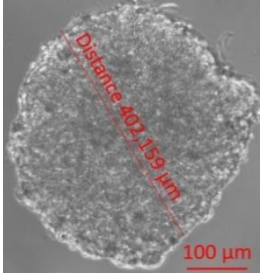
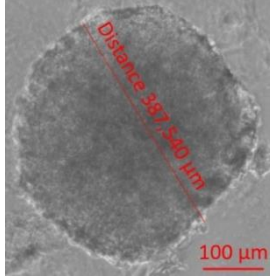
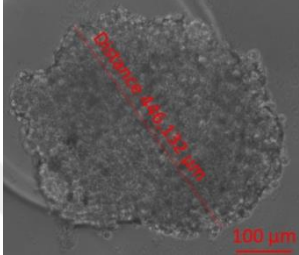
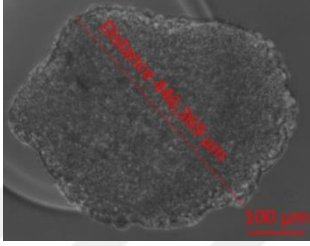
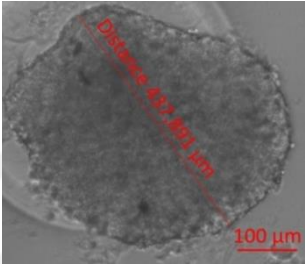
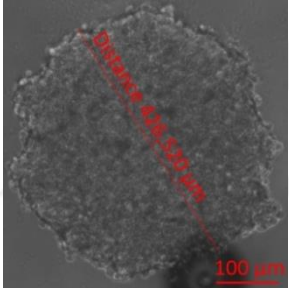
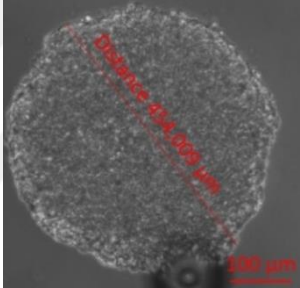
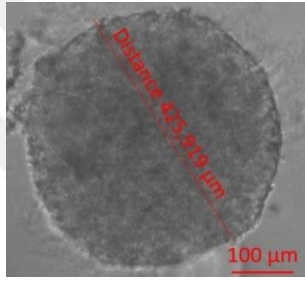
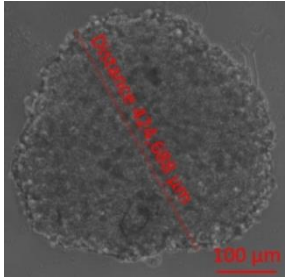
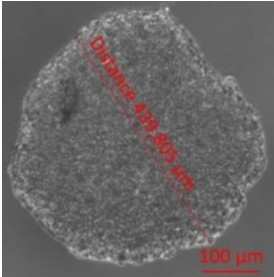
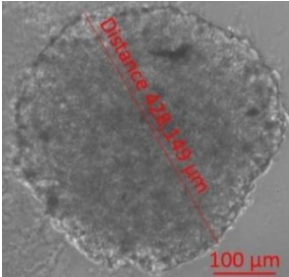
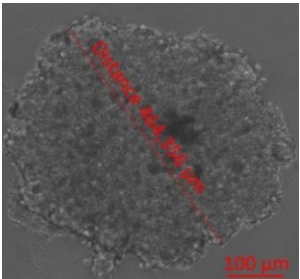
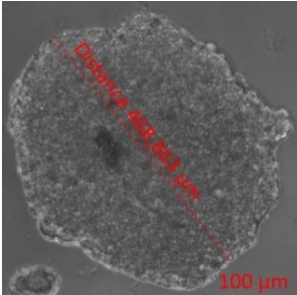
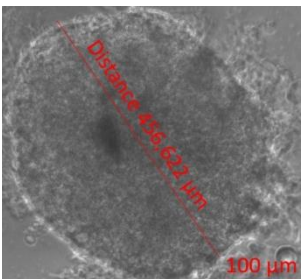
		ISHIKAWA		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
1.				
		392,754 μm	393,300 μm	372,307 μm
2.				
		365,608 μm	431,621 μm	417,098 μm
3.				
		369,634 μm	410,756 μm	408,647 μm
4.				
		525,364 μm	601,470 μm	591,442 μm
5.				
		518,844 μm	736,338 μm	696,876 μm

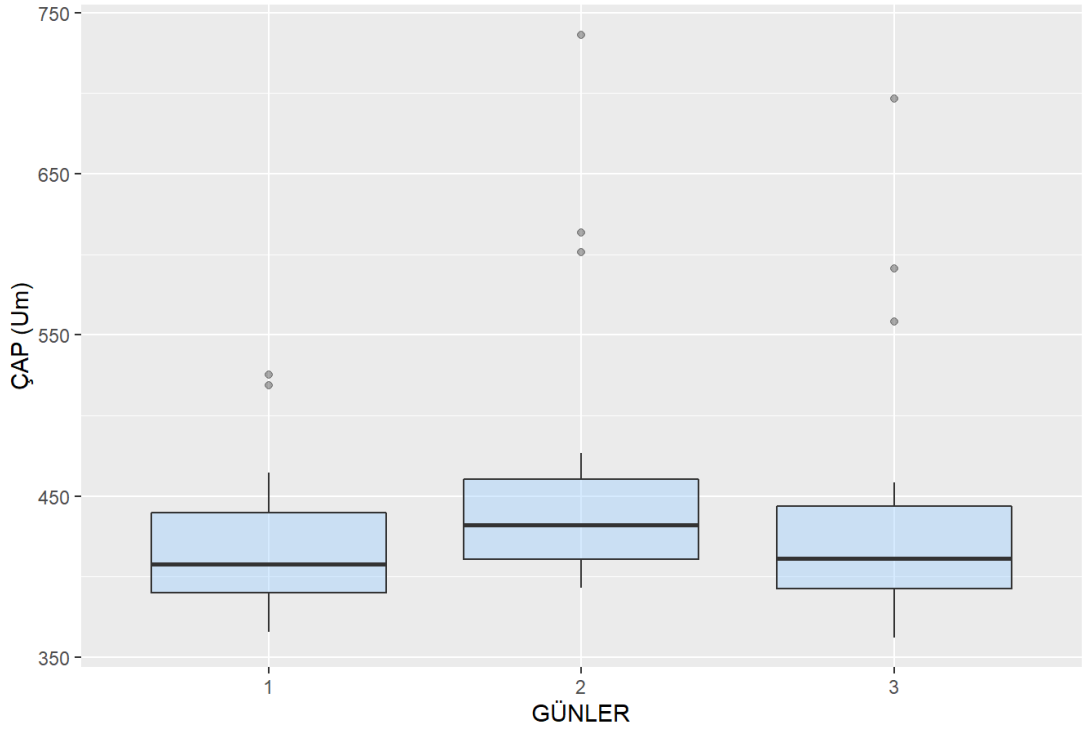
		ISHIKAWA		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
6.				
	381,284 μm	413,702 μm	380,442 μm	
7.				
	393,889 μm	410,240 μm	397,182 μm	
8.				
	443,870 μm	459,845 μm	413,920 μm	
9.				
	463,902 μm	476,862 μm	458,474 μm	
10.				
	384,079 μm	402,241 μm	383,500 μm	

		ISHIKAWA		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
11.				
	452,234 μm	467,192 μm	456,204 μm	
12.				
	372,076 μm	402,216 μm	395,008 μm	
13.				
	454,564 μm	464,613 μm	391,839 μm	
14.				
	404,840 μm	410,637 μm	397,960 μm	
15.				
	382,683 μm	425,269 μm	401,865 μm	

		ISHIKAWA		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
16.				
	410,784 μm	613,283 μm	558,555 μm	
17.				
	395,195 μm	405,096 μm	382,096 μm	
18.				
	368,185 μm	425,605 μm	362,456 μm	
19.				
	406,879 μm	432,429 μm	427,056 μm	
20.				
	409,849 μm	420,658 μm	404,062 μm	

		ISHIKAWA		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
21.				
	412,421 μm	461,047 μm	454,730 μm	
22.				
	409,001 μm	412,600	395,996 μm	
23.				
	391,826 μm	396,377 μm	372,186 μm	
24.				
	413,398 μm	452,927 μm	445,668 μm	
25.				
	405,709 μm	436,994 μm	414,399 μm	

		ISHIKAWA		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
26.				
	389,177 μm	452,109 μm	387,540 μm	
27.				
	446,132 μm	446,369 μm	437,891 μm	
28.				
	426,520 μm	454,009 μm	425,919 μm	
29.				
	424,688 μm	439,805 μm	428,149 μm	
30.				
	464,356 μm	468,863 μm	456,622 μm	

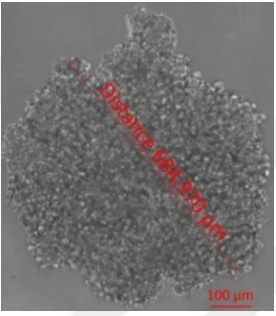
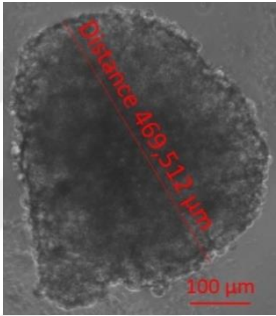
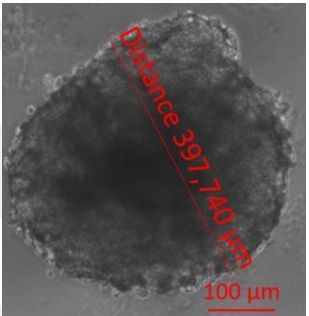
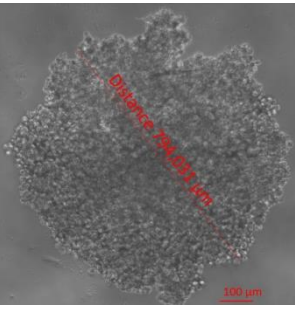
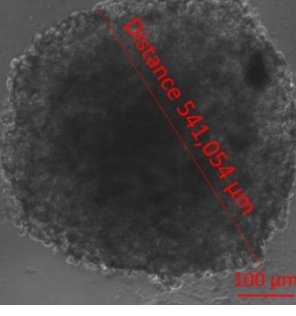
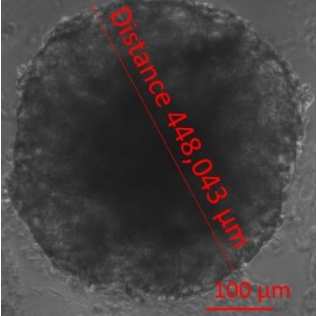
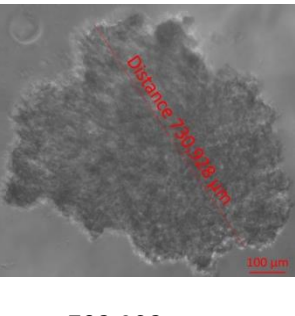
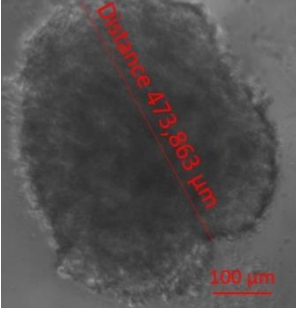
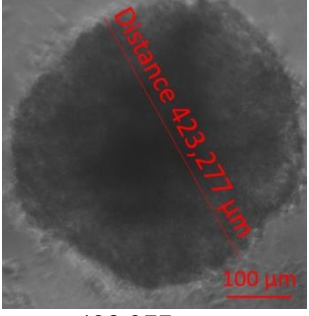


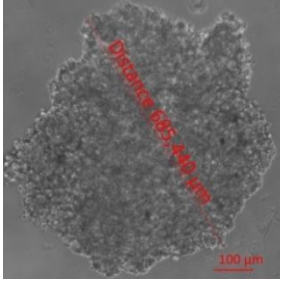
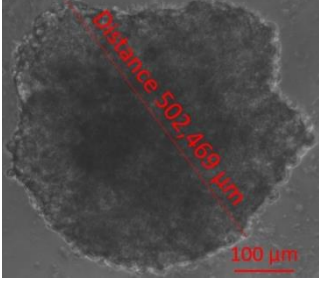
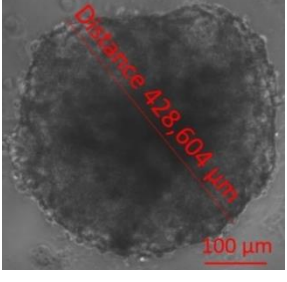
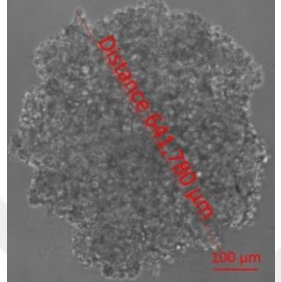
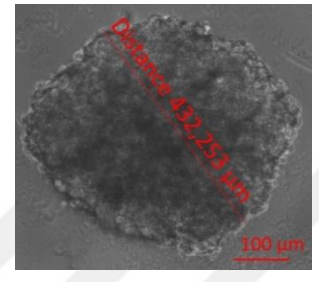
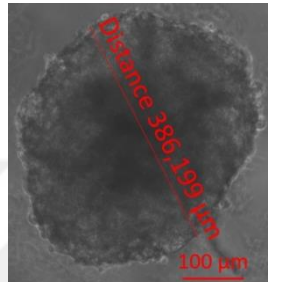
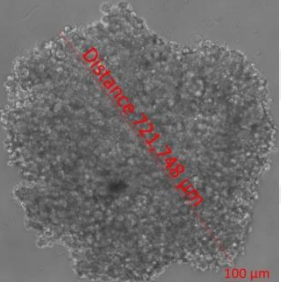
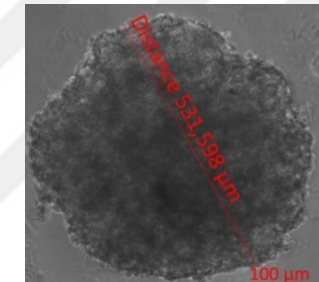
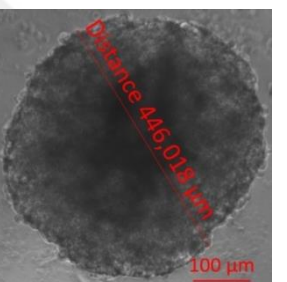
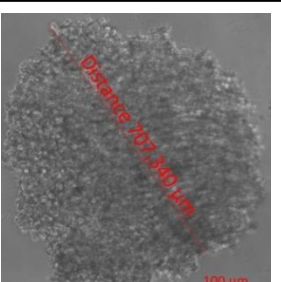
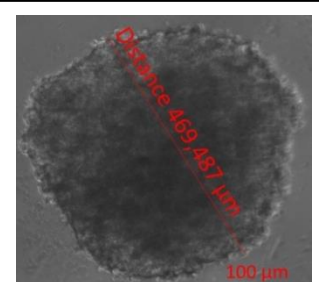
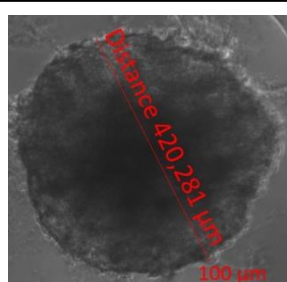
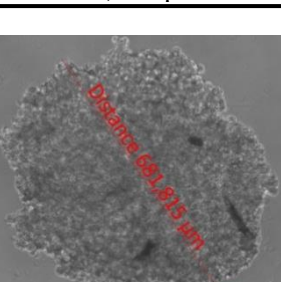
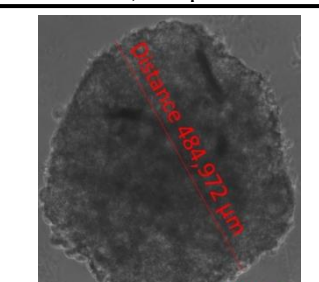
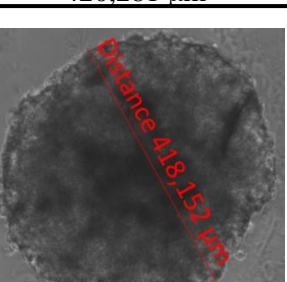
Şekil 6.1.2.2 Ishikawa hücreleri ile oluşturulan sferoidlerin üç günlük büyümesinin karşılaştırılması.

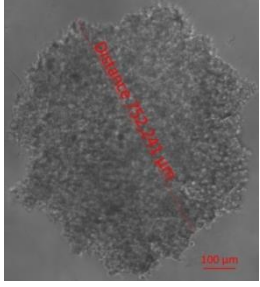
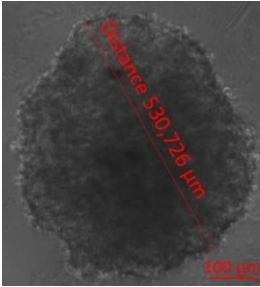
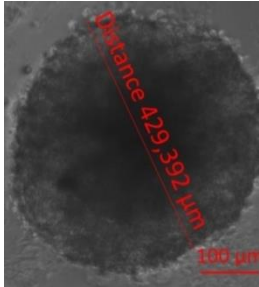
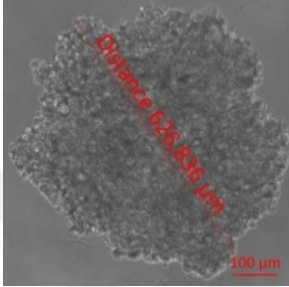
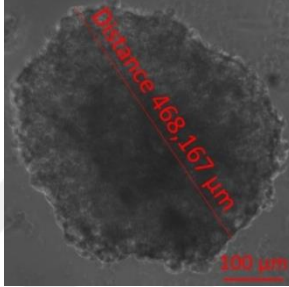
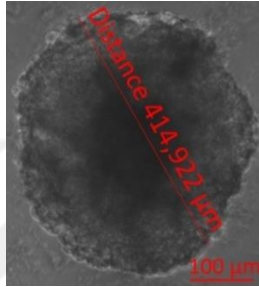
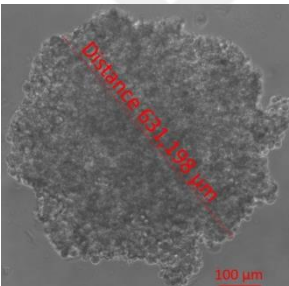
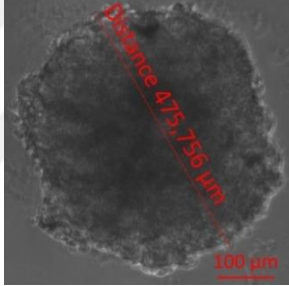
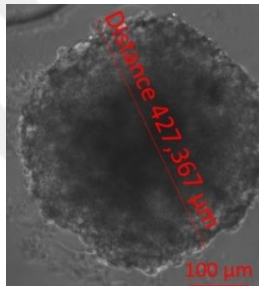
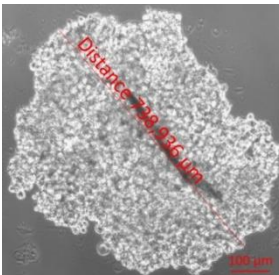
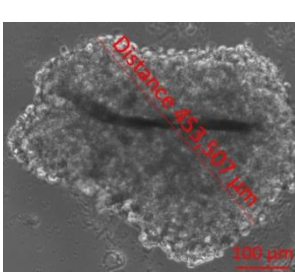
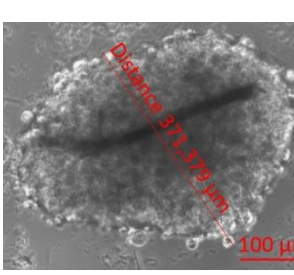
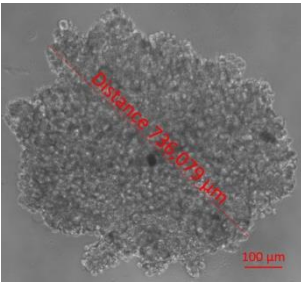
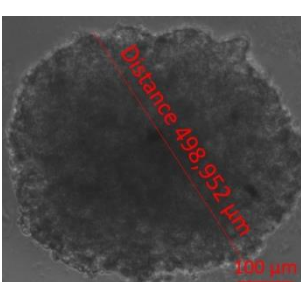
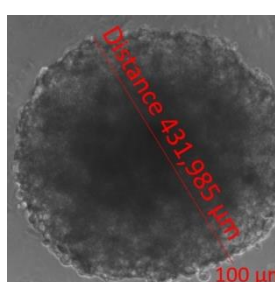
6.1.3. Huvec ve Ishikawa hücreleri ile oluşturulan üç boyutlu ko-kültür sferoidlerinin büyüklüklerinin ölçülmesi

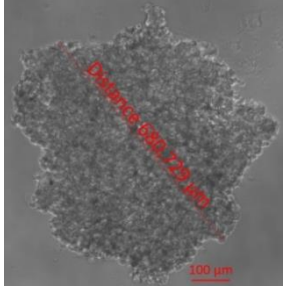
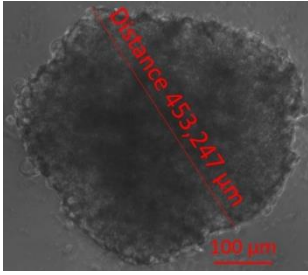
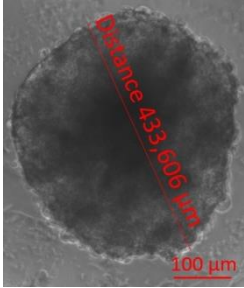
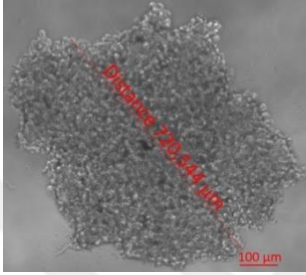
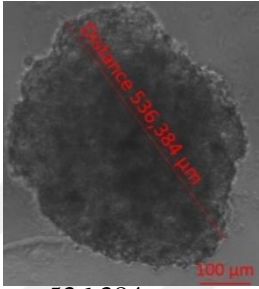
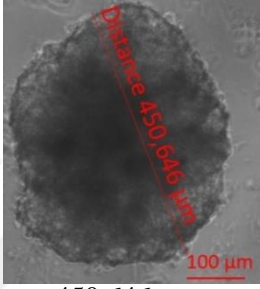
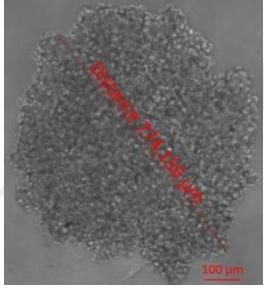
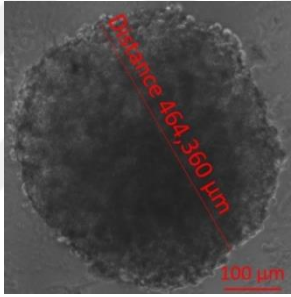
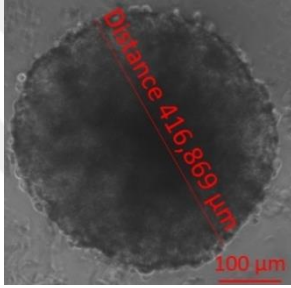
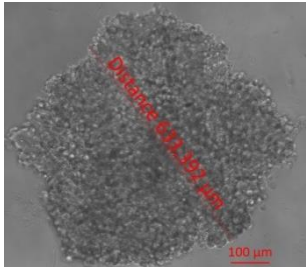
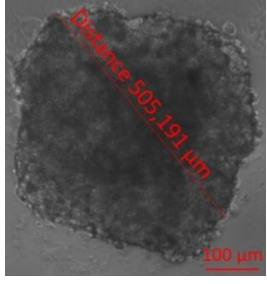
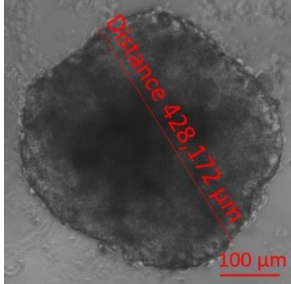
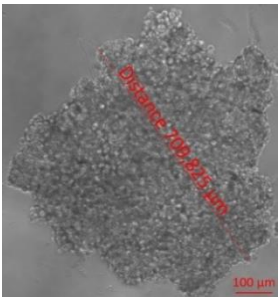
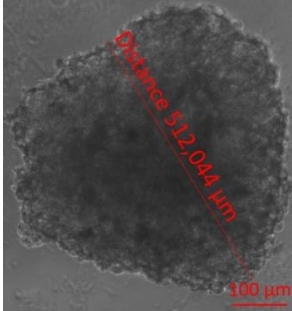
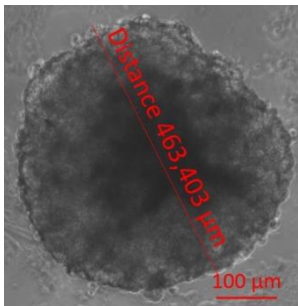
96 kuyucuklu plakaların her bir kuyusunda 5×10^3 Huvec ve 5×10^3 Ishikawa hücresi olacak şekilde ekim yapıldı. Ko-kültür sferoidlerinin 1, 2 ve 3. günlerinde ölçülen ortalama büyüklüklerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,0001$) (Şekil 6.1.3.2.).

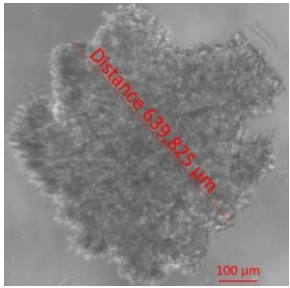
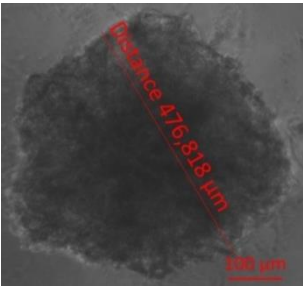
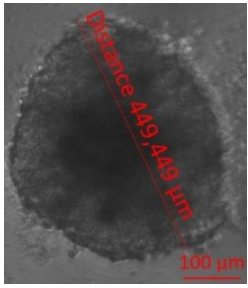
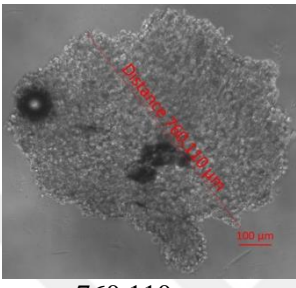
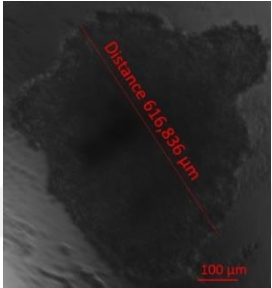
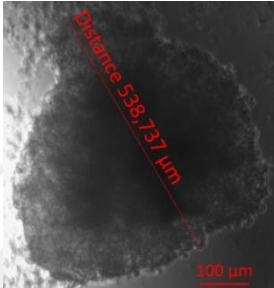
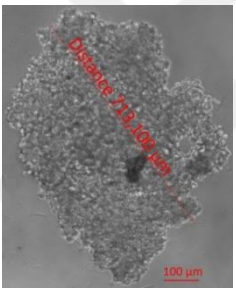
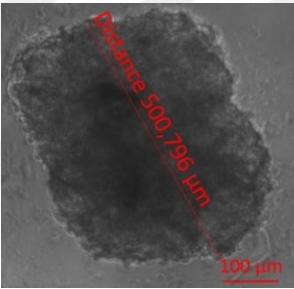
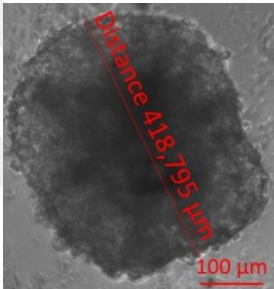
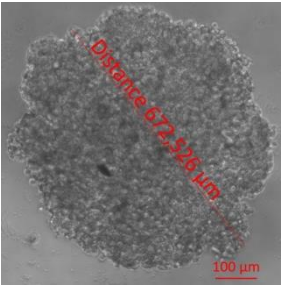
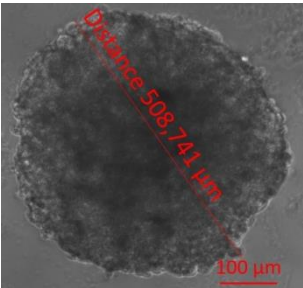
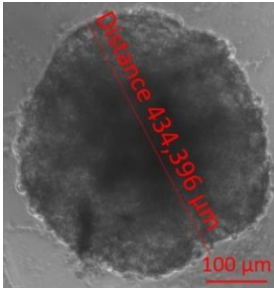
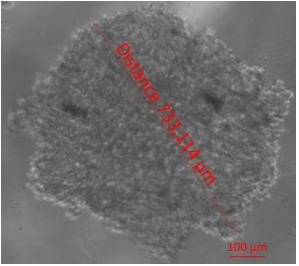
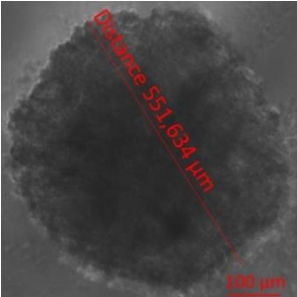
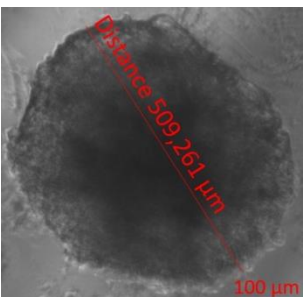
Tablo 6.1.3.1. Ko-kültür sisteminde oluşturulan sferoidlerinin üç gün boyunca ölçülen büyüklük değerleri (10X).

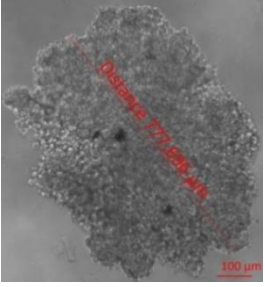
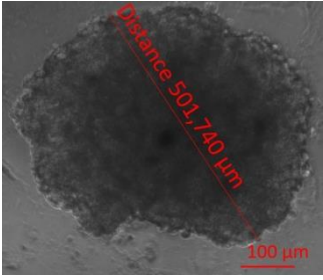
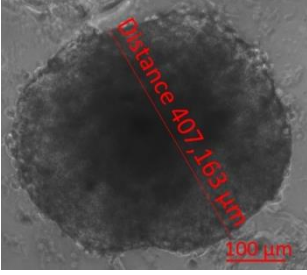
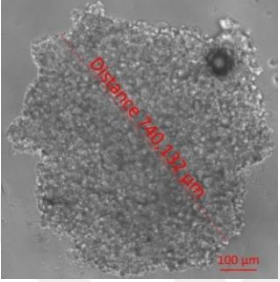
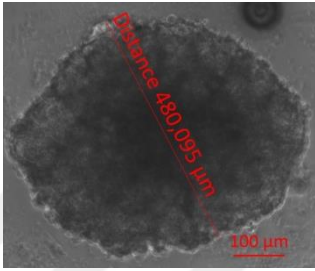
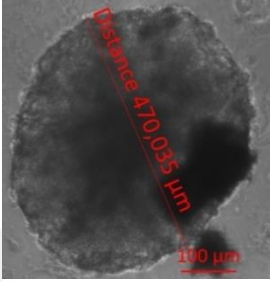
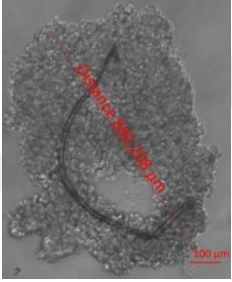
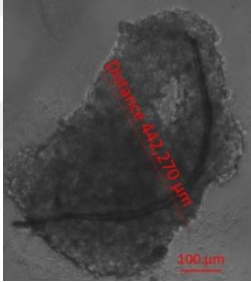
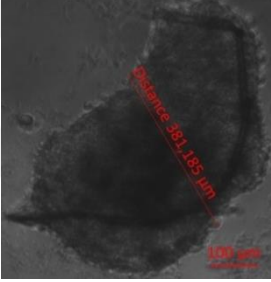
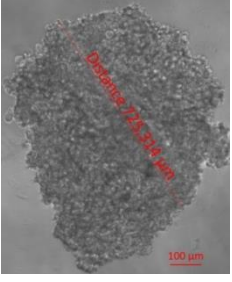
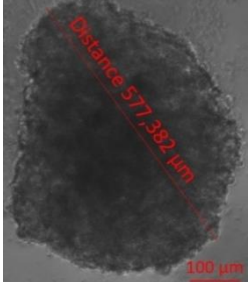
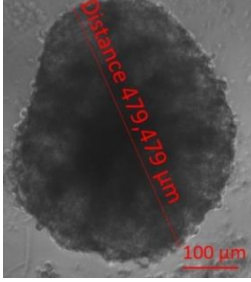
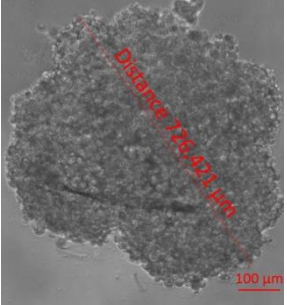
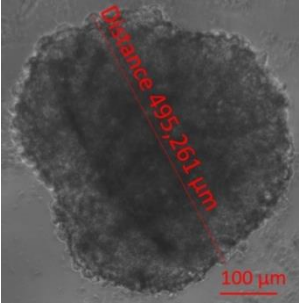
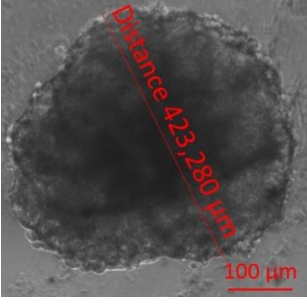
		KO-KÜLTÜR		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
1.				
	684,970 µm	469,512 µm	397,740 µm	
2.				
	794,031 µm	541,054 µm	448,053 µm	
3.				
	738,928 µm	473,863 µm	423,277 µm	

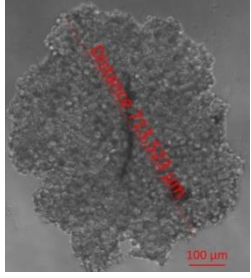
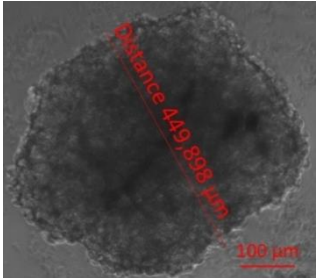
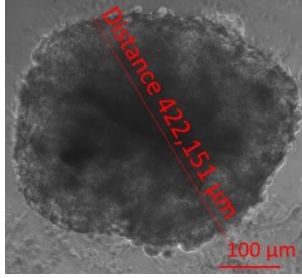
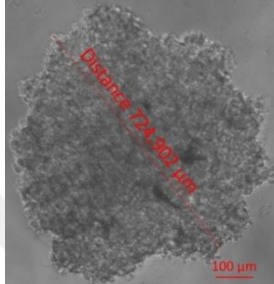
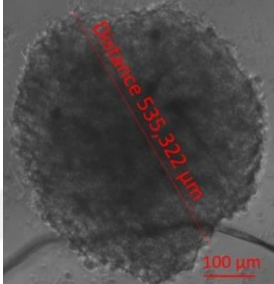
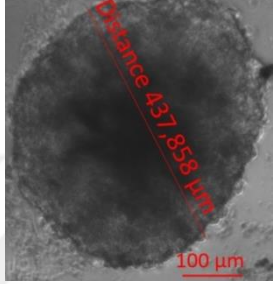
		KO-KÜLTÜR		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
4.				
	685,440 µm	502,469 µm	428,604 µm	
5.				
	641,780 µm	432,253 µm	386,199 µm	
6.				
	721,748 µm	531,598 µm	446,018 µm	
7.				
	707,340 µm	469,487 µm	420,281 µm	
8.				
	681,815 µm	484,972 µm	418,152 µm	

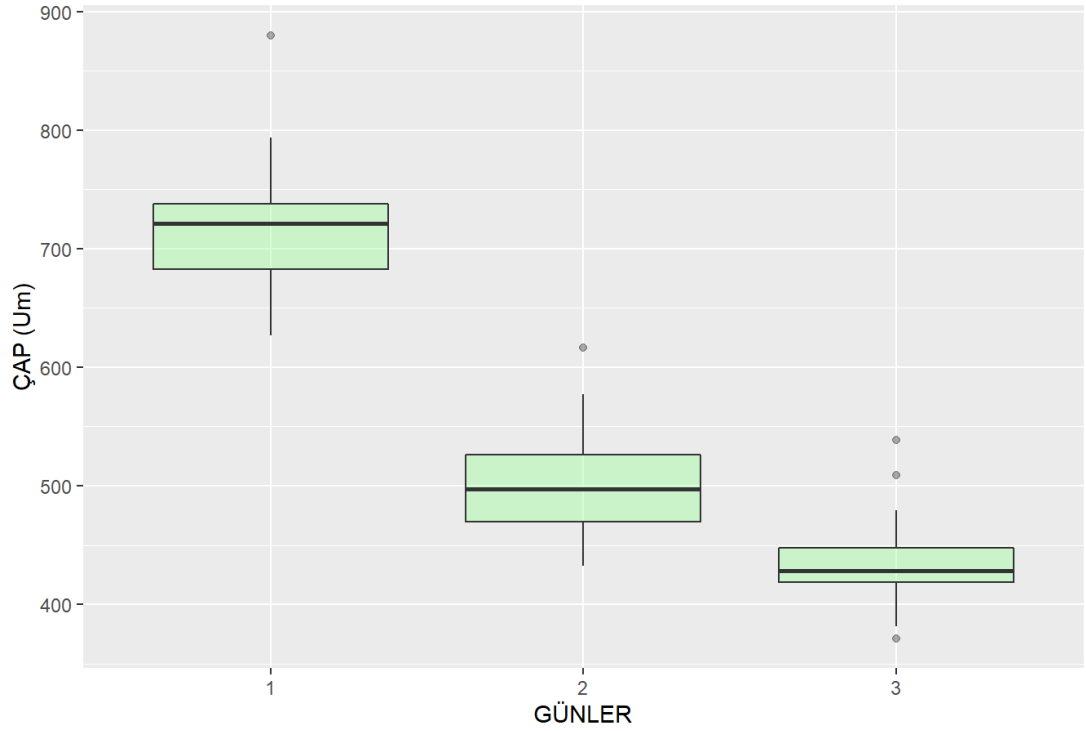
		KO-KÜLTÜR		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
9.	 752,241 µm	 530,726 µm	 429,392 µm	
10.	 626,836 µm	 468,167 µm	 414,922 µm	
11.	 631,198 µm	 475,756 µm	 427,367 µm	
12.	 738,936 µm	 453,507 µm	 371,379 µm	
13.	 736,079 µm	 498,952 µm	 431,985 µm	

		KO-KÜLTÜR		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
14.				
		680,729 µm	453,247 µm	433,606 µm
15.				
		720,544 µm	536,384 µm	450,646 µm
16.				
		774,156 µm	464,360 µm	416,869 µm
17.				
		633,392 µm	505,191 µm	428,172 µm
18.				
		709,825 µm	512,044 µm	463,403 µm

		KO-KÜLTÜR		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
19.				
	639,825 µm	476,818 µm	449,449 µm	
20.				
	760,110 µm	616,836 µm	538,737 µm	
21.				
	713,100 µm	500,796 µm	418,795 µm	
22.				
	672,526 µm	508,741 µm	434,396 µm	
23.				
	733,114 µm	551,634 µm	509,261 µm	

		KO-KÜLTÜR		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
24.				
		777,696 µm	501,740 µm	407,163 µm
25.				
		740,132 µm	480,095 µm	470,035 µm
26.				
		880,280 µm	442,270 µm	381,185 µm
27.				
		725,314 µm	577,382 µm	479,479 µm
28.				
		726,421 µm	495,261 µm	423,280 µm

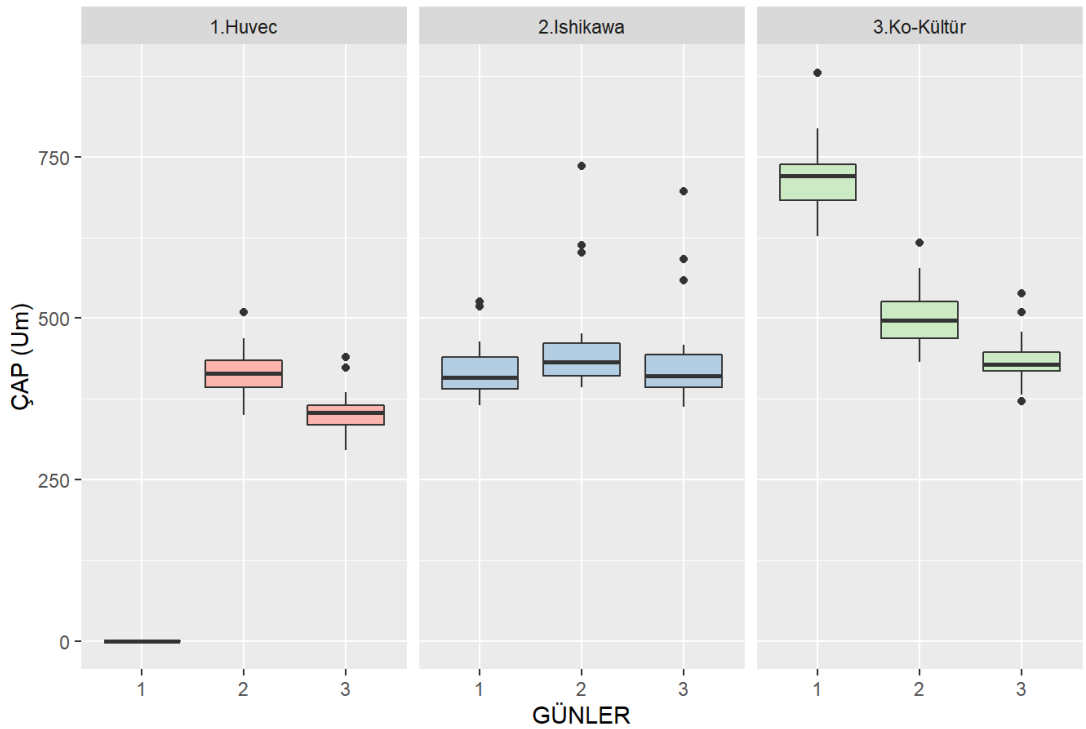
		KO-KÜLTÜR		
		1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN
29.				
	713,523 μm	449,898 μm	422,151 μm	
30.				
	724,902 μm	535,322 μm	437,858 μm	



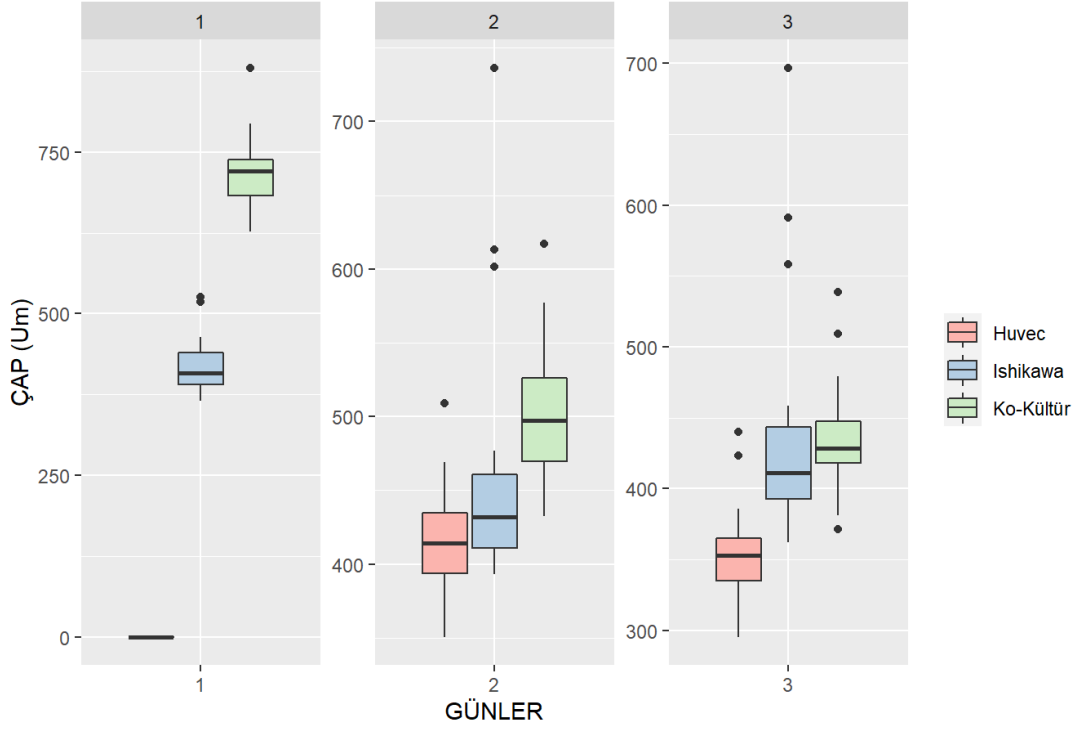
Şekil 6.1.3.2 Ko-kültür sferoidlerinin üç günlük büyümesinin karşılaştırılması.

6.2. Üç Boyutlu Mono-Kültür ve Ko-Kültür Sistemlerinde Oluşturulan Sferoidlerin Büyüklüklerinin İstatistiksel Analizi ve Karşılaştırılması

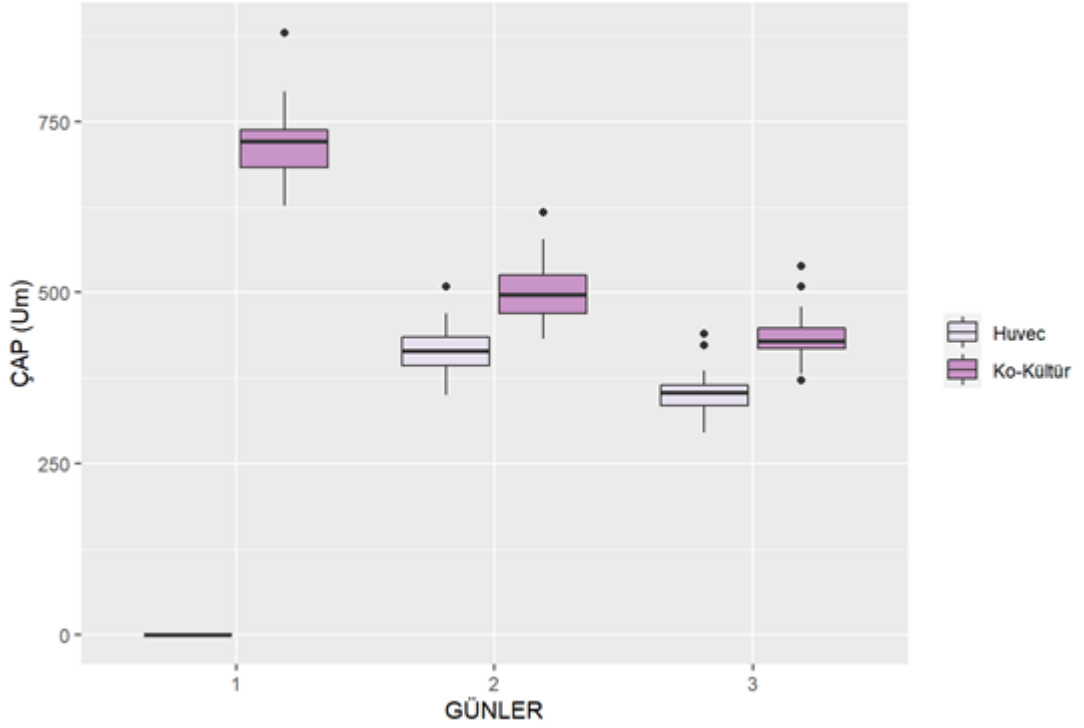
Üç boyutlu mono-kültür sisteminde oluşturulan Huvec, Ishikawa mono-sferoidleri ve ko-kültür sisteminde oluşturulan sferoidlerin üç gün boyunca kaydedilen ölçüleri kendi aralarında karşılaştırılmıştır. Huvec, Ishikawa mono-sferoid ve ko-kültür sferoidlerinin 1. gün ölçülen büyüklükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,0001$). Sferoidlerin 2. gün ölçülen büyüklükleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,0001$). Sferoidlerin 3. günlerinde Huvec ve Ishikawa mono-kültür sferoidleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,0001$). Huvec mono-kültür ve ko-kültür sferoidleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,0001$). Fakat ko-kültür ve Ishikawa mono-sferoidleri arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 6.2.2).



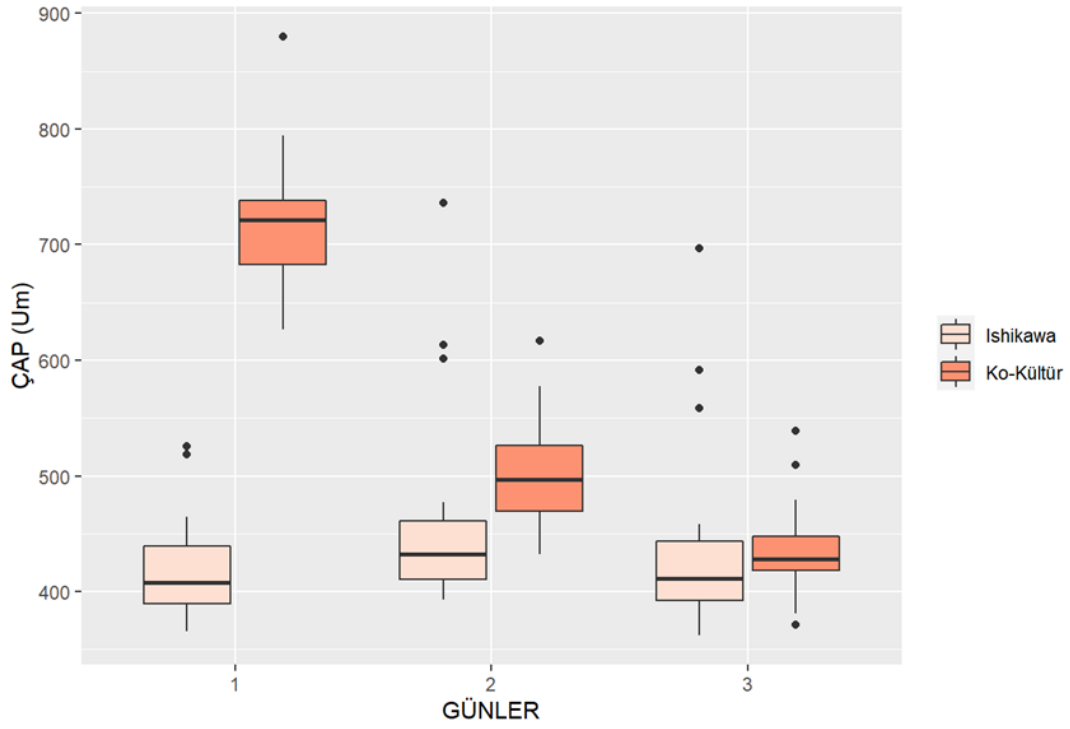
Şekil 6.2.1 Oluşturulan tüm sferoidlerin büyüklüklerindeki günlük değişimleri bir arada gösteren grafik.



Şekil 6.2.2 Her iki sistemde oluşturulan tüm sferoidlerin aynı gün içindeki büyüklüklerini karşılaştıran grafik.



Şekil 6.2.3 Huvec ve ko-kültür sferoidlerinin günlere göre büyüklüklerinin karşılaştırılması.



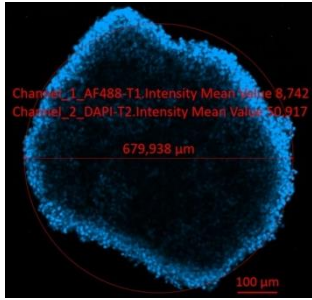
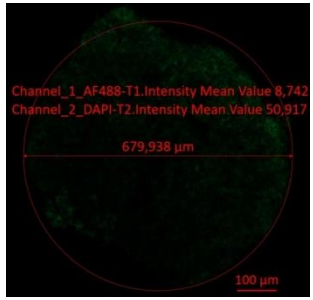
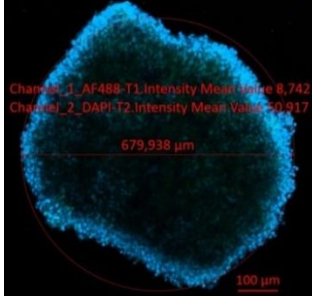
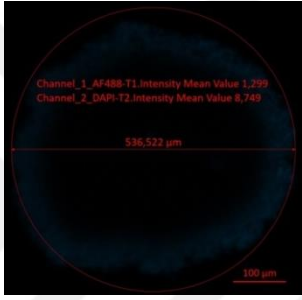
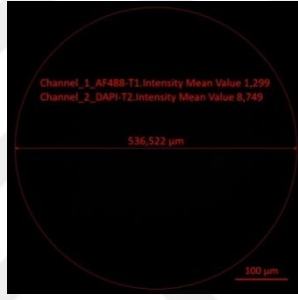
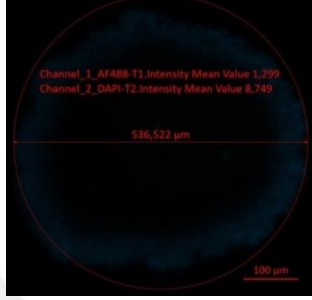
Şekil 6.2.4 Ishikawa ve ko-kültür sferoidlerinin günlere göre büyüklüklerinin karşılaştırılması.

6.3. Huvec Mono-Kültür, Ishikawa Mono-Kültür ve Ko-Kültür Sferoidlerinin E-Kaderin Antikoru ile İmmüno Floresan Boyama Görüntülerinin Değerlendirilmesi

E-Kaderin antikoru ile immüno floresan boyama yapılmış tüm sferoidlerin pozitif ve negatif örneklerinin Dapı, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada olduğu görüntüler değerlendirildi.

Tablo 6.3.1. Tüm sferoidlerin boyandıktan sonra kaydedilmiş görüntüleri (10X).

		E-KADERİN		
		DAPI	ALEXA FLUOR 488	MERGE
H U V E C	(+)			
	(-)			
I S H I K A W A	(+)			
	(-)			

		DAPI	ALEXA FLUOR 488	MERGE
K O K Ü L T Ü R	(+)			
	(-)			

6.4. Huvec Mono-Kültür Sferoidinin E-Kaderin Antikoru ile İmmüno Floresan Boyamasının Z-Stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi

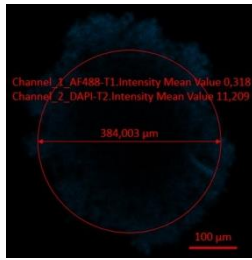
Huvec hücreleri kullanılarak oluşturulan sferoidin E-Kaderin immüno floresan boyaması yapıldıktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskopta Z-stack tekniğiyle görüntüleri alındı. Daha sonra kesitlerin Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Görüntünün belirgin olduğu kesitler DAPI, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada bulunduğu görüntüleri ayrı tablolar halinde aşağıda verilmiştir. Tüm kesitlere ait intensity ölçümleri Şekil 6.4.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 6.4.1. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerin DAPI görüntüleri (10X).

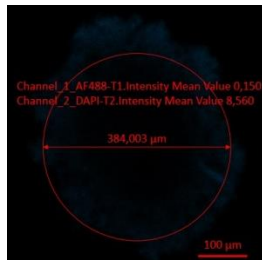
HUVEC E-KADERİN Z-STACK			
<p>25.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,001 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 2,162</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>26.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,003 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 2,499</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>27.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,003 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 2,923</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>28.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,004 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 3,439</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>29.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,005 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 4,126</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>30.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,010 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 5,090</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>31.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,017 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 6,268</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>32.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,030 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 7,995</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>33.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,061 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 10,634</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>34.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,137 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 15,280</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>35.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,328 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 24,497</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>36.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,873 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 48,142</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>37.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,637 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 80,597</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>38.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 5,296 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 93,242</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>39.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 5,955 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 85,724</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>40.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 4,969 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 68,056</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>41.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,600 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 47,984</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>42.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,340 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 32,097</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>43.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 1,319 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 21,817</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>44.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,651 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 15,201</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>

HUVEC E-KADERİN Z-STACK

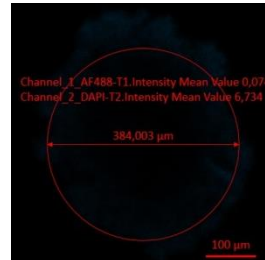
45.Kesit



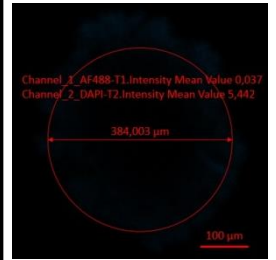
46.Kesit



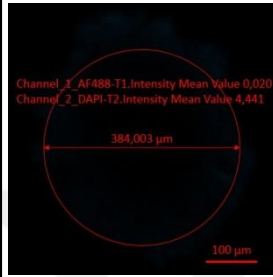
47.Kesit



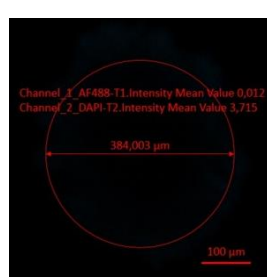
48.Kesit



49.Kesit



50.Kesit

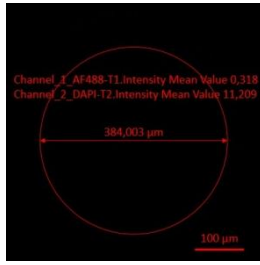


Tablo 6.4.2. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri (10X).

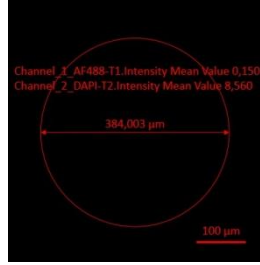
HUVEC E-KADERİN Z-STACK			
<p>25.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,001 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 2,162</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>26.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,002 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 2,499</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>27.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,003 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 2,923</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>28.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,004 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 3,439</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>29.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,005 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 4,126</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>30.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,010 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 5,050</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>31.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,017 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 6,268</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>32.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,030 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 7,995</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>33.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,061 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 10,634</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>34.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,137 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 15,280</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>35.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,328 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 24,497</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>36.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,873 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 48,142</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>37.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,537 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 80,597</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>38.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 5,296 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 93,242</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>39.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 5,955 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 85,724</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>40.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 4,969 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 68,056</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>41.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,600 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 47,984</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>42.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,340 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 32,097</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>43.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 1,319 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 21,812</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>44.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,651 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 15,201</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p>

HUVEC E-KADERİN Z-STACK

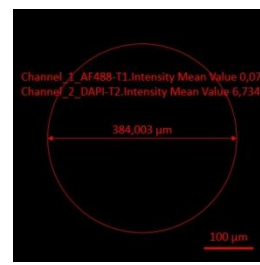
45.Kesit



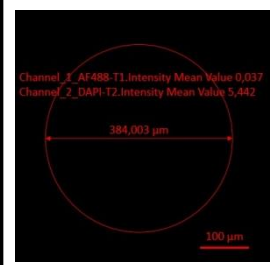
46.Kesit



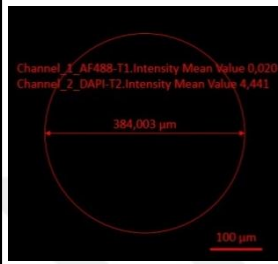
47.Kesit



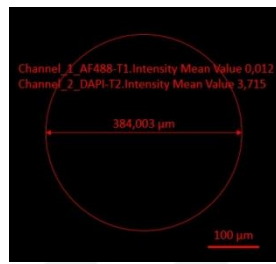
48.Kesit



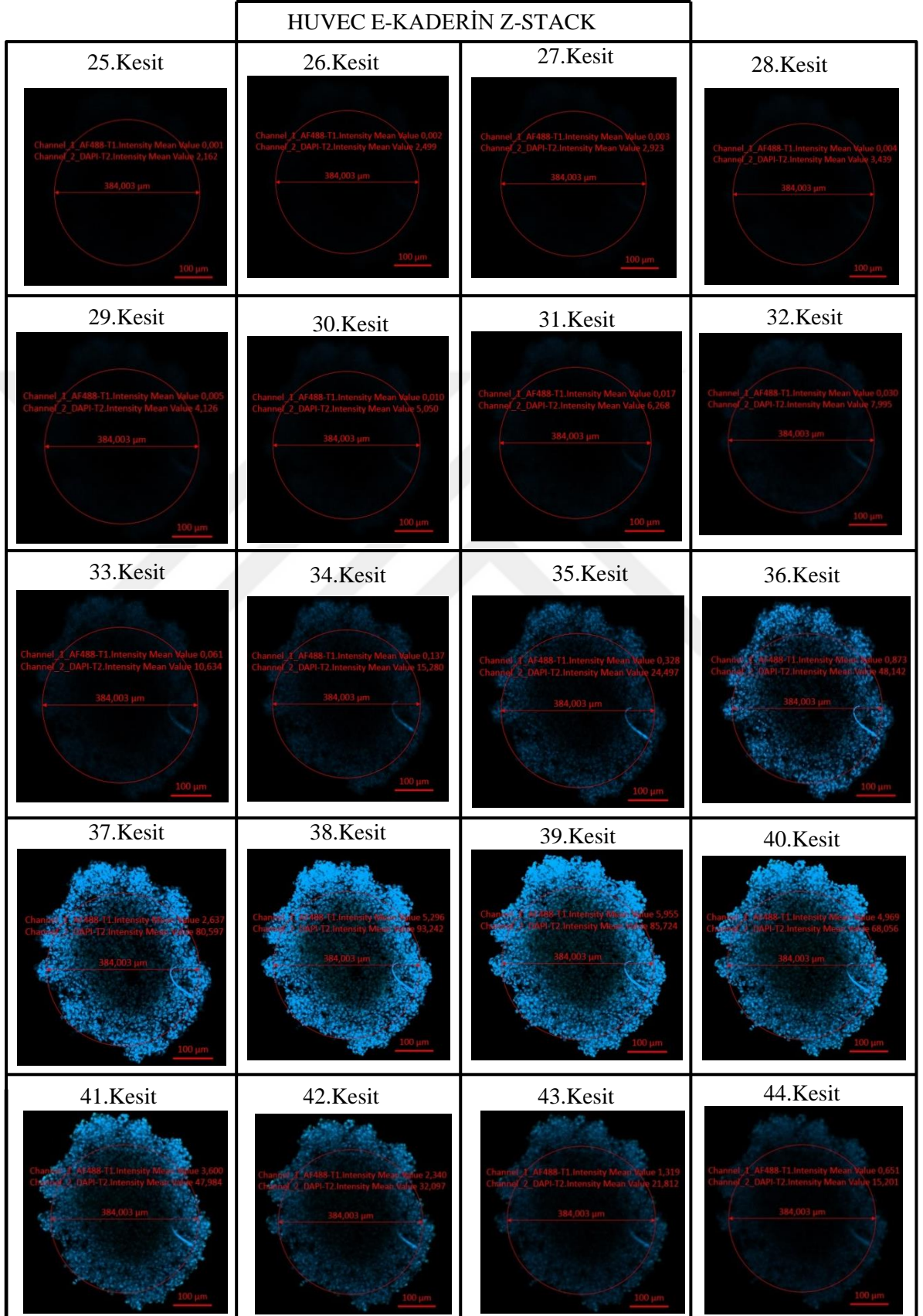
49.Kesit



50.Kesit

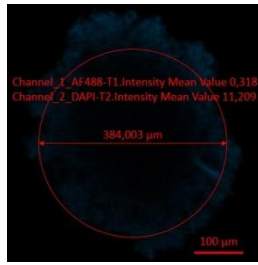


Tablo 6.4.3. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).

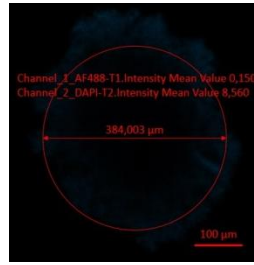


HUVEC E-KADERİN Z-STACK

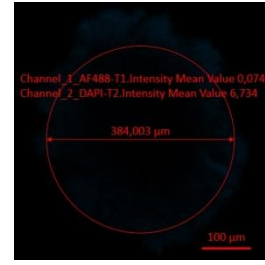
45.Kesit



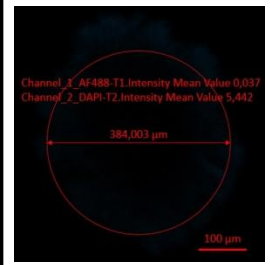
46.Kesit



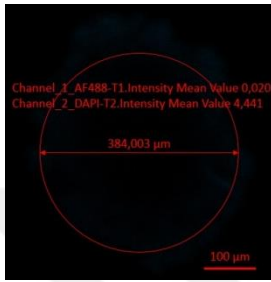
47.Kesit



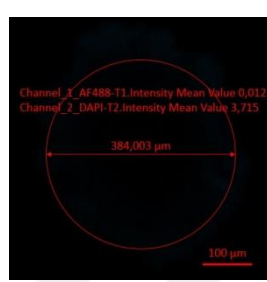
48.Kesit

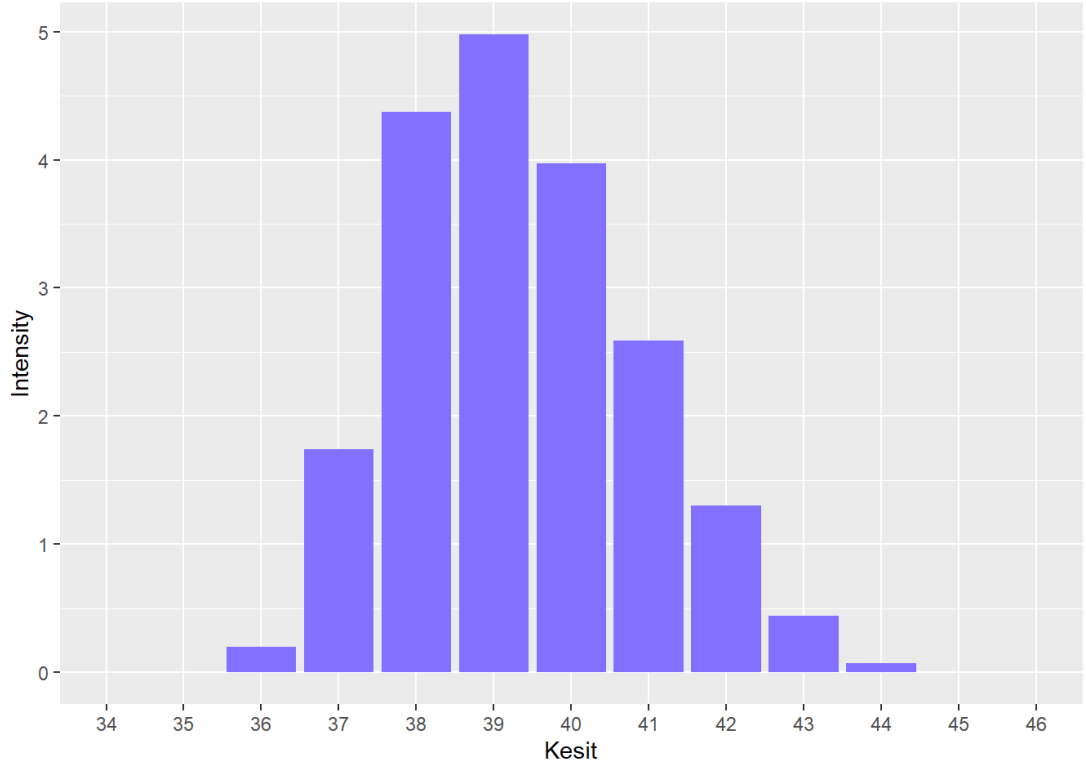


49.Kesit



50.Kesit



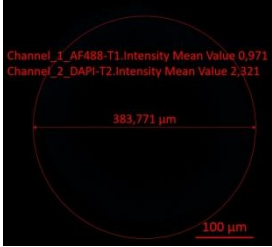
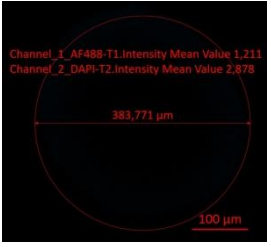
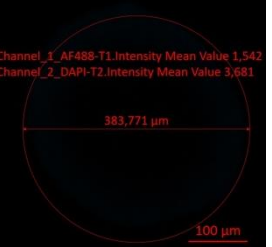
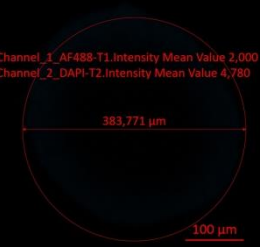


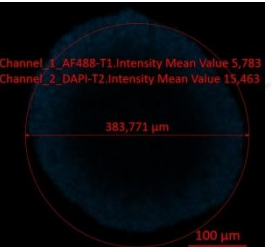
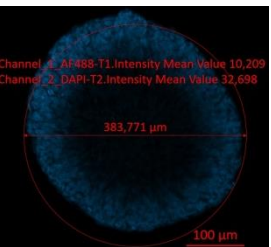
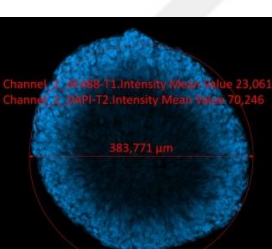
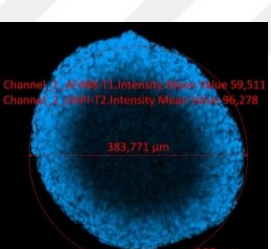
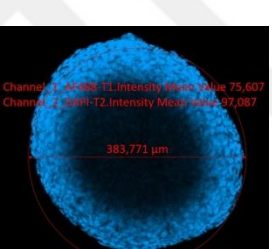
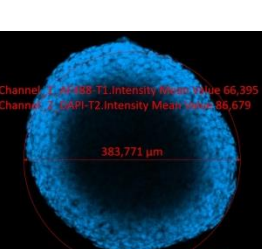
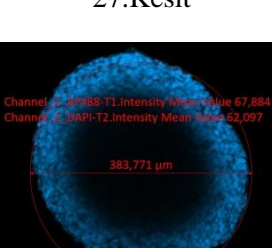
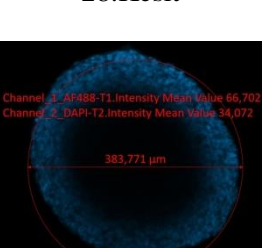
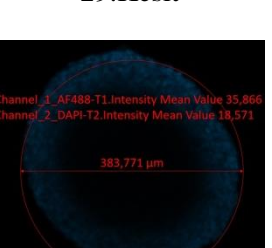
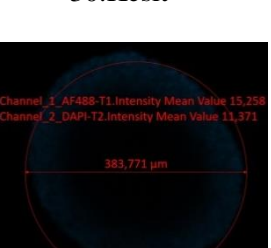






Şekil 6.4.4. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.

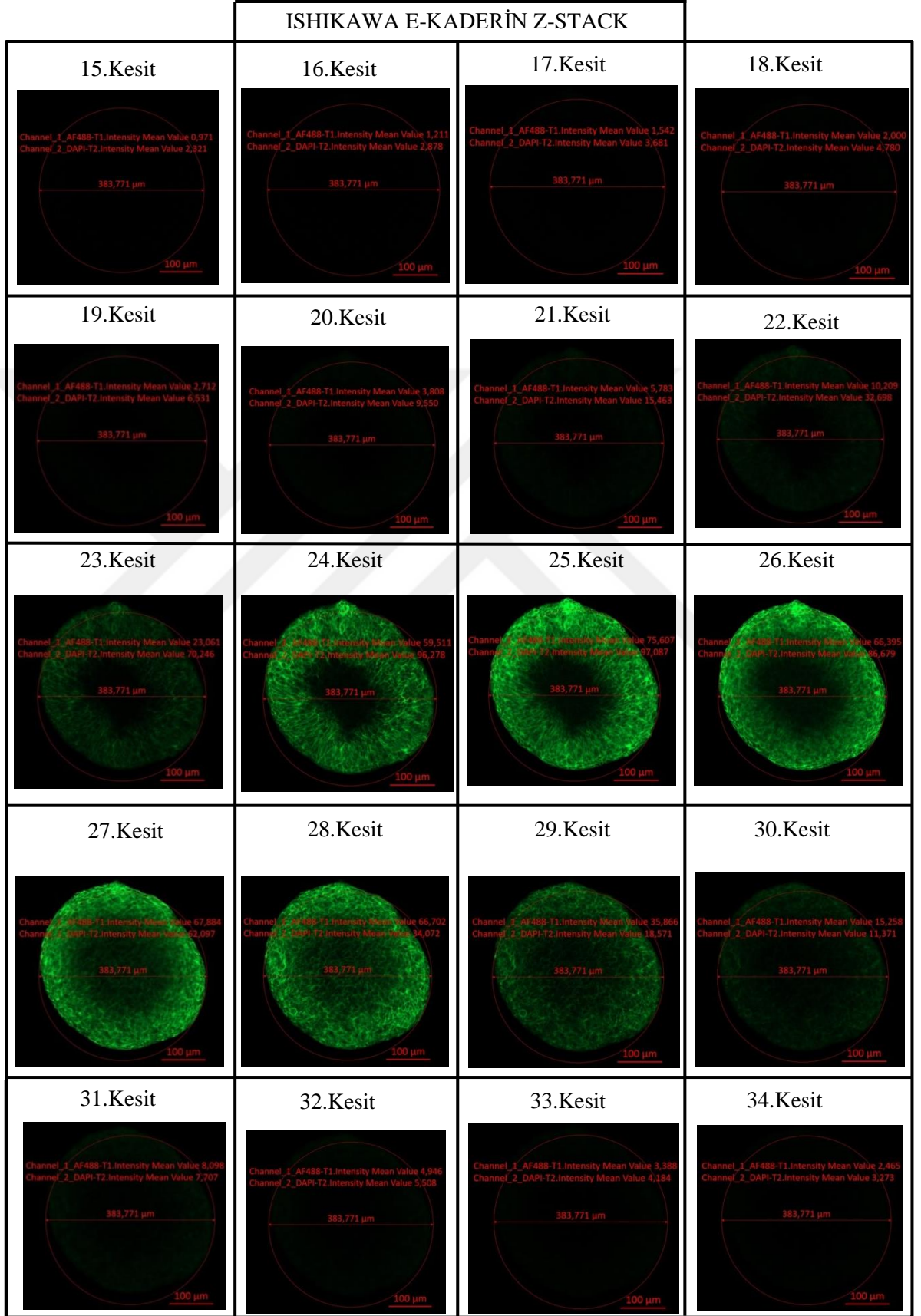
6.5. Ishikawa Mono-Kültür Sferoidinin E-Kaderin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-Stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Ishikawa hücreleriyle oluşturulan sferoidin E-Kaderin immünofloresan boyaması yapıldıktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskop aracılığıyla Z-stack optik kesitleri alındı. Daha sonra kesitlerin Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Görüntünün belirgin olduğu kesitler DAPI, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada bulunduğu görüntüler ayrı tablolar halinde aşağıda verilmiştir. Tüm kesitlere ait intensity ölçümleri Şekil 6.5.4.'de gösterilmiştir.

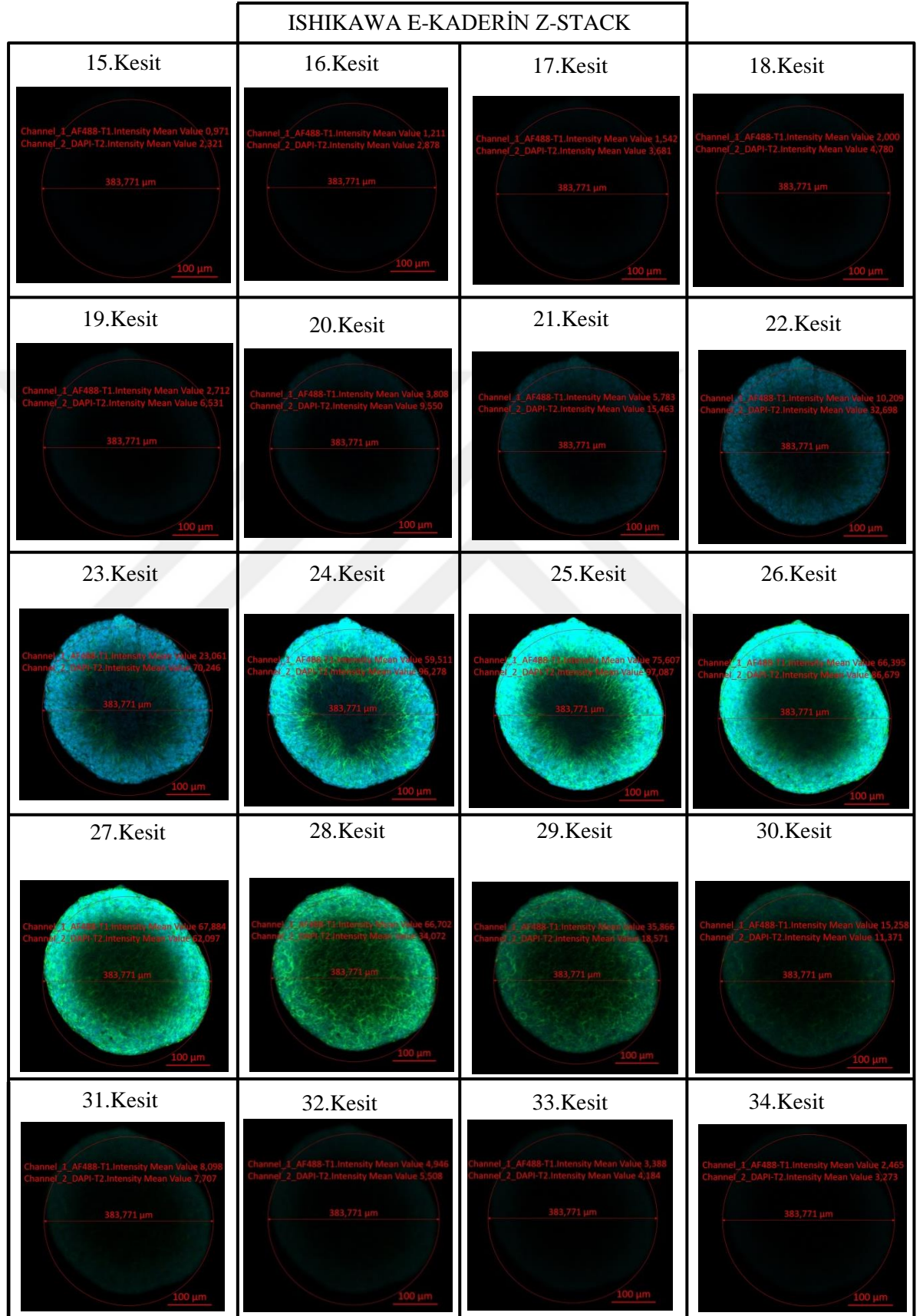
Tablo 6.5.1. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri(10X).

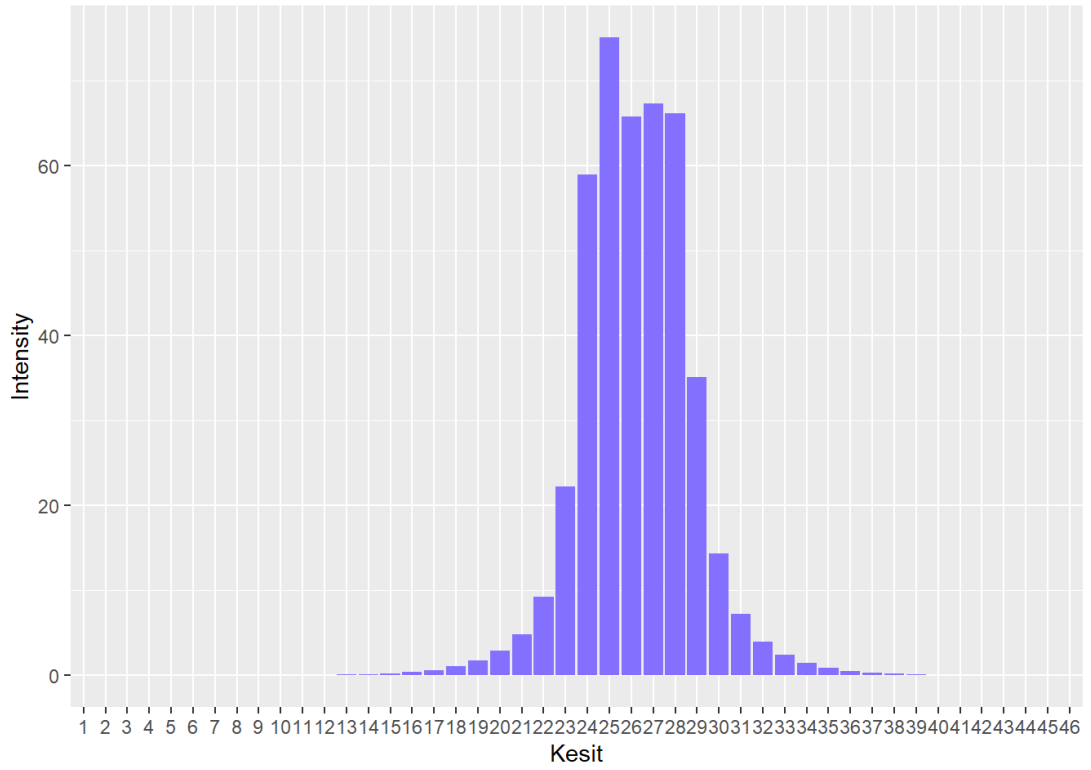
ISHIKAWA E-KADERİN Z-STACK			
<p>15.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,971 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 2,321</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>16.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 1,211 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 2,878</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>17.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 1,542 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 3,681</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>18.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,000 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 4,780</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>19.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,712 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 6,531</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>20.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,808 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 9,550</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>21.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 5,783 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 15,463</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>22.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 10,209 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 32,698</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>23.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 23,061 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 70,246</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>24.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 59,511 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 96,278</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>25.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 75,607 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 97,087</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>26.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 66,395 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 88,679</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>27.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 67,884 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 82,097</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>28.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 66,702 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 34,072</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>29.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 35,866 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 18,571</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>30.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 15,258 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 11,371</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>31.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 8,098 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 7,707</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>32.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 4,948 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 5,508</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>33.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,388 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 4,184</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>34.Kesit</p>  <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,465 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 3,273</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p>

Tablo 6.5.2. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).



Tablo 6.5.3. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).





Şekil 6.5.4. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.

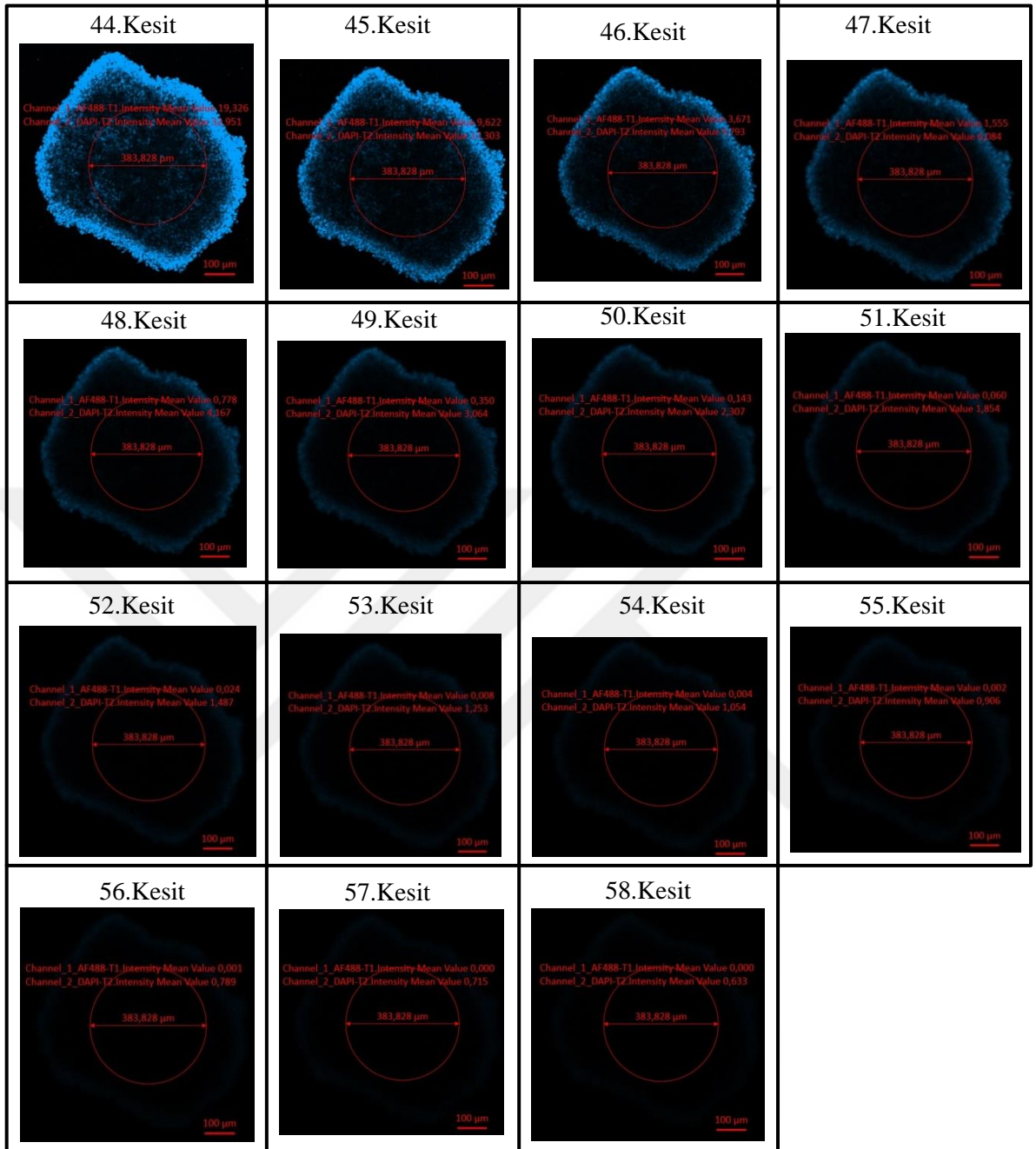
6.6. Huvec ve Ishikawa Ko-Kültür Sferoidinin E-Kaderin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-Stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Huvec ve Ishikawa hücreleriyle oluşturulan ko-kültür sferoidinin E-Kaderin immünofloresan boyaması yapıldıktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskop aracılığıyla Z-stack optik kesitleri alındı. Daha sonra kesitlerin Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Görüntünün belirgin olduğu kesitler DAPI, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada bulunduğu görüntüler ayrı tablolar halinde aşağıda verilmiştir. Tüm kesitlere ait intensity ölçümleri Şekil 6.6.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 6.6.1. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri(10X).

KO-KÜLTÜR E-KADERİN Z-STACK			
<p>24.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,000 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 0,492</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>25.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,000 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 0,543</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>26.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,000 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 0,597</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>27.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,000 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 0,666</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>28.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,000 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 0,742</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>29.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,000 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 0,843</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>30.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,001 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 0,969</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>31.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,002 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 1,130</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>32.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,005 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 1,350</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>33.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,012 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 1,631</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>34.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,028 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 2,081</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>35.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,079 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 2,738</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>36.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,207 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 3,773</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>37.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 0,477 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 5,757</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>38.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 1,015 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 15,018</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>39.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 2,229 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 42,745</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>
<p>40.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 6,819 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 144,530</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>41.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 19,432 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 433,693</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>42.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 27,982 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 65,730</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>	<p>43.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1_Intensity Mean Value 26,116 Channel_2_DAPI-TZ_Intensity Mean Value 62,115</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p>

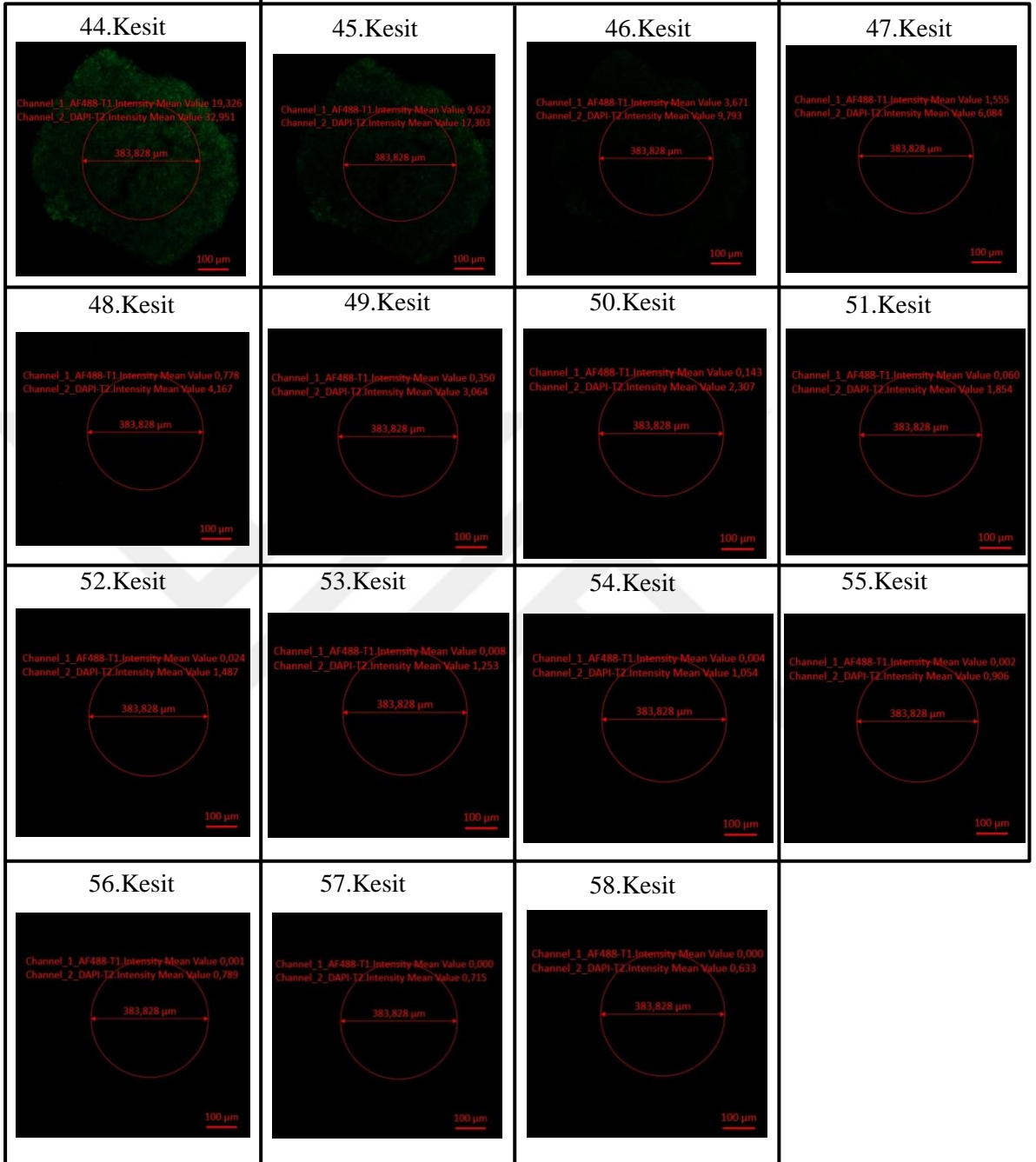
KO-KÜLTÜR E-KADERİN Z-STACK



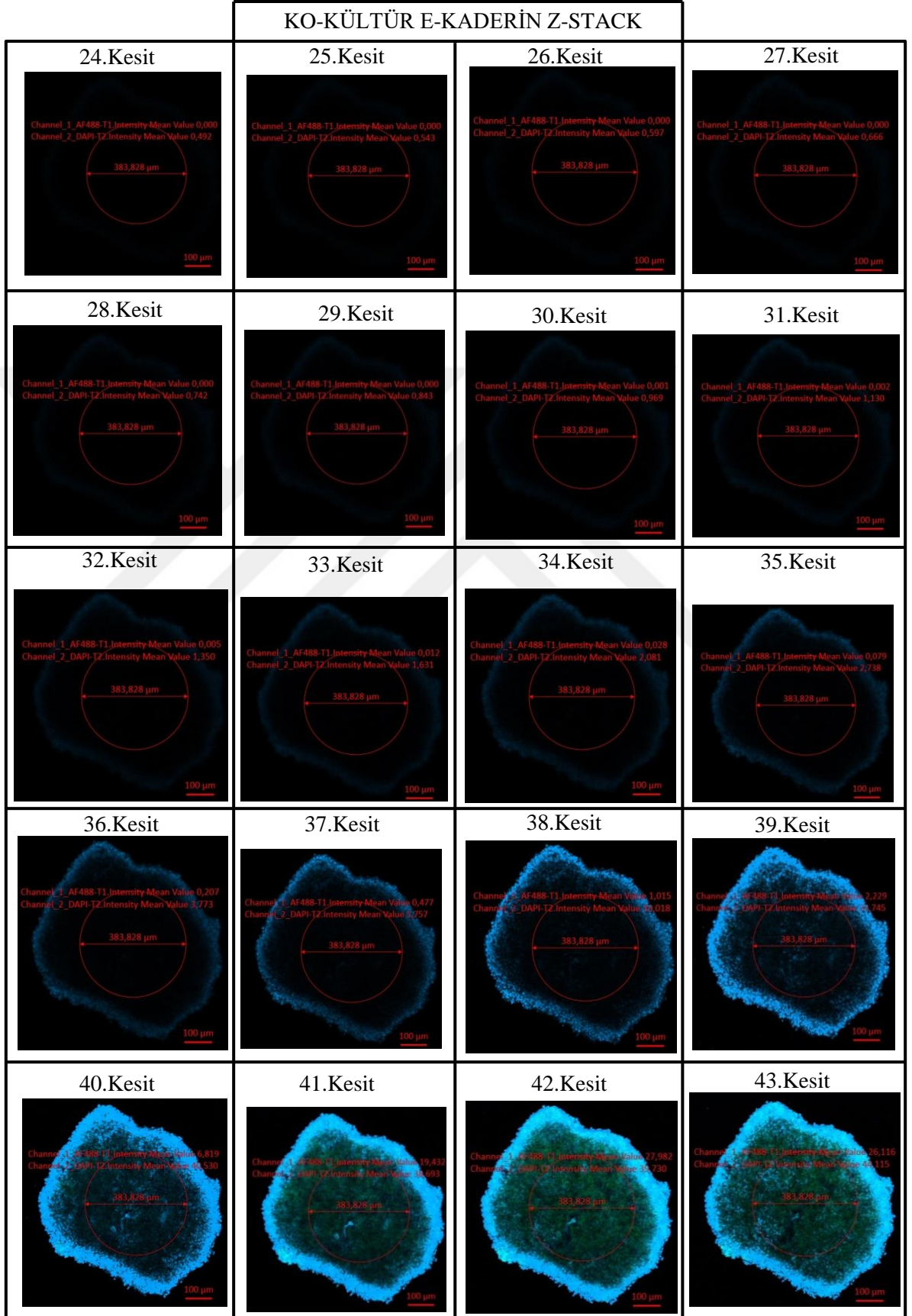
Tablo 6.6.2. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).

KO-KÜLTÜR E-KADERİN Z-STACK			
<p>24.Kesit</p>	<p>25.Kesit</p>	<p>26.Kesit</p>	<p>27.Kesit</p>
<p>28.Kesit</p>	<p>29.Kesit</p>	<p>30.Kesit</p>	<p>31.Kesit</p>
<p>32.Kesit</p>	<p>33.Kesit</p>	<p>34.Kesit</p>	<p>35.Kesit</p>
<p>36.Kesit</p>	<p>37.Kesit</p>	<p>38.Kesit</p>	<p>39.Kesit</p>
<p>40.Kesit</p>	<p>41.Kesit</p>	<p>42.Kesit</p>	<p>43.Kesit</p>

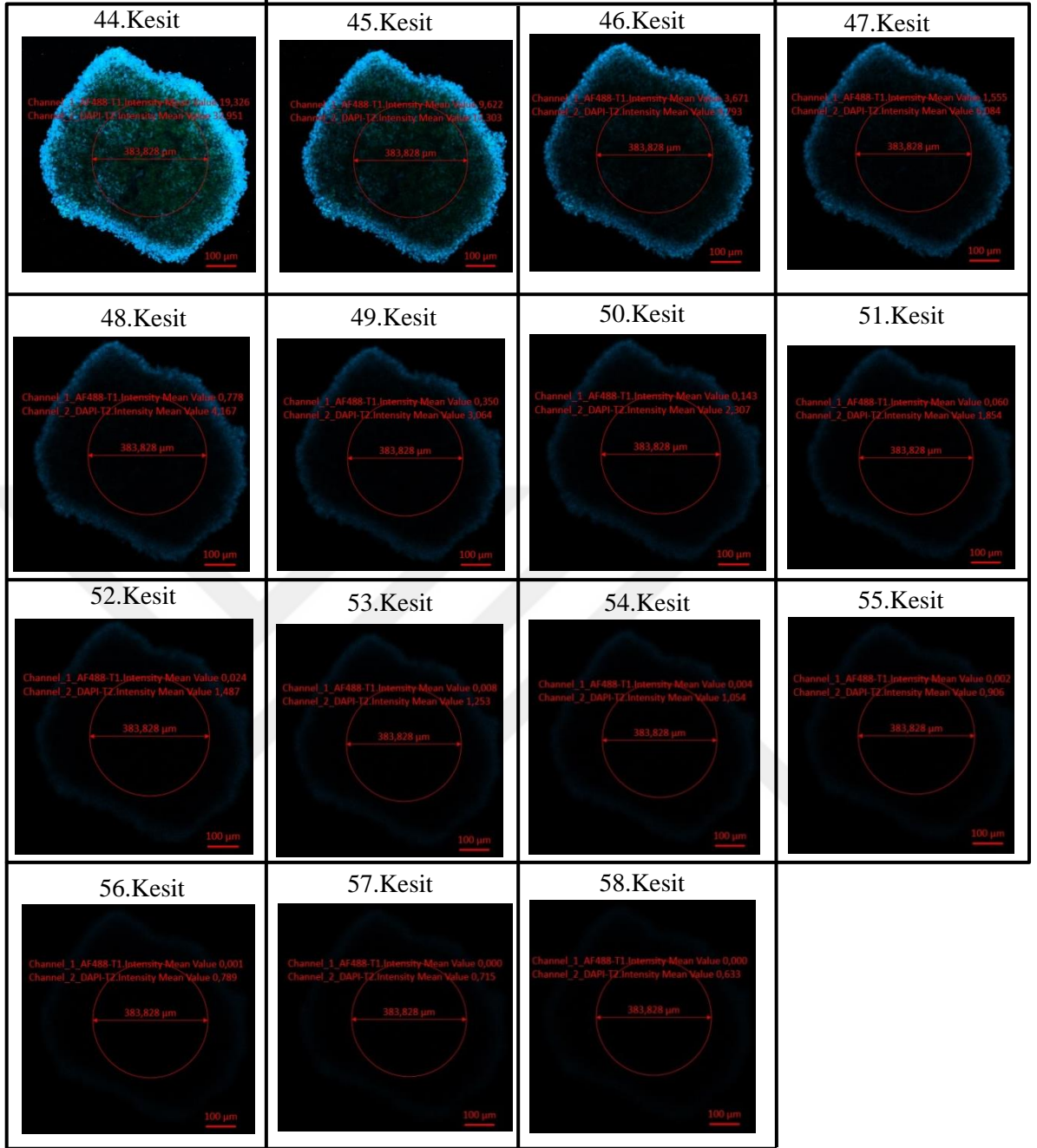
KO-KÜLTÜR E-KADERİN Z-STACK

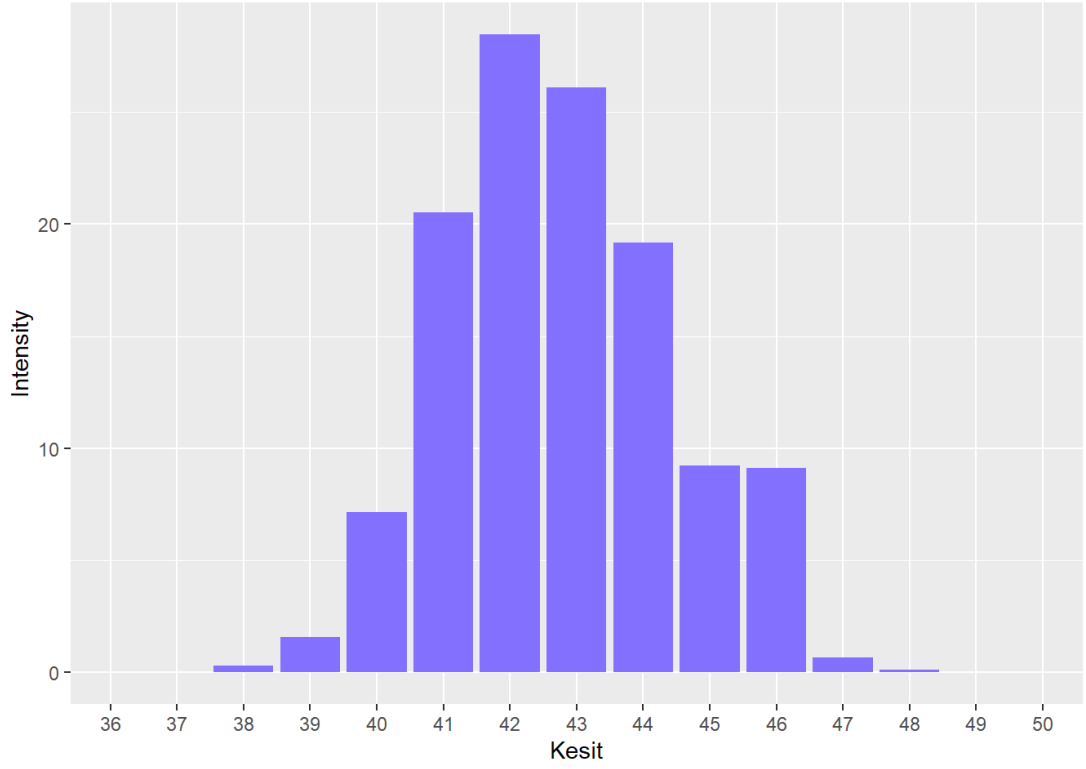


Tablo 6.6.3. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).



KO-KÜLTÜR E-KADERİN Z-STACK





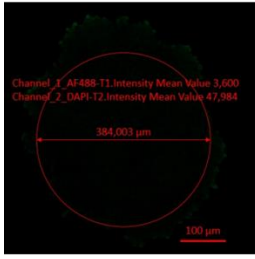
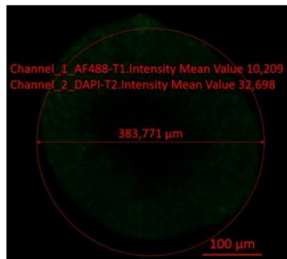
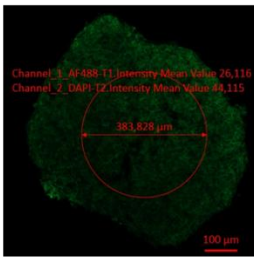
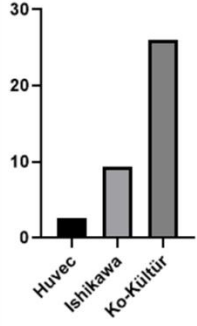
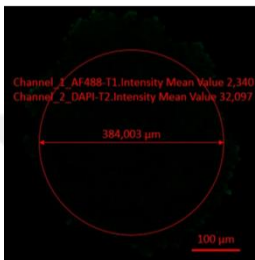
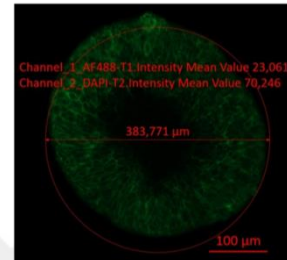
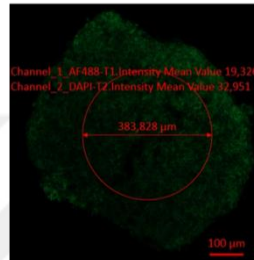
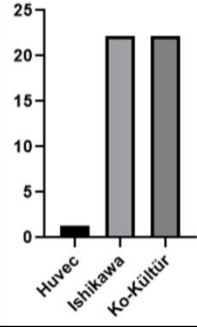
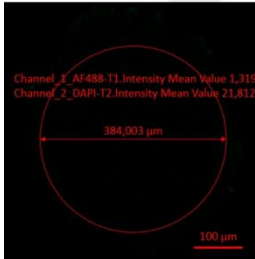
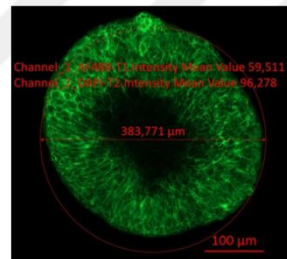
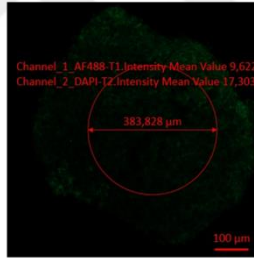
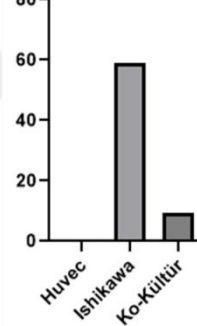
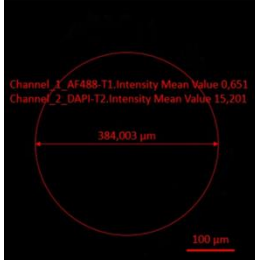
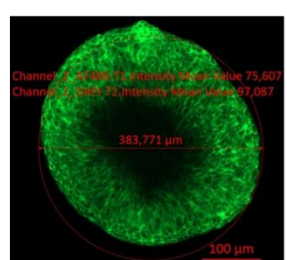
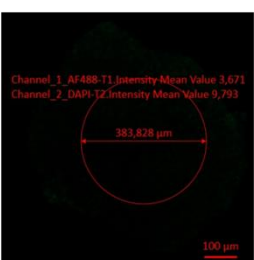
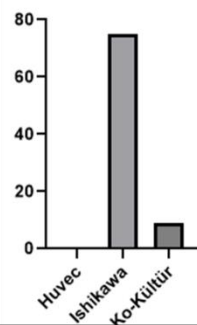
Şekil 6.6.4. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.

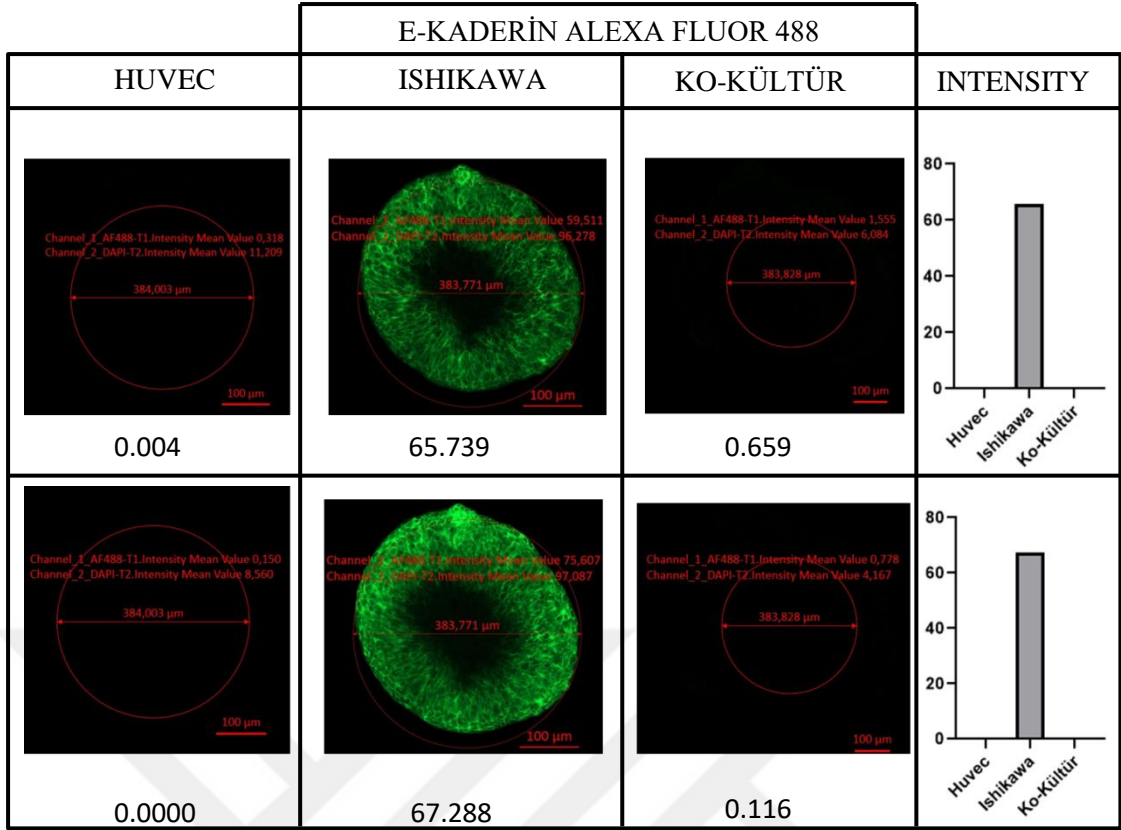
6.7. Huvec, Ishikawa Mono-Kültür ve Ko-Kültür Sferoidlerinin Alexa Fluor 488 İntensity Ölçümlerinin İmage J ile Değerlendirilmesi

Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin Z-stack optik kesitleri alındıktan sonra Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Sferoidlerin görünmeye başladığı kesitten itibaren 10 tanesi seçilerek sferoidler arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Tablo 6.7.1. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin aynı kesitlerinde intensity değerlerinin karşılaştırılması.

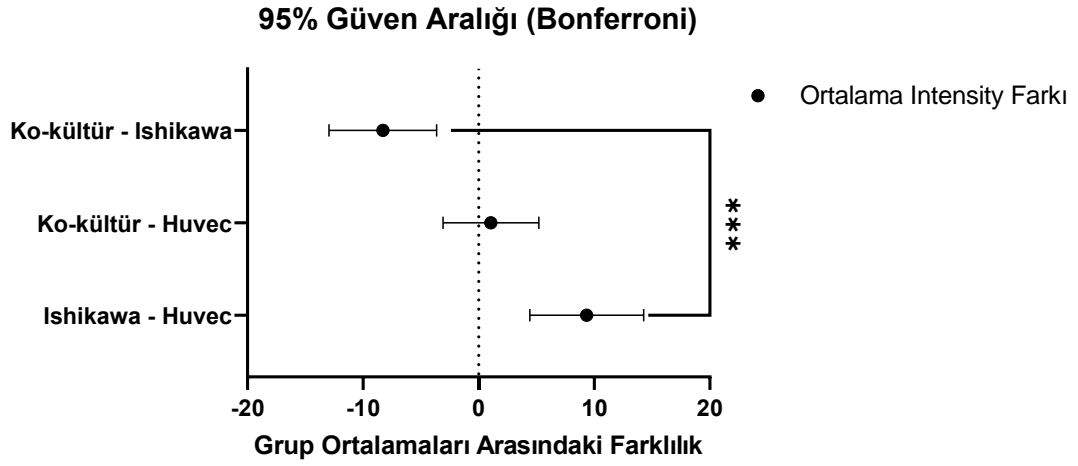
E-KADERİN ALEXA FLUOR 488			
HUVEC	ISHIKAWA	KO-KÜLTÜR	INTENSITY
<p>1.744</p>	<p>1.069</p>	<p>1.564</p>	
<p>4.375</p>	<p>1.806</p>	<p>7.14</p>	
<p>4.977</p>	<p>2.883</p>	<p>20.516</p>	
<p>3.971</p>	<p>4.837</p>	<p>28.46</p>	

E-KADERİN ALEXA FLUOR 488											
HUVEC	ISHIKAWA	KO-KÜLTÜR	INTENSITY								
 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,600 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 47,984</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p> <p>2.589</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 10,209 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 32,698</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p> <p>9.302</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 26,118 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 48,115</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p> <p>26.084</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>2.589</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>9.302</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>26.084</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	2.589	Ishikawa	9.302	Ko-Kültür	26.084
Cell Type	Intensity										
Huvec	2.589										
Ishikawa	9.302										
Ko-Kültür	26.084										
 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,340 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 32,097</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p> <p>1.304</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 23,061 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 70,246</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p> <p>22.244</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 19,326 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 32,951</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p> <p>22.244</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>1.304</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>22.244</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>22.244</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	1.304	Ishikawa	22.244	Ko-Kültür	22.244
Cell Type	Intensity										
Huvec	1.304										
Ishikawa	22.244										
Ko-Kültür	22.244										
 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 1,319 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 21,812</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p> <p>0.443</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 59,511 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 96,278</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p> <p>58.96</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 9,622 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 17,303</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p> <p>9.231</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>0.443</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>58.96</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>9.231</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	0.443	Ishikawa	58.96	Ko-Kültür	9.231
Cell Type	Intensity										
Huvec	0.443										
Ishikawa	58.96										
Ko-Kültür	9.231										
 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 0,651 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 15,201</p> <p>384,003 µm</p> <p>100 µm</p> <p>0.072</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 75,607 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 87,087</p> <p>383,771 µm</p> <p>100 µm</p> <p>75.078</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,671 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 9,793</p> <p>383,828 µm</p> <p>100 µm</p> <p>9.1334</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>0.072</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>75.078</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>9.1334</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	0.072	Ishikawa	75.078	Ko-Kültür	9.1334
Cell Type	Intensity										
Huvec	0.072										
Ishikawa	75.078										
Ko-Kültür	9.1334										



6.7.2. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümlerinin istatistiksel analizi

Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin Z-stack optik kesitleri alındıktan sonra Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Ishikawa ve Huvec mono-sferoidlerinin optik kesitlerinin intensity değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,0001$) (Şekil 6.7.2.1.). Ko-kültür sferoidi ve Ishikawa mono-sferoidinin optik kesitlerinin intensity değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,0001$) (Şekil 6.7.2.1.).

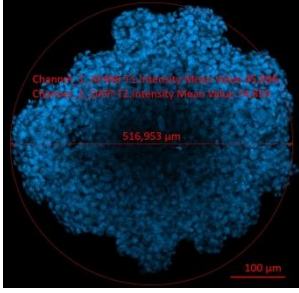
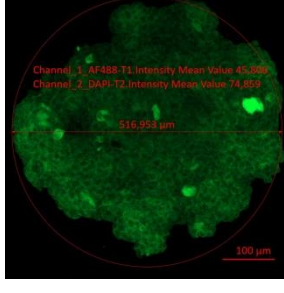
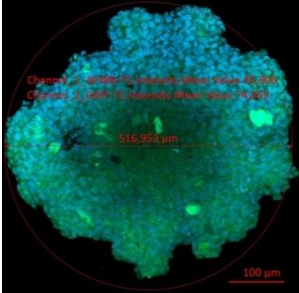
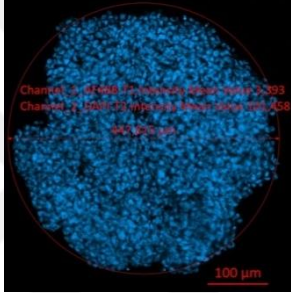

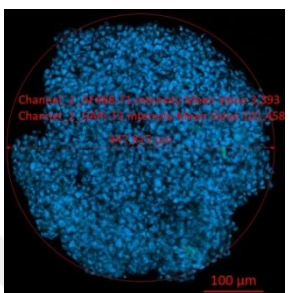
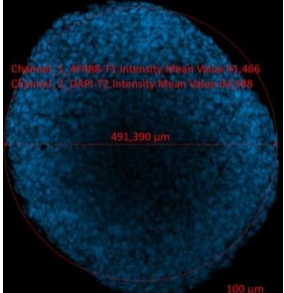
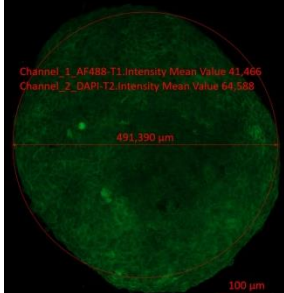
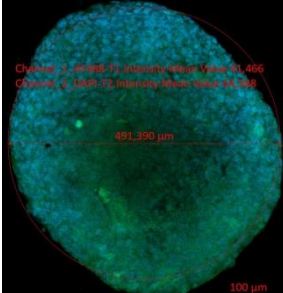
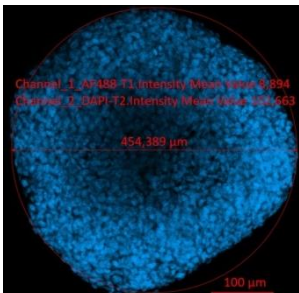

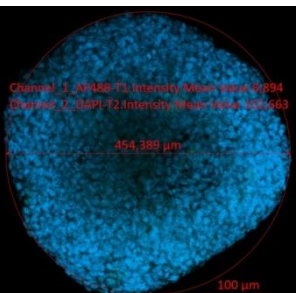


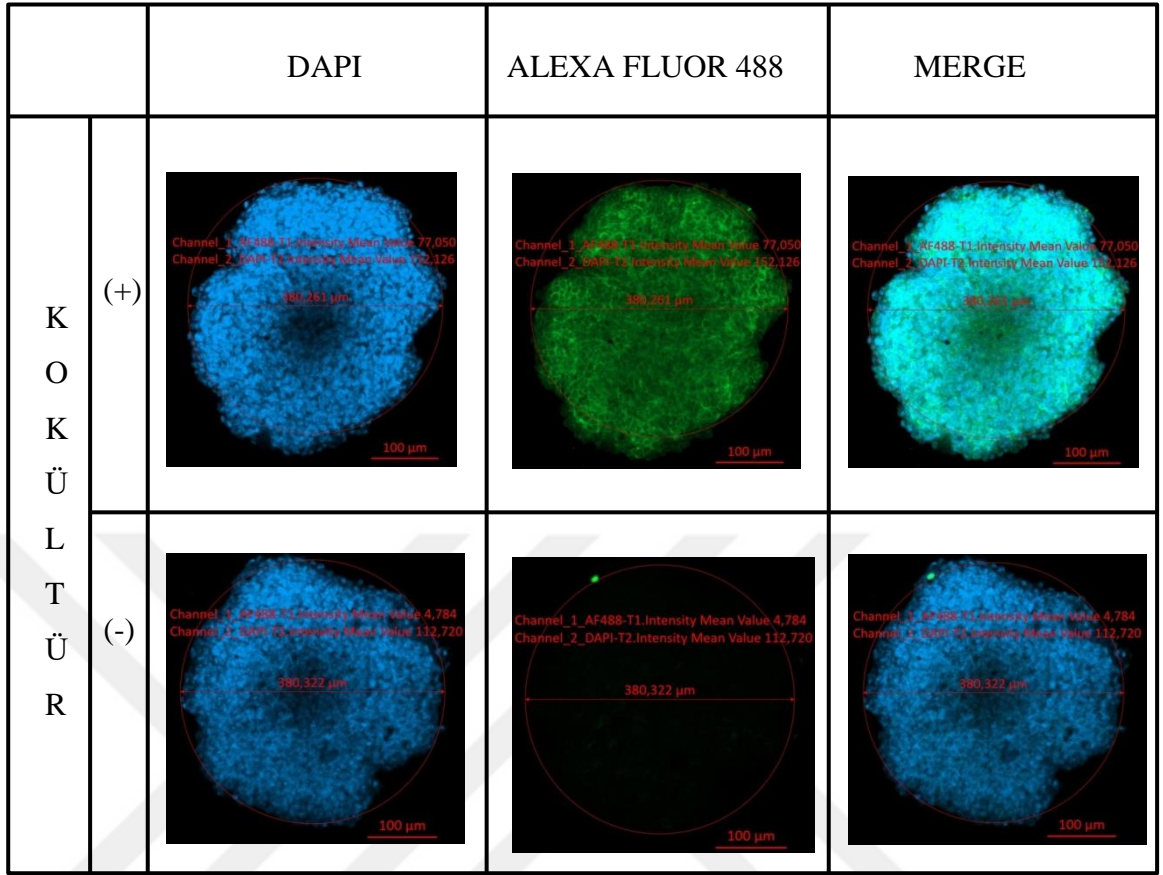
Şekil 6.7.2.1. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidleri arasında yapılan çoklu karşılaştırma testinin sonucu. (***) $p < 0,0001$)

6.8. Huvec Mono-Kültür, Ishikawa Mono-kültür ve Ko-kültür Sferoidlerinin β -Katenin Antikoru ile İmmünofloresan Boyama Görüntülerinin Değerlendirilmesi

β -Katenin antikoru ile immünofloresan boyama yapılmış tüm sferoidlerin pozitif ve negatif örneklerinin Dapı, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada olduğu görüntüler değerlendirildi.

Tablo 6.8.1. Tüm sferoidlerin boyandıktan sonra kaydedilen görüntüleri (10X).

		β -KATENİN		
		DAPI	ALEXA FLUOR 488	MERGE
H U V E C	(+)			
	(-)			
I S H I K A W A	(+)			
	(-)			



6.9. Huvec Mono-Kültür Sferoidinin β -Katenin Antikoru ile İmmüno Floresan Boyamasının Z-Stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin β -Katenin immüno floresan boyaması yapıldı. Daha sonra lazer taramalı konfokal mikroskopta Z-stack optik kesitleri alındı. Daha sonra kesitlerin Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Görüntünün belirgin olduğu kesitler DAPI, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada bulunduğu görüntüler ayrı tablolar halinde aşağıda verilmiştir. Tüm kesitlere ait intensity ölçümleri Şekil 6.9.4.'de gösterilmiştir.

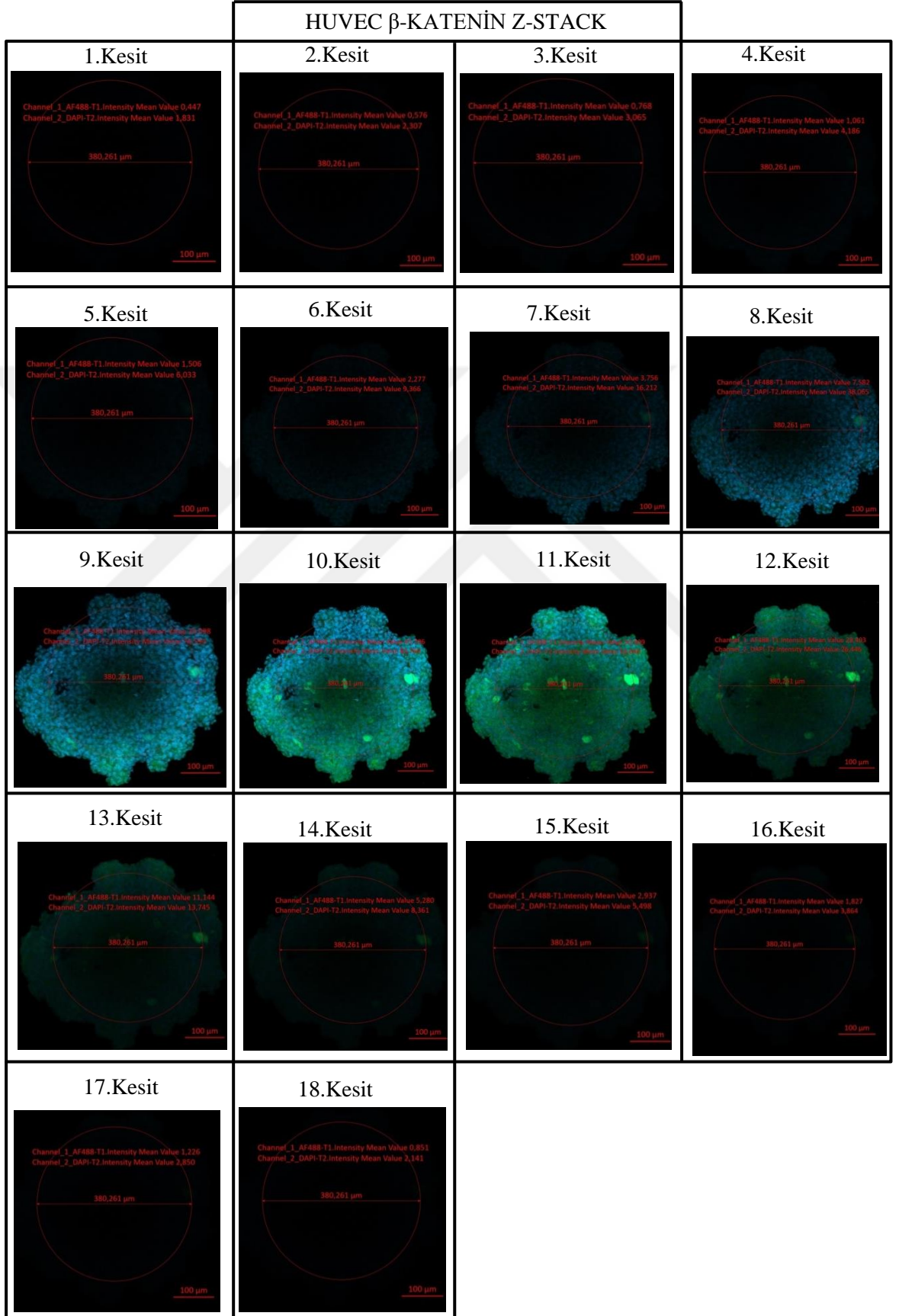
Tablo 6.9.1. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri(10X)

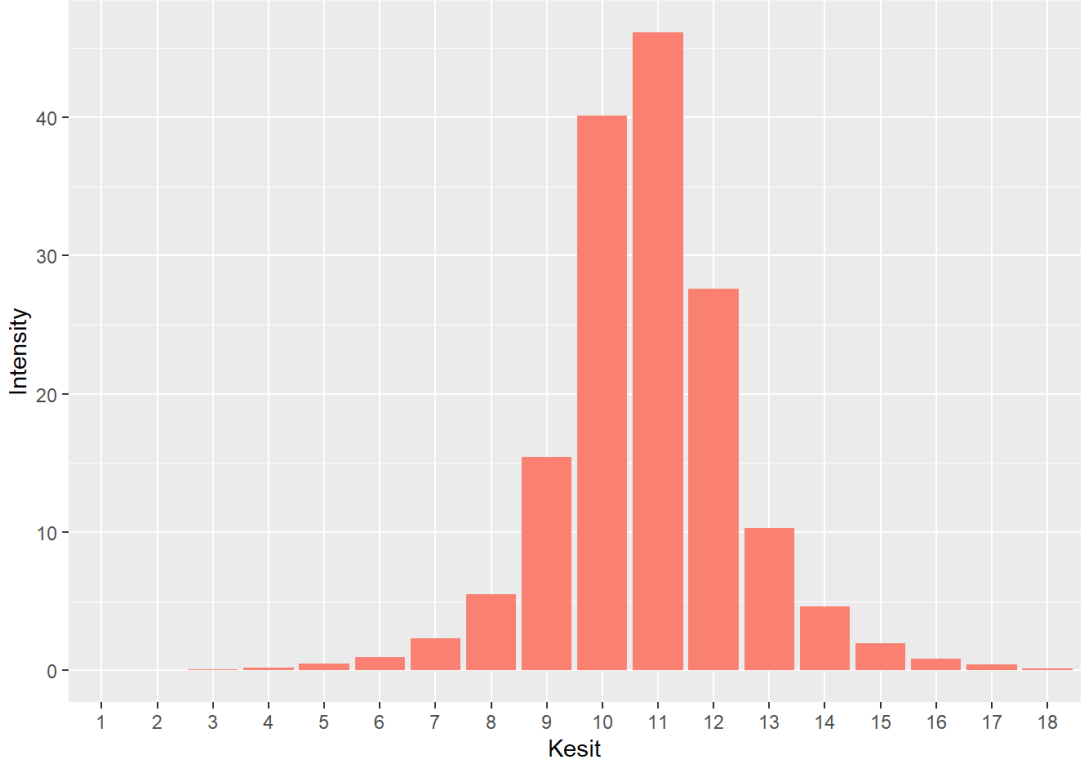
HUVEC β -KATENİN Z-STACK			
<p>1.Kesit</p>	<p>2.Kesit</p>	<p>3.Kesit</p>	<p>4.Kesit</p>
<p>5.Kesit</p>	<p>6.Kesit</p>	<p>7.Kesit</p>	<p>8.Kesit</p>
<p>9.Kesit</p>	<p>10.Kesit</p>	<p>11.Kesit</p>	<p>12.Kesit</p>
<p>13.Kesit</p>	<p>14.Kesit</p>	<p>15.Kesit</p>	<p>16.Kesit</p>
<p>17.Kesit</p>	<p>18.Kesit</p>		

Tablo 6.9.2. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).

HUVEC β -KATENİN Z-STACK			
<p>1.Kesit</p>	<p>2.Kesit</p>	<p>3.Kesit</p>	<p>4.Kesit</p>
<p>5.Kesit</p>	<p>6.Kesit</p>	<p>7.Kesit</p>	<p>8.Kesit</p>
<p>9.Kesit</p>	<p>10.Kesit</p>	<p>11.Kesit</p>	<p>12.Kesit</p>
<p>13.Kesit</p>	<p>14.Kesit</p>	<p>15.Kesit</p>	<p>16.Kesit</p>
<p>17.Kesit</p>	<p>18.Kesit</p>		

Tablo 6.9.3. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).



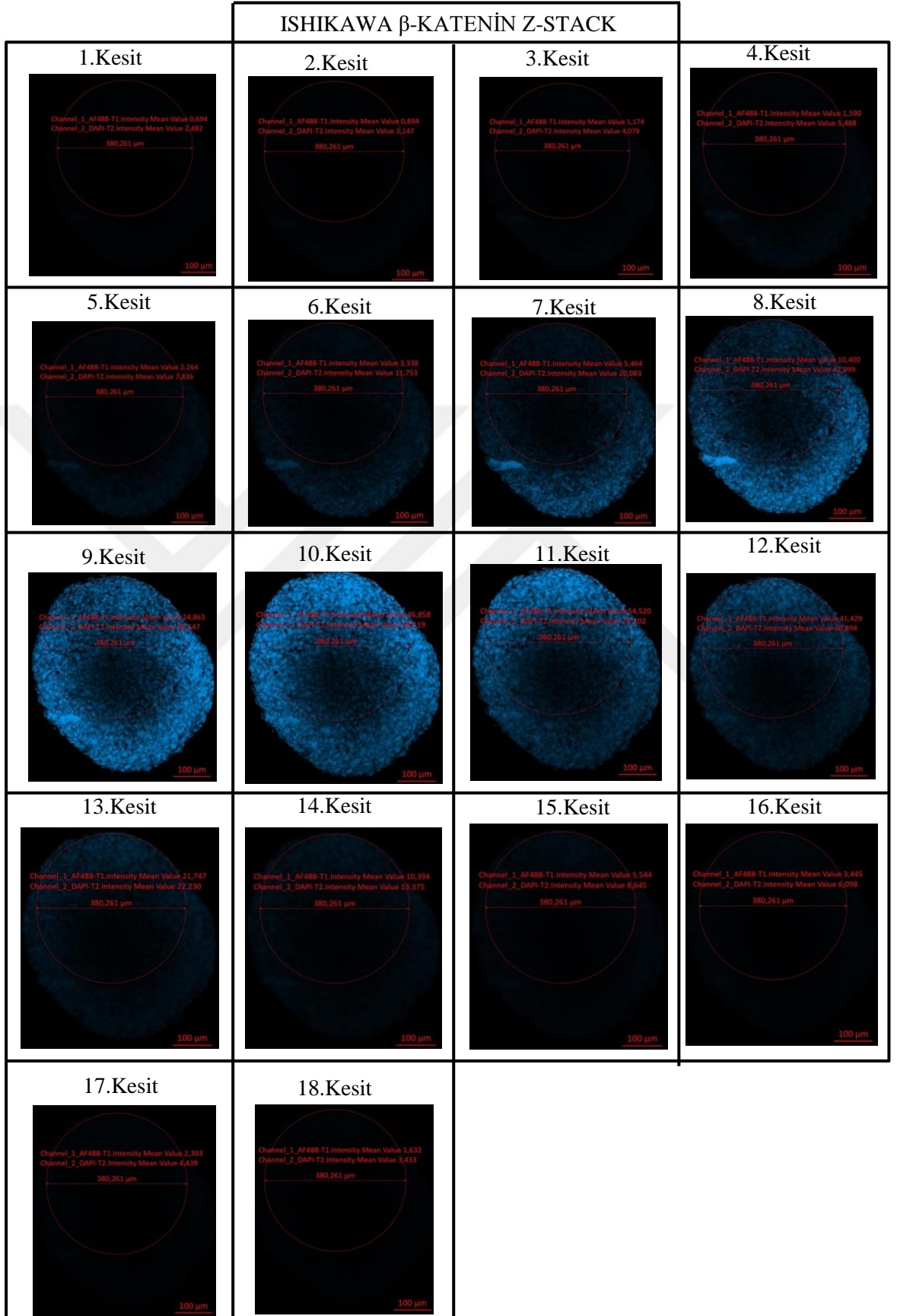


Şekil 6.9.4. Huvec sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.

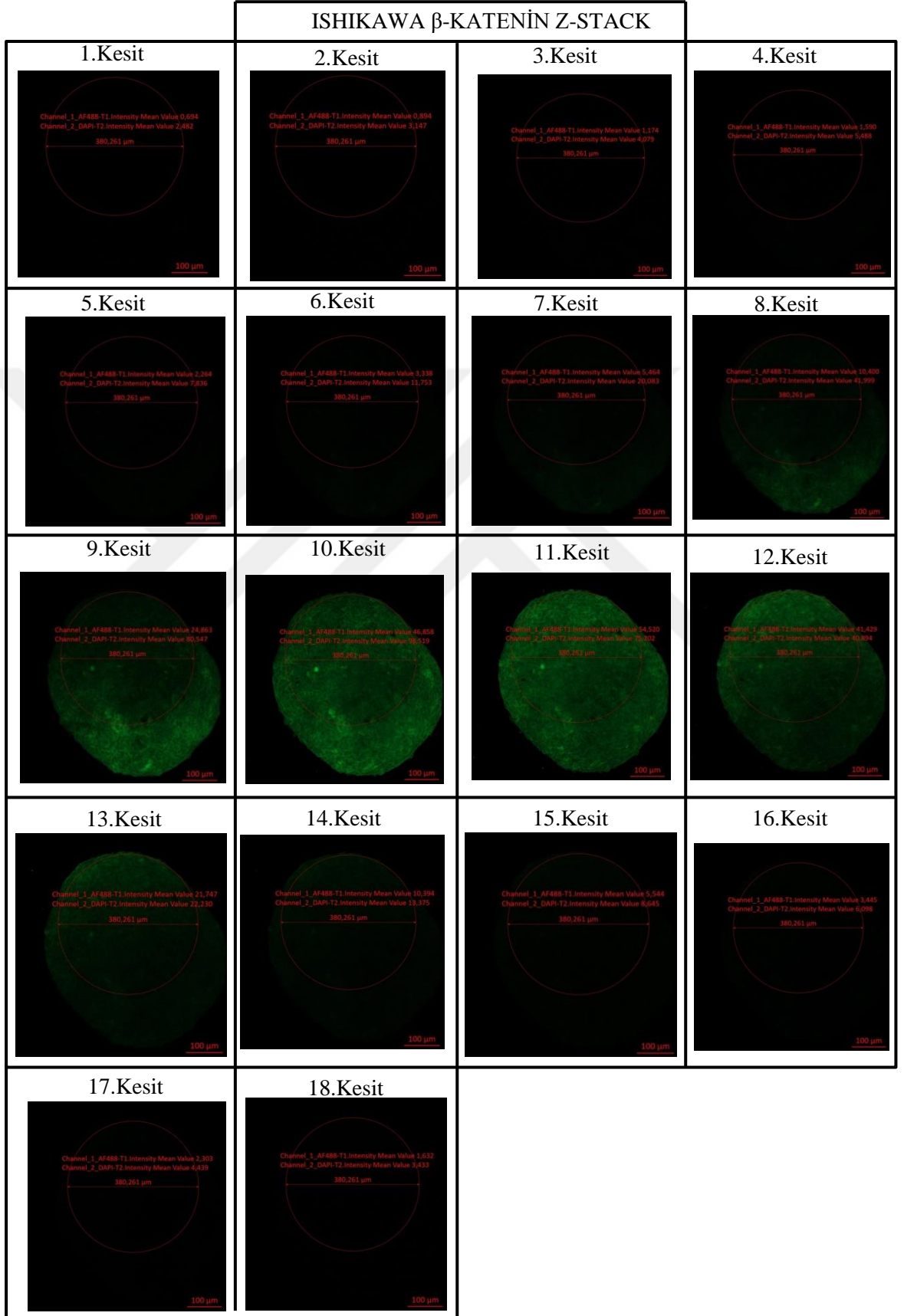
6.10. Ishikawa Mono-Kültür Sferoidinin β -Katenin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Ishikawa mono-kültür sferoidlerinin immünofloresan boyamasından sonra lazer taramalı mikroskop aracılığıyla Z-stack optik kesitleri alındı. Daha sonra tüm kesitler için İmaje J ile Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri yapıldı. Görüntünün belirgin olduğu kesitler DAPI, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada bulunduğu görüntüler ayrı tablolar halinde aşağıda verilmiştir. Tüm kesitlere ait intensity ölçümleri Şekil 6.10.4.'de gösterilmiştir.

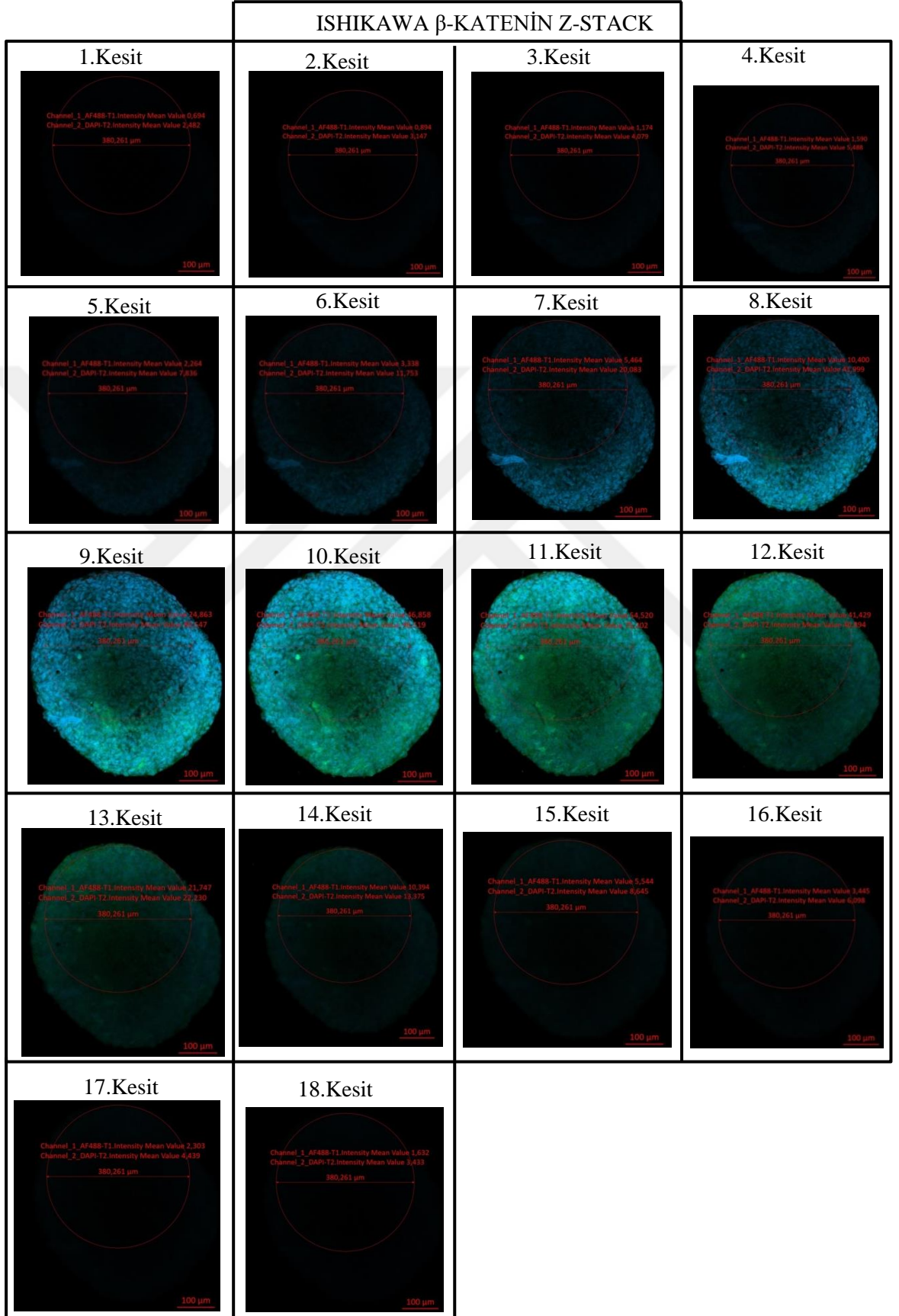
Tablo 6.10.1. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri(10X).

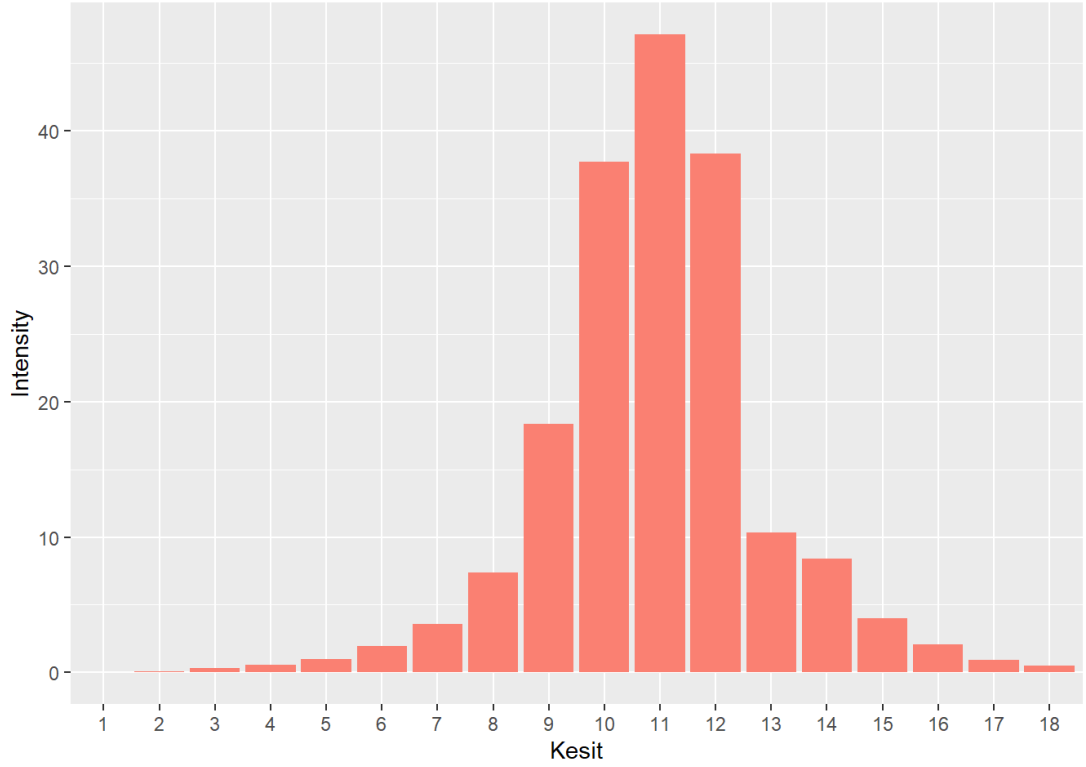


Tablo 6.10.2. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).



Tablo 6.10.3. Ishikawa sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).





Şekil 6.10.4. Ishikawa mono-kültür sferoidlerinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri.

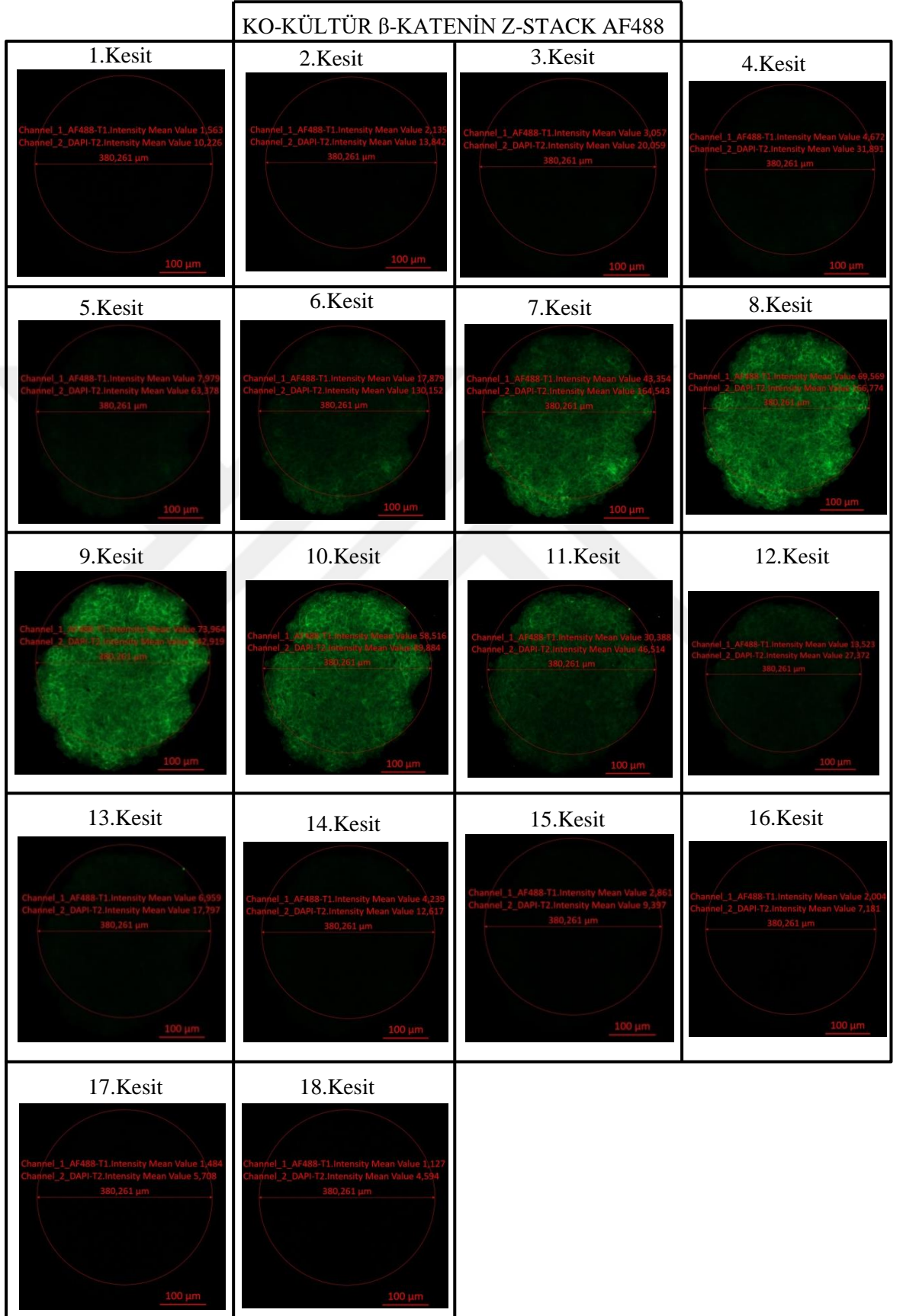
6.11. Huvec ve Ishikawa Ko-kültür Sferoidinin β -Katenin Antikoru ile İmmünofloresan Boyamasının Z-stack Alınarak Kaydedilmiş Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Huvec ve Ishikawa ko-kültür sferoidlerinin immünofloresan boyamasından sonra lazer taramalı mikroskop aracılığıyla Z-stack optik kesitleri alındı. Daha sonra tüm kesitler için İmaje J ile Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri yapıldı. Görüntünün belirgin olduğu kesitler DAPI, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada bulunduğu görüntüler ayrı tablolar halinde aşağıda verilmiştir. Tüm kesitlere ait intensity ölçümleri Şekil 6.11.4.'de gösterilmiştir.

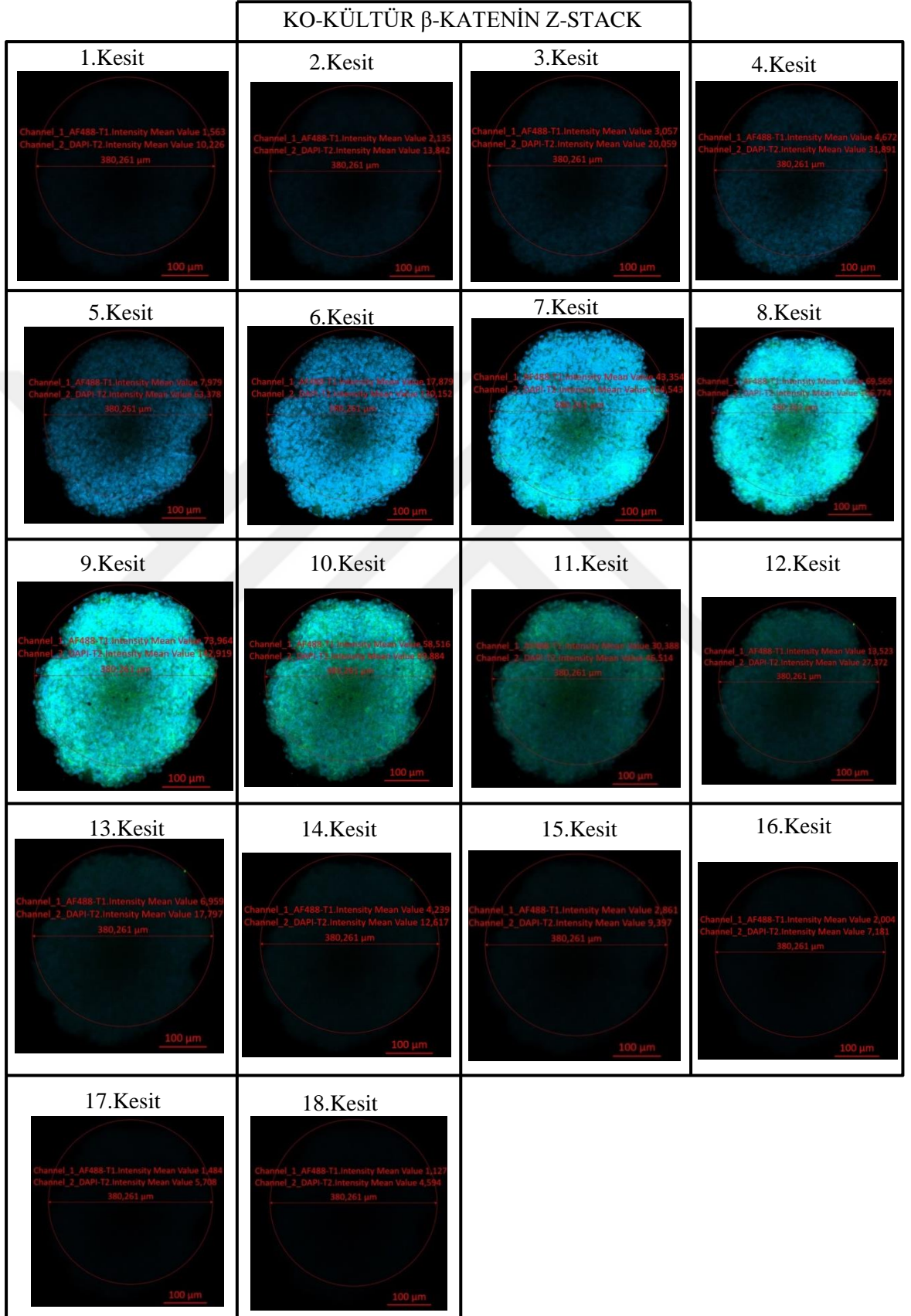
Tablo 6.11.1. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI görüntüleri(10X).

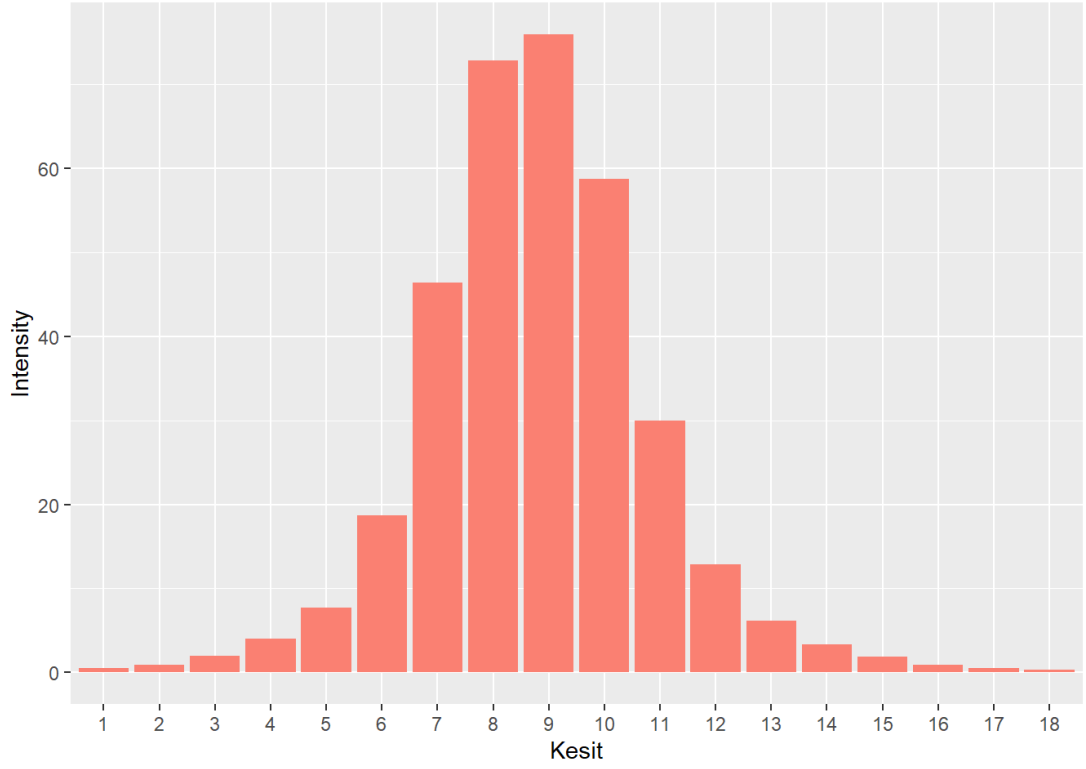
KO-KÜLTÜR β -KATENİN Z-STACK DAPI			
<p>1.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,563 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 10,226 380,261 µm 100 µm</p>	<p>2.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,139 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 13,842 380,261 µm 100 µm</p>	<p>3.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,057 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 20,059 380,261 µm 100 µm</p>	<p>4.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 4,673 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 31,891 380,261 µm 100 µm</p>
<p>5.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 7,979 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 63,378 380,261 µm 100 µm</p>	<p>6.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 17,879 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 190,153 380,261 µm 100 µm</p>	<p>7.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 49,354 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 344,543 380,261 µm 100 µm</p>	<p>8.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 69,568 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 466,774 380,261 µm 100 µm</p>
<p>9.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 79,964 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 542,919 380,261 µm 100 µm</p>	<p>10.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 58,514 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 59,884 380,261 µm 100 µm</p>	<p>11.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 30,388 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 46,514 380,261 µm 100 µm</p>	<p>12.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 13,523 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 27,372 380,261 µm 100 µm</p>
<p>13.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 6,959 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 17,797 380,261 µm 100 µm</p>	<p>14.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 4,239 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 12,617 380,261 µm 100 µm</p>	<p>15.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,861 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 9,397 380,261 µm 100 µm</p>	<p>16.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,004 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 7,181 380,261 µm 100 µm</p>
<p>17.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,488 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 5,708 380,261 µm 100 µm</p>	<p>18.Kesit</p> <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 1,127 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 4,594 380,261 µm 100 µm</p>		

Tablo 6.11.2. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).



Tablo 6.11.3. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin DAPI ve Alexa Fluor 488 görüntüleri(10X).



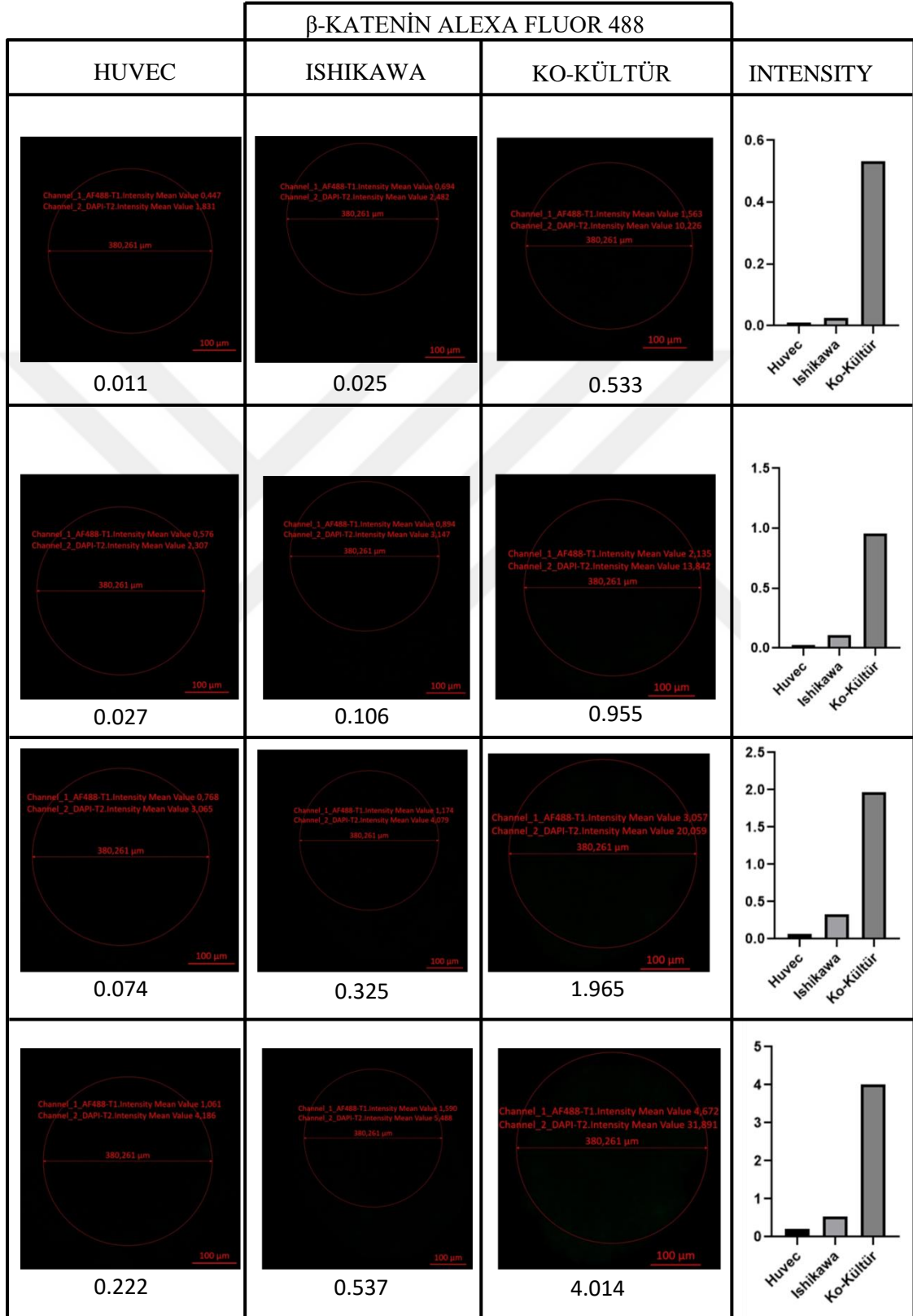


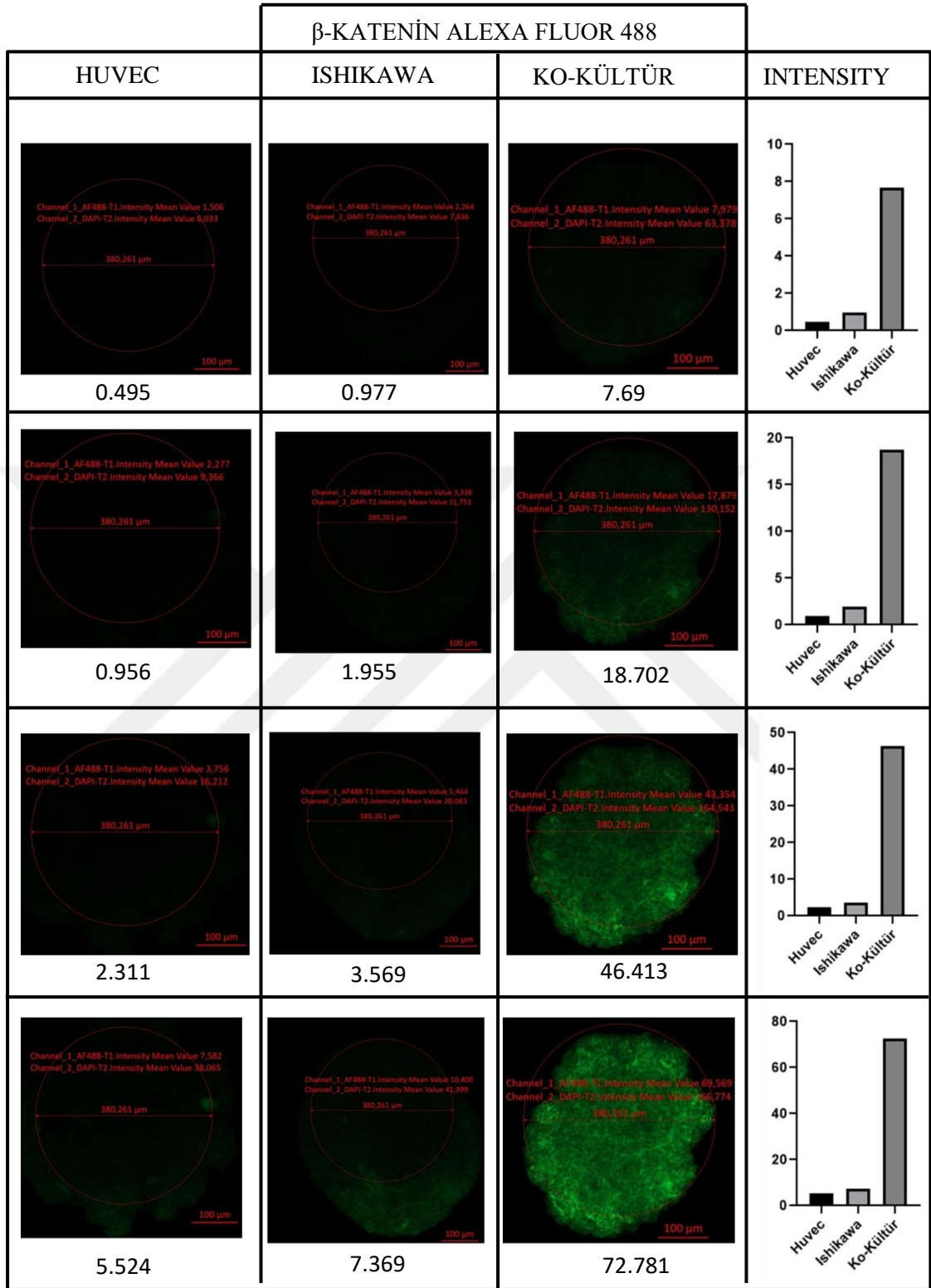
Şekil 6.11.4. Ko-kültür sferoidinin Z-stack optik kesitlerinin Alexa Fluor 488 intensiy ölçümleri.

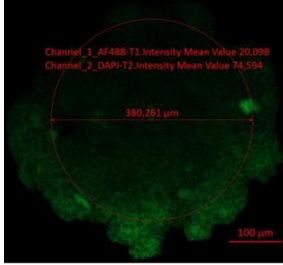
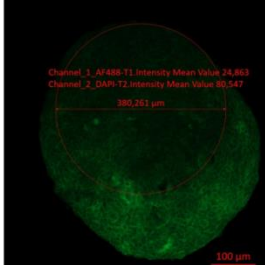
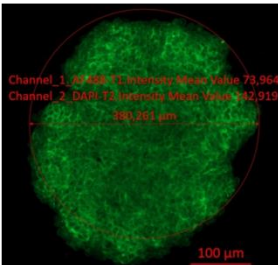
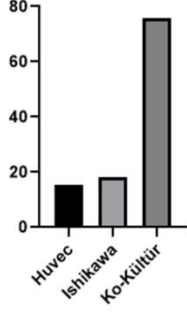
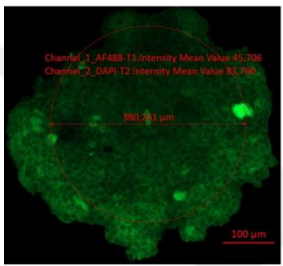
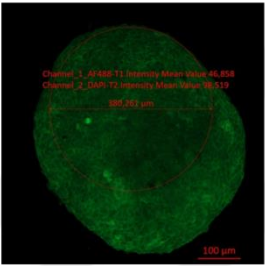
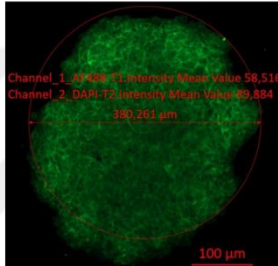
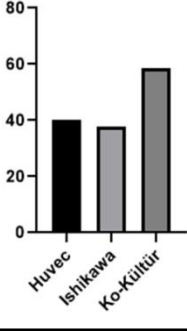
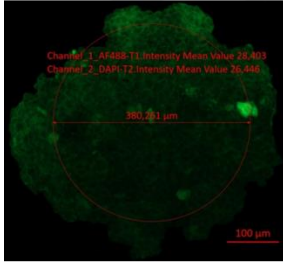
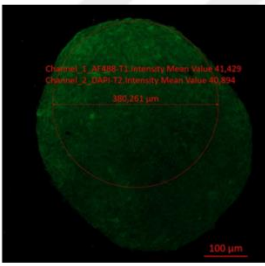
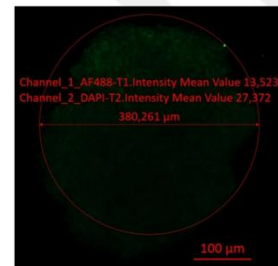
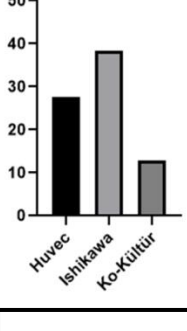
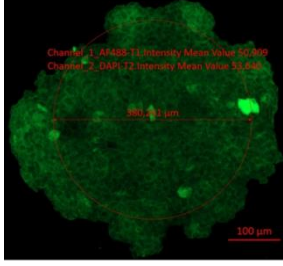
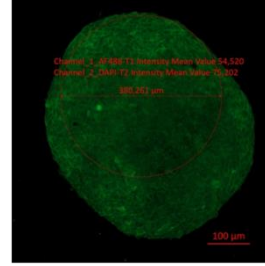
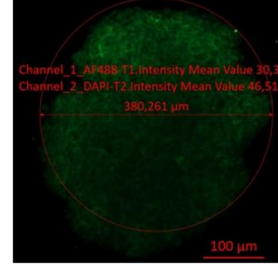
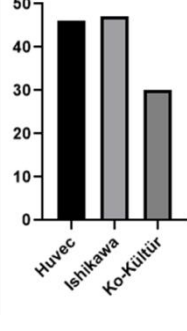
6.12. Huvec, Ishikawa Mono-Kültür ve Ko-Kültür Sferoidlerinin Alexa Fluor 488 İntensiy Ölçümlerinin İmage J ile Değerlendirilmesi

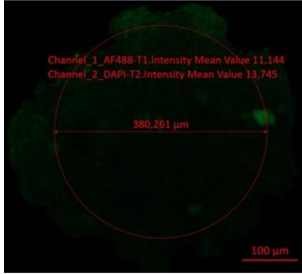
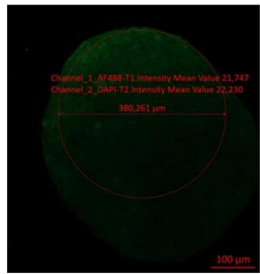
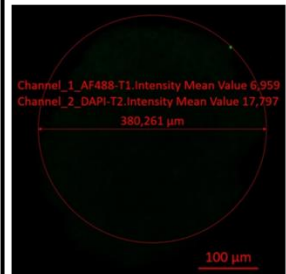
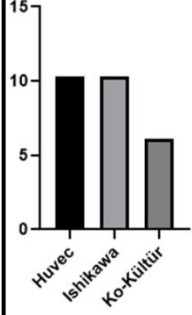
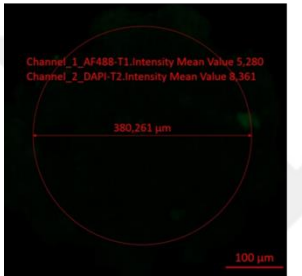
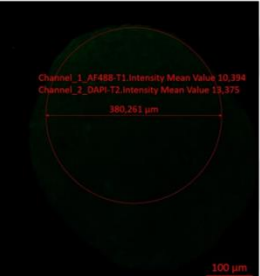
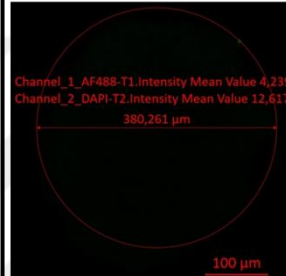
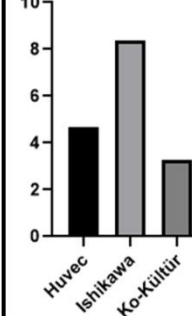
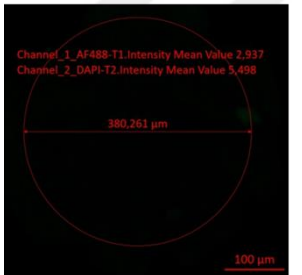
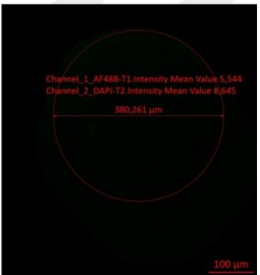
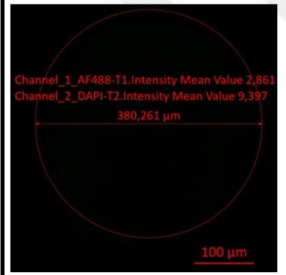
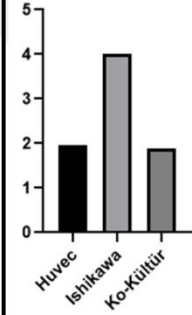
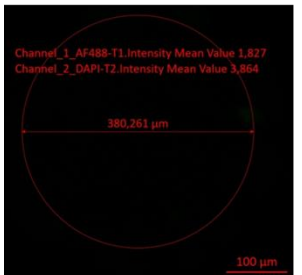
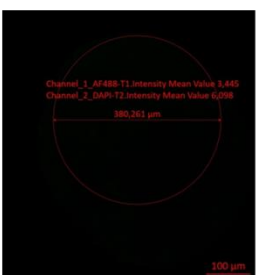
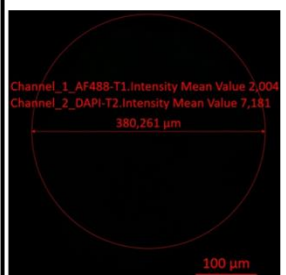
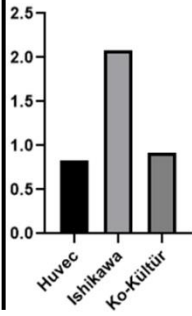
Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin Z-stack optik kesitleri alındıktan sonra Alexa Fluor 488 intensiy değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Sferoidlerin görünmeye başladığı kesitten itibaren 10 tanesi seçilerek sferoidler arasında karşılaştırma yapılmıştır.

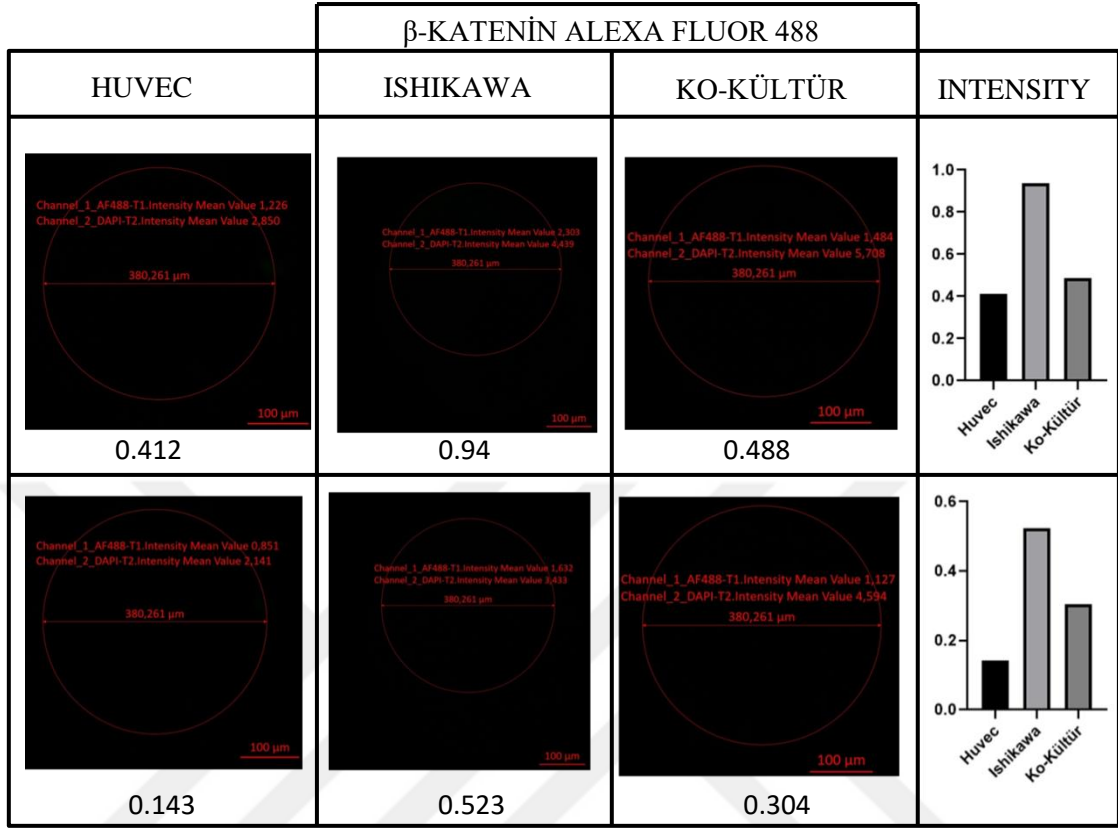
Tablo 6.12.1. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin aynı kesitlerinde intensity değerlerinin karşılaştırılması.





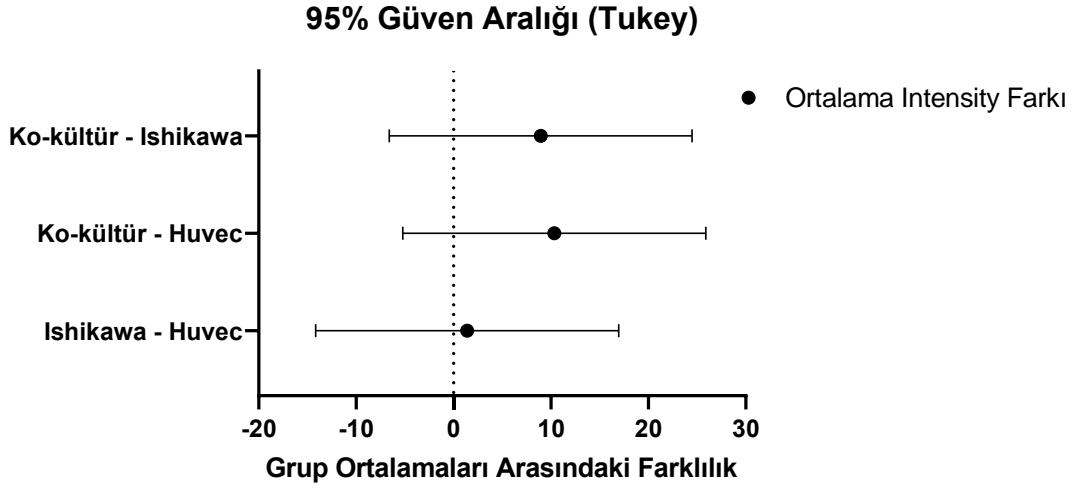
β-KATENİN ALEXA FLUOR 488											
HUVEC	ISHIKAWA	KO-KÜLTÜR	INTENSITY								
 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 20.098 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 74.594</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>15.445</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 24.863 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 80.047</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>18.336</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 78.964 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 142.919</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>75.920</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>15.445</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>18.336</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>75.920</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	15.445	Ishikawa	18.336	Ko-Kültür	75.920
Cell Type	Intensity										
Huvec	15.445										
Ishikawa	18.336										
Ko-Kültür	75.920										
 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 45.706 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 93.760</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>40.116</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 46.898 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 76.519</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>37.703</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 98.516 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 89.884</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>58.726</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>40.116</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>37.703</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>58.726</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	40.116	Ishikawa	37.703	Ko-Kültür	58.726
Cell Type	Intensity										
Huvec	40.116										
Ishikawa	37.703										
Ko-Kültür	58.726										
 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 26.403 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 36.444</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>46.137</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 41.429 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 40.894</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>47.097</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 13.523 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 27.372</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>30.015</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>46.137</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>47.097</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>30.015</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	46.137	Ishikawa	47.097	Ko-Kültür	30.015
Cell Type	Intensity										
Huvec	46.137										
Ishikawa	47.097										
Ko-Kültür	30.015										
 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 50.809 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 53.646</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>27.603</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 54.549 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 76.302</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>38.307</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1 Intensity Mean Value 30.388 Channel_2_DAPI-T2 Intensity Mean Value 46.514</p> <p>380.261 μm</p> <p>100 μm</p> <p>12.842</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>27.603</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>38.307</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>12.842</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	27.603	Ishikawa	38.307	Ko-Kültür	12.842
Cell Type	Intensity										
Huvec	27.603										
Ishikawa	38.307										
Ko-Kültür	12.842										

β -KATENİN ALEXA FLUOR 488											
HUVEC	ISHIKAWA	KO-KÜLTÜR	INTENSITY								
 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 11,144 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 13,745</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>10.287</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 21,747 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 22,230</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>10.32</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 6,959 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 17,797</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>6.114</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>10.287</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>10.32</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>6.114</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	10.287	Ishikawa	10.32	Ko-Kültür	6.114
Cell Type	Intensity										
Huvec	10.287										
Ishikawa	10.32										
Ko-Kültür	6.114										
 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 5,280 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 8,361</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>4.652</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 10,394 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 13,375</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>8.379</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 4,239 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 12,617</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>3.296</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>4.652</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>8.379</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>3.296</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	4.652	Ishikawa	8.379	Ko-Kültür	3.296
Cell Type	Intensity										
Huvec	4.652										
Ishikawa	8.379										
Ko-Kültür	3.296										
 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,937 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 5,498</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>1.964</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 5,544 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 6,645</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>4.016</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,863 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 9,337</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>1.89</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>1.964</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>4.016</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>1.89</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	1.964	Ishikawa	4.016	Ko-Kültür	1.89
Cell Type	Intensity										
Huvec	1.964										
Ishikawa	4.016										
Ko-Kültür	1.89										
 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 1,827 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 3,864</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>0.832</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 3,440 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 6,098</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>2.08</p>	 <p>Channel_1_AF488-T1.Intensity Mean Value 2,004 Channel_2_DAPI-T2.Intensity Mean Value 7,181</p> <p>380,261 µm</p> <p>100 µm</p> <p>0.916</p>	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Cell Type</th> <th>Intensity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Huvec</td> <td>0.832</td> </tr> <tr> <td>Ishikawa</td> <td>2.08</td> </tr> <tr> <td>Ko-Kültür</td> <td>0.916</td> </tr> </tbody> </table>	Cell Type	Intensity	Huvec	0.832	Ishikawa	2.08	Ko-Kültür	0.916
Cell Type	Intensity										
Huvec	0.832										
Ishikawa	2.08										
Ko-Kültür	0.916										



6.12.2. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin Alexa Fluor 488 intensity ölçümlerinin istatistiksel analizi

Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin Z-stack optik kesitleri alındıktan sonra Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinin optik kesitlerinin intensity değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 6.12.2.1).

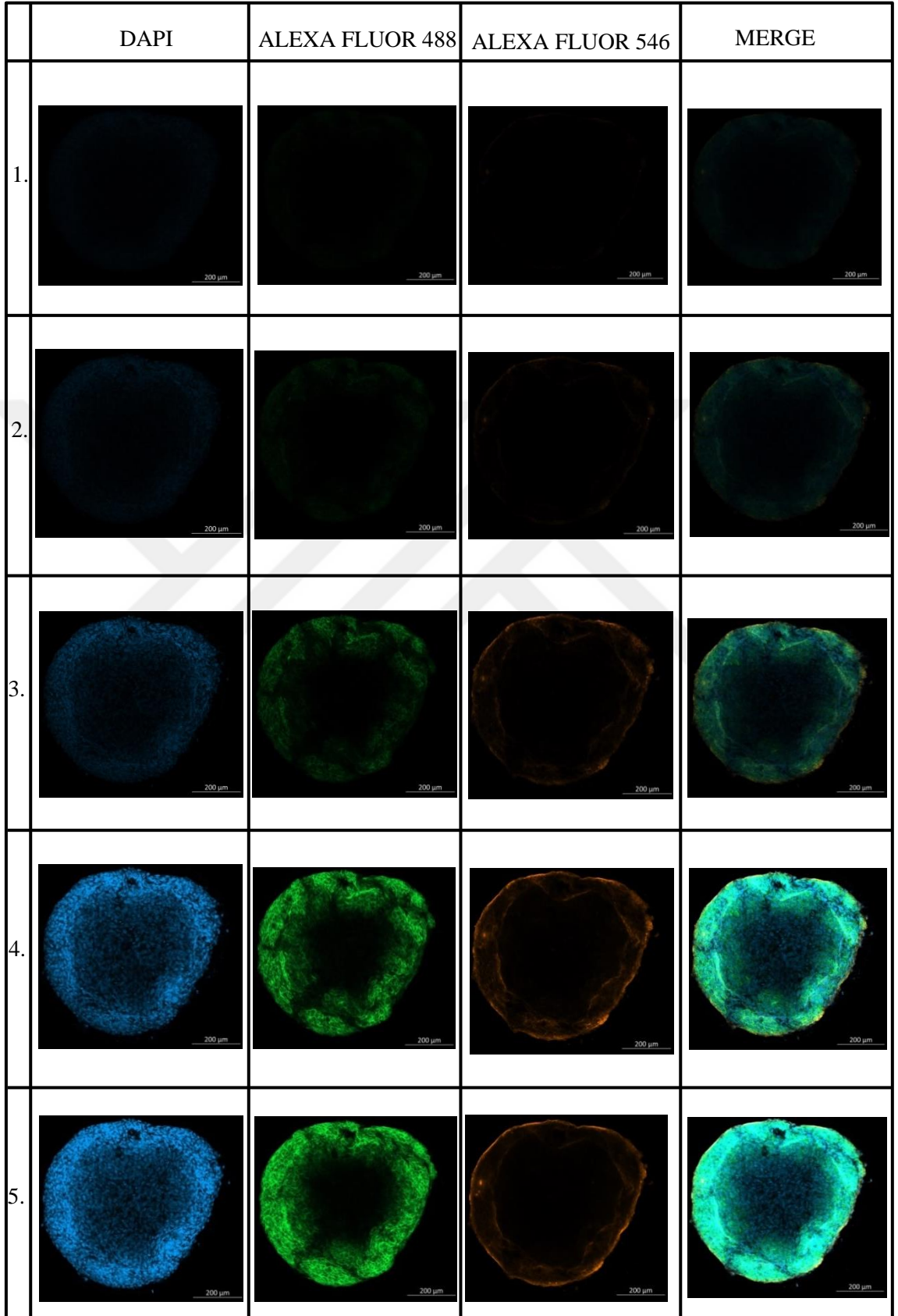


Şekil 6.12.2.1. Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidleri arasında yapılan çoklu karşılaştırma testinin sonucu.

6.13. Huvec ve Ishikawa Hücreleriyle Oluşturulan Ko-Kültür Sferoidlerinin E-Kaderin ve β -Katenin Polink İkili Boyama Görüntüleri

Ko-kültür sferoidleri poliink ikili boyama sistemiyle boyandıktan sonra lazer taramalı konfokal mikroskop ile Z-stack alınarak görüntüleri kaydedilmiştir. Alexa Fluor 488 sekonder antikoru ile E-Kaderin, Alexa Fluor 546 sekonder antikoru β -Katenin adezyon molekülleri gösterilmiştir.

Tablo 6.13.1. Ko-kültür sferoidinin poliink ikili boyama görüntüleri.

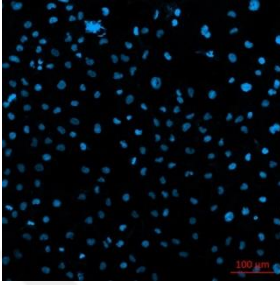

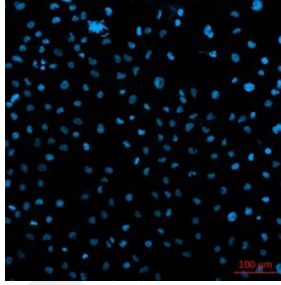
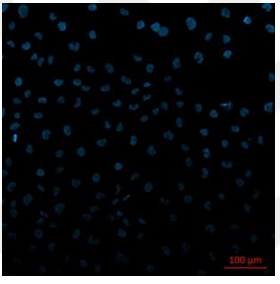

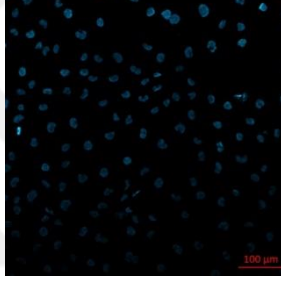
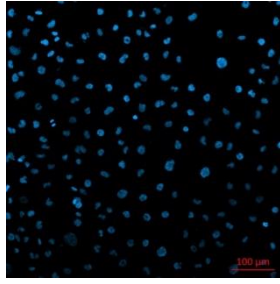
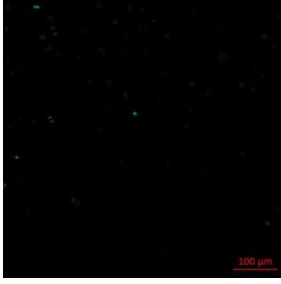
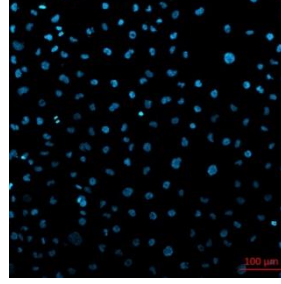
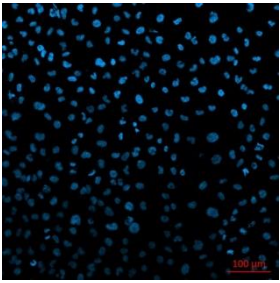
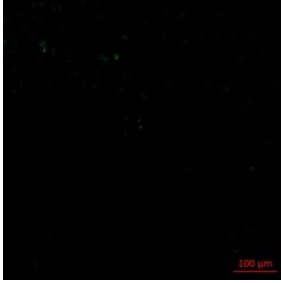
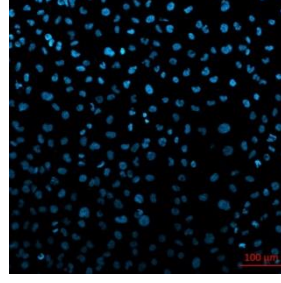


6.14. Ishikawa ve Huvec Hücrelerinin İki Boyutlu Mono-Kültür ve Ko-Kültür Modelinde E-Kaderin İmmünofloresan Boyama Görüntüleri

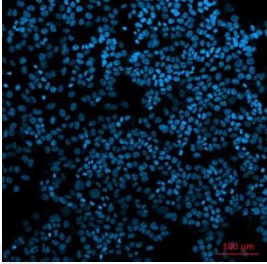
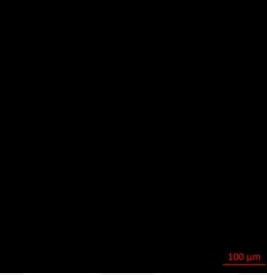
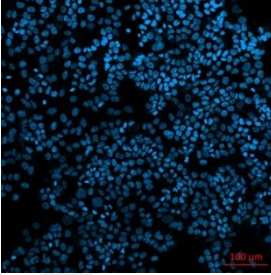
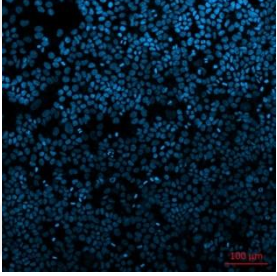
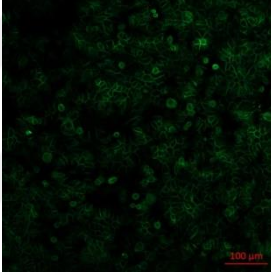
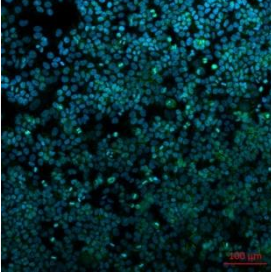
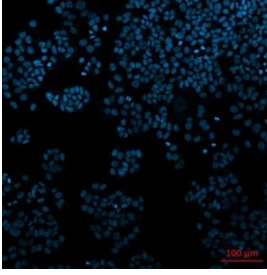
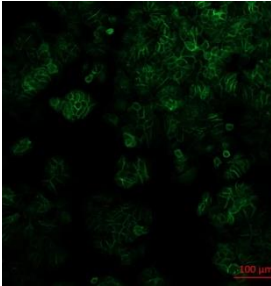
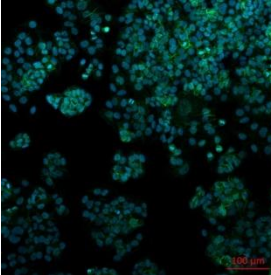
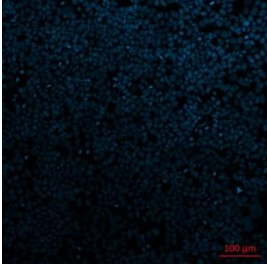
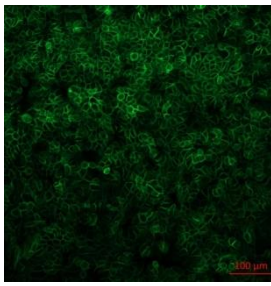
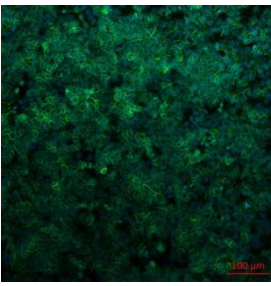
E-Kaderin antikoruna ile immünofloresan boyama yapılmış iki boyutlu hücrelerin pozitif ve negatif örneklerinin Dapı, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada olduğu görüntüler değerlendirildi. Zeiss LSM 800 lazer taramalı konfokal mikroskop ile görüntüleri kaydedildi. Görüntülerin Alexa Fluor 488 intensite ölçümleri Image J ile yapıldı. Elde edilen görüntüler Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür modeli için ayrı tablolar halinde aşağıda verilmiştir.



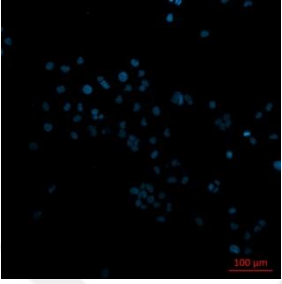
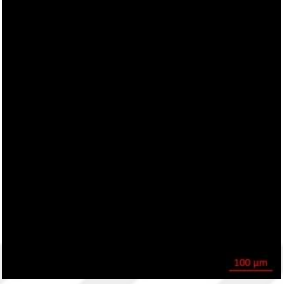
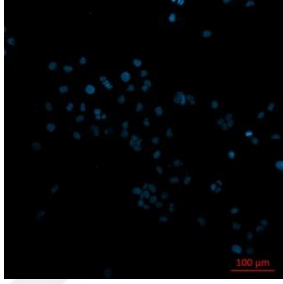
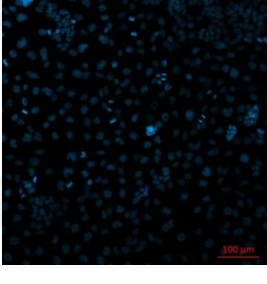

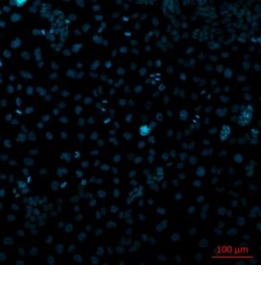
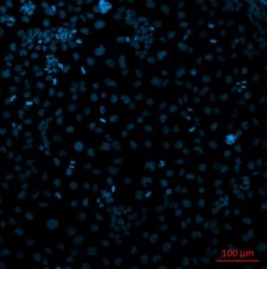

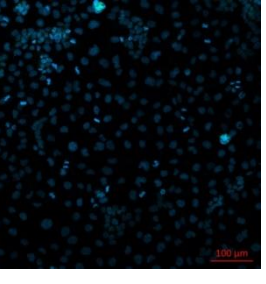
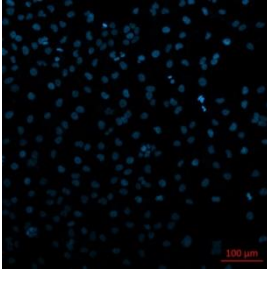
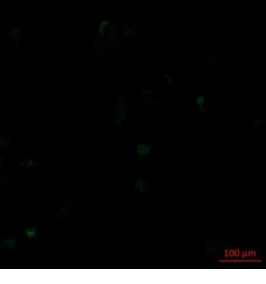
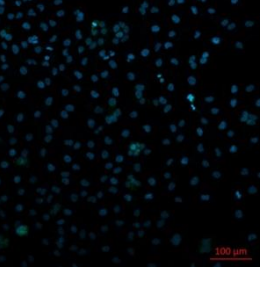
Tablo 6.14.1. İki boyutlu hücre kültürü modelinde Huvec hücrelerinin E-Kaderin immünofloresan boyamasının görüntüleri (10X).

		HUVEC E-KADERİN		
		DAPI	ALEXA FLUOR	MERGE
NEGATİF				
POZİTİF-1				
POZİTİF-2				
POZİTİF-3				

Tablo 6.14.2. İki boyutlu hücre kültürü modelinde Ishikawa hücrelerinin E-Kaderin immüno Floresan boyamasının görüntüleri (10X).

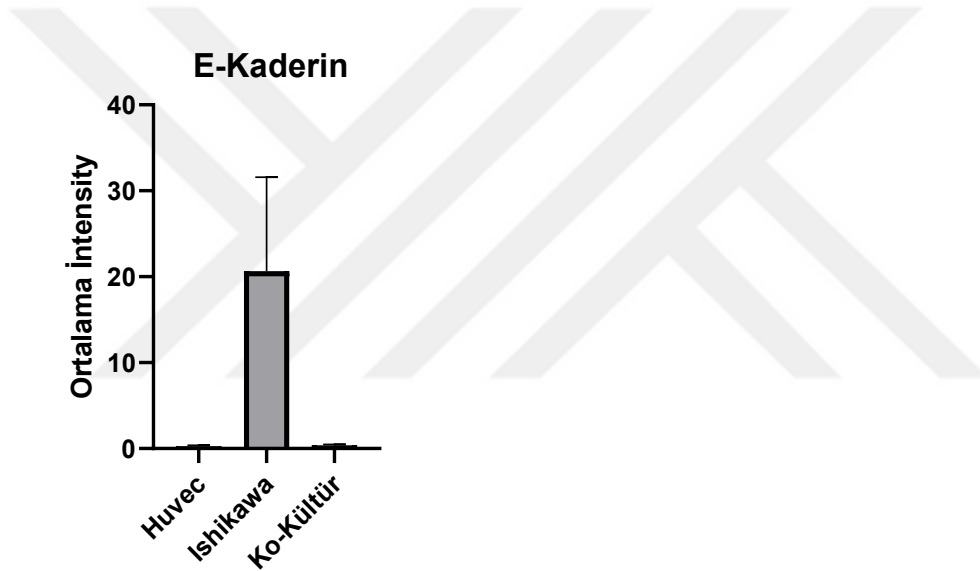
ISHIKAWA E-KADERİN			
	DAPI	ALEXA FLUOR	MERGE
NEGATİF			
POZİTİF-1			
POZİTİF-2			
POZİTİF-3			

Tablo 6.14.3. Huvec ve Ishikawa hücreleriyle oluşturulan iki boyutlu ko-kültür modelinde E-Kaderin immüno Floresan boyamasının görüntüleri (10X).

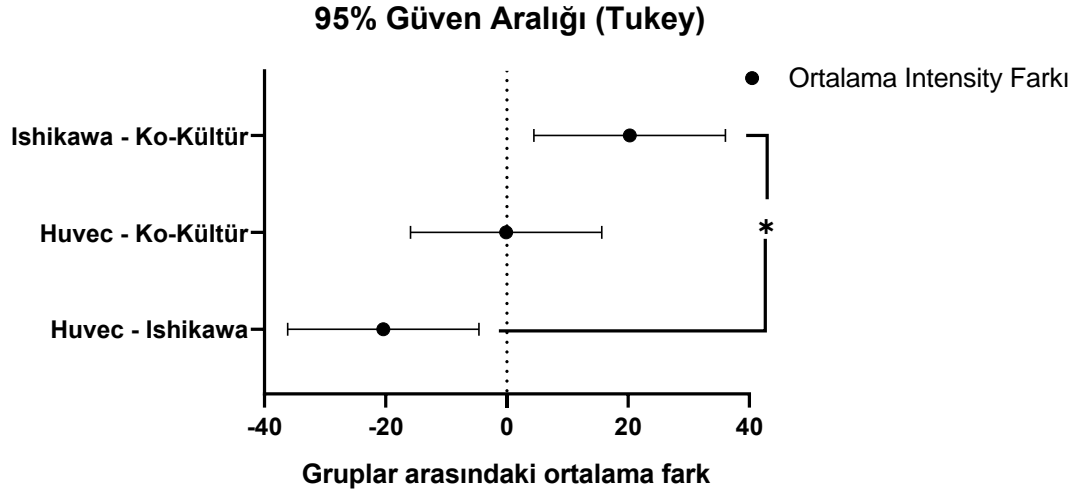
KO-KÜLTÜR E-KADERİN			
	DAPI	ALEXA FLUOR	MERGE
NEGATİF			
POZİTİF-1			
POZİTİF-2			
POZİTİF-3			

6.14.1. Ishikawa ve Huvec hücrelerinin iki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde Alexa Fluor 488 intensity ölçümlerinin istatistiksel analizi

İki boyutlu hücreler E-Kaderin antikoru ile immünofloresan boyama yapıldıktan sonra görüntüleri kaydedilmiştir. Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Ölçülen ortalama intensity değerleri Şekil 6.14.1.1.'de verilmiştir. Huvec ve Ishikawa mono-kültür modeli arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,0175$). Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür modeli arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,0175$) (Şekil 6.14.1.2.).



Şekil 6.14.1.1. İki boyutlu Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür modelinde hücrelerin ortalama intensity değerleri.

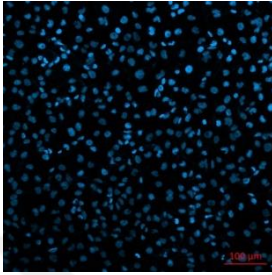
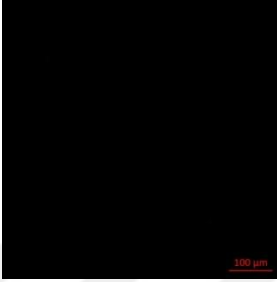
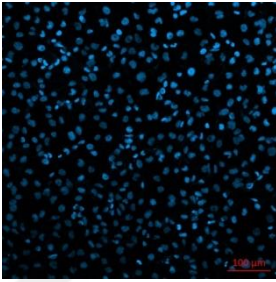
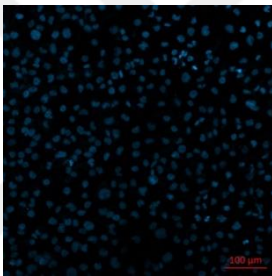
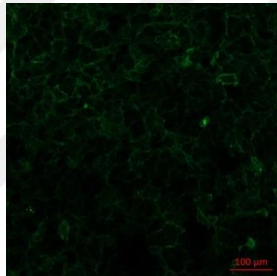
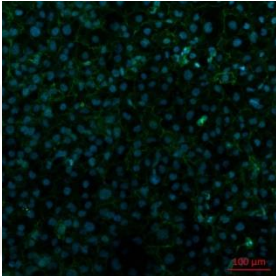
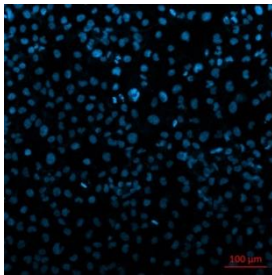
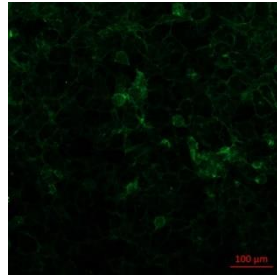
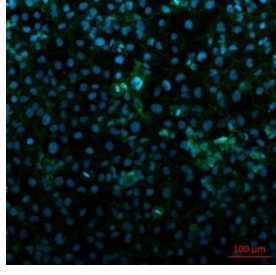
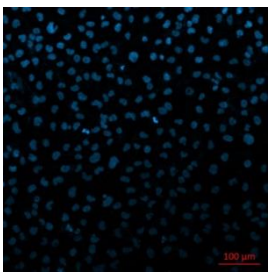
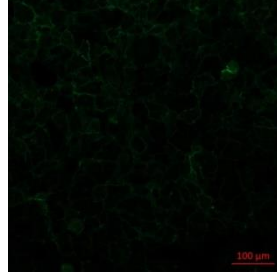
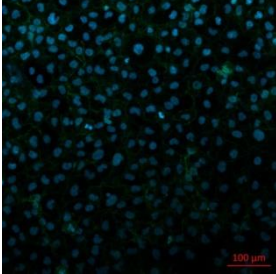


Şekil 6.14.1.2. Ölçülen intensity değerleri arasında yapılan çoklu karşılaştırma testinin sonucu. (*p<0.05)

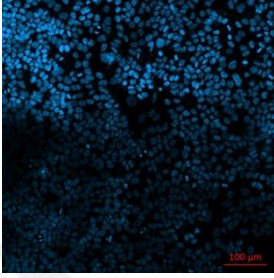

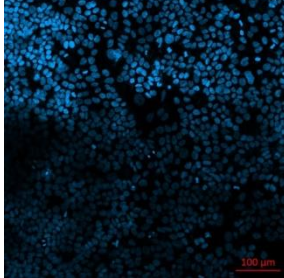
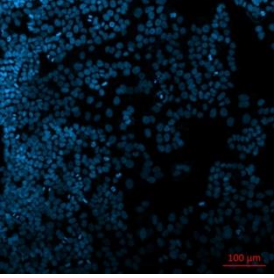
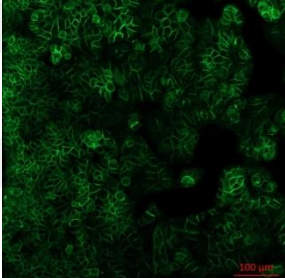
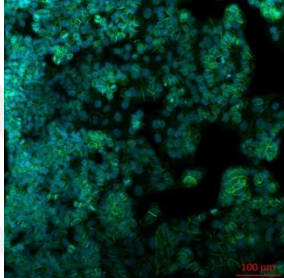
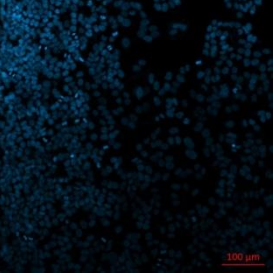
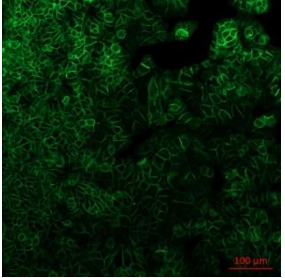
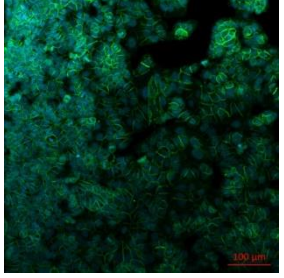
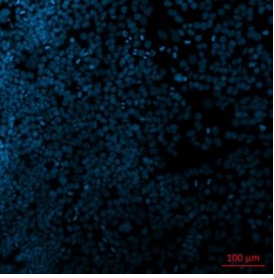
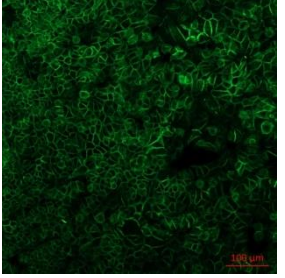
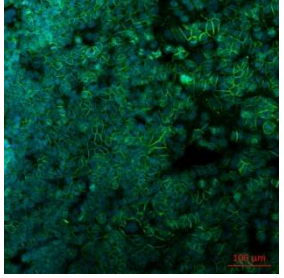
6.15. Ishikawa ve Huvec hücrelerinin iki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde β -Katenin immünofloresan boyama görüntüleri

β -Katenin antikoru ile immünofloresan boyama yapılmış iki boyutlu hücrelerin pozitif ve negatif örneklerinin Dap1, Alexa Fluor 488 ve ikisinin bir arada olduğu görüntüler değerlendirildi. Zeiss LSM 800 lazer taramalı konfokal mikroskop ile görüntüleri kaydedildi. Görüntülerin Alexa Fluor 488 intensity ölçümleri Image J ile yapıldı. Elde edilen görüntüler Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür modeli için ayrı tablolar halinde aşağıda verilmiştir.

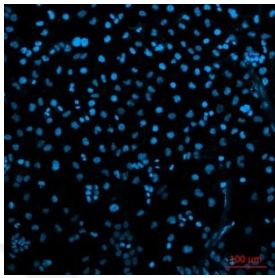

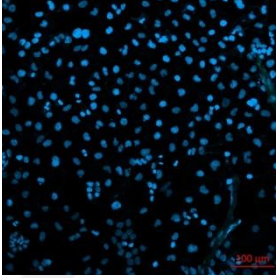
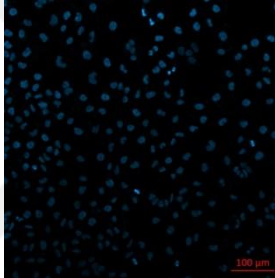
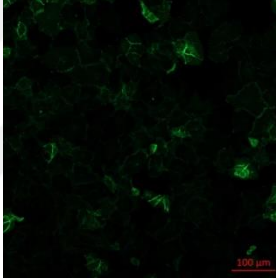
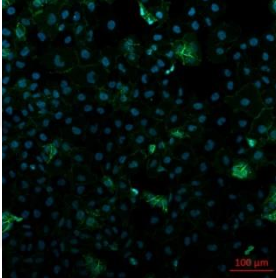
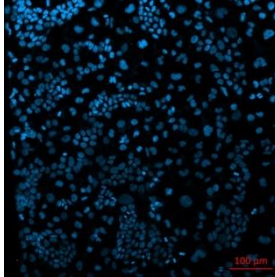
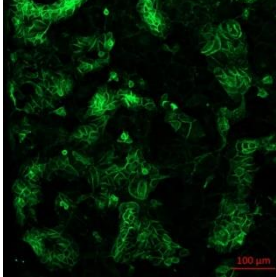
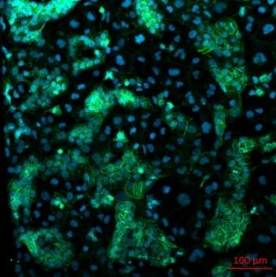
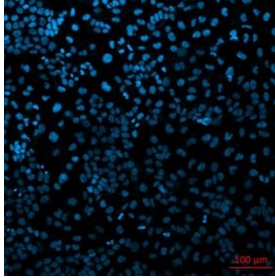
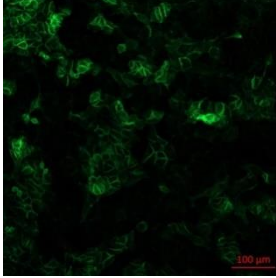
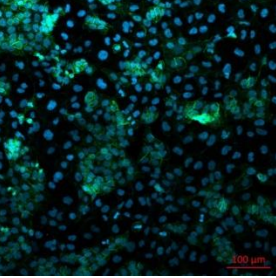
Tablo 6.15.1. İki boyutlu hücre kültürü modelinde Huvec hücrelerinin β -Katenin immünofloresan boyamasının görüntüleri (10X).

	HUVEC β -KATENİN		
	DAPI	ALEXA FLUOR	MERGE
NEGATİF			
POZİTİF-1			
POZİTİF-2			
POZİTİF-3			

Tablo 6.15.2. İki boyutlu hücre kültürü modelinde Ishikawa hücrelerinin β -Katenin immünofloresan boyamasının görüntüleri (10X).

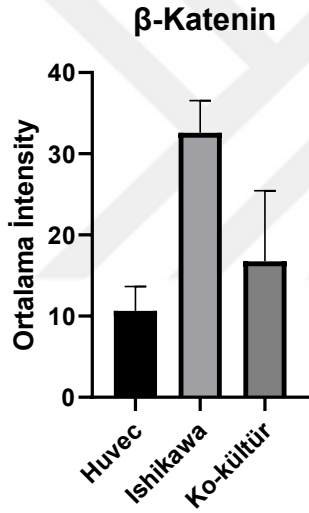
		ISHIKAWA β -KATENİN		
	DAPI	ALEXA FLUOR	MERGE	
NEGATİF				
POZİTİF-1				
POZİTİF-2				
POZİTİF-3				

Tablo 6.15.3. Huvec ve Ishikawa hücreleriyle oluşturulan iki boyutlu ko-kültür modelinde β -Katenin immünofloresan boyamasının görüntüleri (10X).

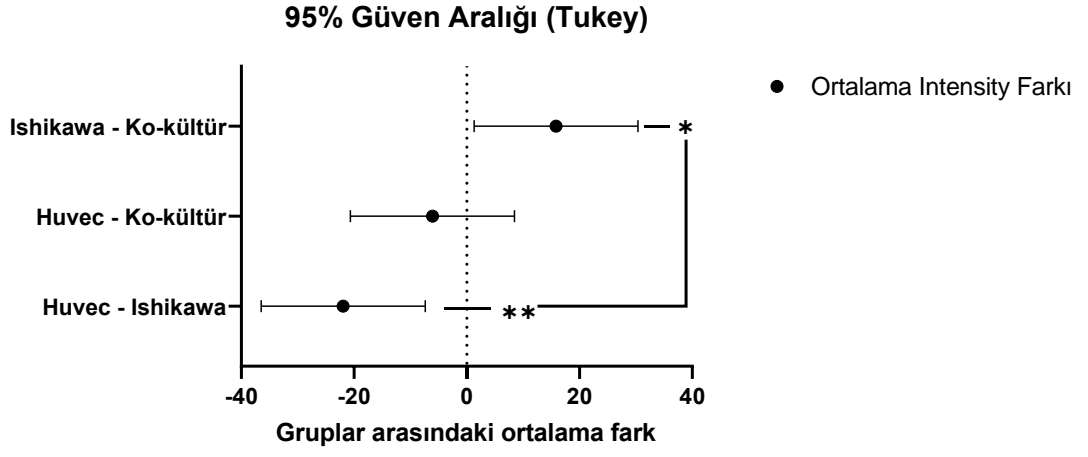
KO-KÜLTÜR β -KATENİN			
	DAPI	ALEXA FLUOR	MERGE
NEGATİF			
POZİTİF-1			
POZİTİF-2			
POZİTİF-3			

6.15.1. Ishikawa ve Huvec hücrelerinin iki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde Alexa Fluor 488 intensity ölçümlerinin istatistiksel analizi

İki boyutlu hücreler β -Katenin antikoru ile immünofloresan boyama yapıldıktan sonra görüntüleri kaydedilmiştir. Alexa Fluor 488 intensity değerleri İmage J ile ölçülmüştür. Ölçülen ortalama intensity değerleri Şekil 6.15.1.1.'de verilmiştir. Huvec ve Ishikawa mono-kültür hücrelerinin intensity değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,0086$). Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür modelinde hücrelerin intensity değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,0359$) (Şekil 6.15.1.2).



Şekil 6.15.1.1. İki boyutlu mono-kültür ve ko-kültür modelinde Huvec ve Ishikawa hücrelerinin ortalama intensity değerleri.



Şekil 6.15.1.2. Ölçülen intensity değerleri arasında yapılan çoklu karşılaştırma testinin sonucu. (** $p=0,0086$, * $p=0,0359$)

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hücre kültürü, genellikle temel ve klinik *in vivo* çalışmalarda kullanılan bir yöntemdir. Aynı zamanda ilaç keşif sürecinde önemli bir yere sahiptir. Hayvan testlerini azaltmak için basit, hızlı ve uygun maliyetli bir yol sağlar(124). Bu tez çalışmasında hücre kültürünün kullanılmasının temel nedeni sağlamış olduğu avantajlar ve kullanım alanlarının yaygınlığıdır. Çalışmanın amacı hücre kültüründe kullanılan farklı tekniklerin avantaj ve dezavantajlarını ortaya koymaktır. Bu sebeple iki boyutlu ve üç boyutlu olarak mono ve ko-kültür tekniği kullanılmıştır.

In vivo ortamdaki hücreler, hücre dışı matris (ECM) ve diğer hücrelerle çevrilidir. Bu nedenle, iki boyutlu hücre kültürü bazen *in vivo* yanıtla ilgili yanıltıcı olabilecek öngörülemez veriler sağlar. İlaç geliştirmede bileşik taramaya yönelik standart prosedürler, iki boyutlu hücre kültürüne dayalı testlerle başlamakta daha sonra hayvan modeli testleri ve klinik araştırmalar ile devam etmektedir. Test edilen bileşiklerin yaklaşık %10'u klinik araştırma aşamasında başarılı olmaktadır. İki boyutlu kültür koşullarında uygun doku yapısı ve hücre-hücre etkileşimleri kaybolduğundan, *in vivo* durum olarak tam olarak yansıtılamamaktadır(124, 125). İki boyutlu yüzeylerde büyüme, hücrenin yüzeye yapışması ve iç hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ile sonuçlanır. Bu tür değişikliklerin gen ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Hücrenin yüzeye yapışması nükleer şekli de etkilemektedir. Nükleer şeklin değişimi, gen ekspresyonu ve protein sentezinde farklılıklara yol açabilir. Örneğin, tek tabaka halinde kültürlenmiş hücrelerin terapötik maddelere daha duyarlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, iki boyutlu hücre kültürünün, hücre proliferasyonunu artırabildiği ancak sınırlı hücre etkileşimleri nedeniyle hücre farklılaşmasını inhibe ettiği söylenmiştir(125, 126).

In vitro iki boyutlu hücre kültürü ve *in vivo* arasında büyük bir boşluk vardır. İki boyutlu hücre kültürlerine kıyasla daha gerçekçi uzaysal, biyokimyasal ve hücresel parametreler sağlayan üç boyutlu hücre kültürü modelleri bu boşlukta köprü görevi görebilir. Üç boyutlu hücre kültürü modellerinin moleküler ve hücresel mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağladığı, daha gerçekçi hücre-hücre etkileşimleri nedeniyle yeni ilaçların geliştirilmesini ve taranmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir(124, 126, 127). Daha önce yapılan çalışmalarda, iki boyutlu ve üç

boyutlu kültürlenmiş glioma hücrelerinin proteomları kantitatif olarak karşılaştırmıştır. Ve immün yanıt yollarında dikkate değer farklılıklar olduğunu gözlemlemiştir(128, 129). İki boyutlu kültür yerine üç boyutlu olarak büyütülen hepatoselüler karsinom hücrelerinin adezyon proteinlerinde ve matriks metalloproteinaz ekspresyonlarında farklılıklar görülmüştür. Benzer şekilde parotis bezi hücrelerinin, iki boyutlu yerine üç boyutlu olarak kültürlenmesinin sonucunda daha yüksek seviyelerde amilaz ve akuaporin proteinlerinin eksprese edildiği gösterilmiştir(129).

Katı tümörlerin *in vivo*'da doğal büyümesi üç boyutludur. Üç boyutlu hücre kültürü, *in vivo*' da olduğu gibi hücre-hücre etkileşimleri oluşturma ve üç boyutlu yapılara dönüşme kabiliyeti nedeniyle *in vivo* ortamı geleneksel iki boyutlu hücre kültüründen daha iyi taklit etmektedir. Bu teori, iki boyutlu kültürler olarak yetiştirilen hücrelerin bazı doğal işlevsel yeteneklerini kaybetmeleri gerçeğiyle desteklenmektedir; ancak bu değişiklikler, hücrelerin yeniden üç boyutlu olarak büyütülmesiyle engellenebilir(130).

Sferoidler, hücre-hücre etkileşiminin hücre-substrat etkileşimlerine baskın olduğu bir ortamda kültürlenen birkaç bin hücreden oluşan kendi kendine bir araya gelmiş küresel kümelerdir. İçlerinde bulunan oksijen ve besin gradyanları ile avasküler tümörleri taklit ederler. Bu tür sferoidler şekil, hücre morfolojisi, büyüme kinetiği, gen ekspresyonu ve ilaç tepkisi açısından *in vivo* tümörlere benzerler(127). Sferoidler, endometriyal kanser, yumurtalık kanseri, hepatoselüler kanser ve kolon kanseri dahil olmak üzere çok çeşitli kaynaklardan yetiştirilebilir. Bu modellerin, özellikle tümör çalışmaları için değerli temsilciler olduğu kanıtlanmıştır(129).

İki boyutlu kültürden üç boyutlu kültür tekniklerine geçiş, fizyolojik olarak daha uygun doku modellerine doğru geçişte önemli bir adımdır. Bununla birlikte, üç boyutlu kültür teknikleri tipik olarak dokuların çok hücreli karmaşıklığını henüz yakalayamamaktadır ve vasküleriteden yoksundur(131). Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında ko-kültür tekniği kullanılarak Ishikawa hücre hattı, insan vasküler endotel hücre hattı olan Huvec hücreleriyle birlikte büyütüldü. Bu sayede vaskülerite eksikliği ortadan kaldırılarak, sferoidlerde *in vivo* tümör mikro çevresine uygun bir model oluşturuldu.

Ko-kültür sistemleri, iki veya daha fazla farklı hücre türünün aynı kap veya kuyuda birlikte kültürlendiği *in vitro* kültürlerdir. Ko-kültürler, iki hücre türünün üst üste bulunduğu veya karışık bir popülasyon olarak kültürlendiği hücreden hücreye etkileşimlere izin veren direkt ko-kültür ve dolaylı olarak iki hücre popülasyonunun membran ekleri ile ayrıldığı veya önceden koşullandırılmış ortamların kullanıldığı indirekt ko-kültür olarak ikiye ayrılır. İndirekt ko-kültürler hücre-hücre yapışması / integrin / notch tipi sinyalleşmeyi yakalamaz(67). Çalışmamızda direkt ko-kültür tercih edilmesinin sebebi adhezyon moleküllerini inceleyebilmektir. Ayrıca tümör hücrelerinin mono-kültür ve ko-kültür tekniğiyle büyütüldüğünde hangisinin *in vivo* tümörlere daha yakın bir model olacağı anlaşılmasına çalışılmıştır.

Gerçekleştirdiğimiz çalışma sonucunda, Huvec hücre hattının, endometriyum kanseri hücre hattı (Ishikawa) kadar sferoid oluşturma eğiliminde olmadığı ve kompakt sferoidler oluşturamadığı gözlemlendi. Ishikawa hücre hattının sınırları daha belirgin küremsi ve kompakt sferoidler oluşturduğu kaydedildi. Huvec hücreleri tek başına ekildikten 24 saat sonra sferoid oluşumu gözlenmezken, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür hücreleri sferoid formu oluşturabildi. Ekildikten sonraki 1. gün ölçümlerinde en geniş çapa ulaşan sferoidlerin ko-kültür sferoidleri olduğu belirlendi. Birinci gün bir Ishikawa sferoidi ortalama 416 µm iken bir ko-kültür sferoidi 715,3 µm olarak kaydedildi. Huvec hücrelerinde sferoid oluşumu ikinci gün gerçekleşti. Bununla birlikte birinci gün 426,520 µm olarak ölçülen bir Ishikawa sferoidi ikinci gün gösterdiği büyüme sonucunda 454,009 µm olarak ölçüldü. Ko-kültür hücrelerinin büyüklüklerinde ilk güne oranla ikinci gün azalma kaydedildi. Şöyle ki birinci gün 740,132 µm olarak ölçülen ko-kültür sferoidi ikinci gününde 480,095 µm olarak ölçüldü. Tüm grupların, İkinci gün ölçümleri yapıldığında ise Huvec sferoidleri ortalama 413,6 µm, Ishikawa sferoidleri ortalama 452,5 µm ve ko-kültür sferoidleri ortalama 498 µm olarak belirlendi. Üçüncü günde Huvec sferoidlerinde ikinci güne oranla ortalama 60 µm' lik bir küçülme gözlemlendi. Ishikawa sferoidleri ise üçüncü günde ortalama olarak 21,95 µm' lik bir küçülme gösterdiler. Ko-kültür sferoidlerinde de diğerlerinde olduğu gibi üçüncü gün ortalama 64,41 µm' lik bir küçülme gözlemlendi. Hem birinci gün hem ikinci gün ko-kültür sferoidleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında, büyüklük bakımından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark ortaya koymuştur. Yalnızca üçüncü gün Ishikawa mono-sferoidleriyle

arasındaki fark istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir. Tüm bunların sonucunda ko-kültür sferoidlerinin endotel hücre hattının varlığından dolayı daha iyi gelişmesi, mono-kültür tümör sferoidlerinden daha büyük olması hipotezimizle uyumluluk göstermiştir. Tümör mikro çevresinde bulunan endotel hücrelerin tümör büyümesi ve anjiyogenezi desteklediği bilinmektedir(80). Ayrıca tümör anjiyogenezinin de kan damarlarında bulunan endotel hücre varlığının artmasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir(74). Daha önce yapılmış bir çalışmada meme kanseri hücrelerinin, endotel hücrelere yapışarak migrasyon ve invazyon kabiliyetini arttırdığı gösterilmiştir(132). Ayrıca yapılan bir başka çalışmada yumurtalık kanseri hücrelerinin VGFA(vasküler büyüme faktörü-A) muamele edilmesine rağmen kılcal bir oluşum göstermediği fakat Huvec hücreleriyle birlikte kültürlendiklerinde endotel hücre dallanma noktalarının ve kapiller tüplerin sayısında bir artış ve anjiyogenik davranışlar gösterdikleri belirtilmiştir(133). Bu nedenle çalışmamızda kullandığımız endotel hücre hattının *in vivo*' da olduğu gibi tümör hücrelerinin büyümesini arttırdığını söyleyebiliriz.

Hayvan modelleriyle karşılaştırıldığında, üç boyutlu ko-kültürler daha ekonomiktir ve belirli hücre türleri arasındaki hücre iletişiminin incelenmesini kolaylaştırır. Aksi takdirde hücre iletişimi, tümör mikro ortamında meydana gelen çoklu ve eşzamanlı etkileşimler tarafından maskelenir(67). Kanser, anormal E-kaderin ekspresyonu ile ilişkilendirilebilir. Endometriyum kanserlerinde E-kaderin ekspresyonunun kaybı ve integrin ekspresyonunun yeniden düzenlenmesi(3, 134) kanser hücrelerinin miyometriuma daha derin penetrasyonu, uterusu tümör proliferasyonu ve pelvik lenf nodlarına metastaz yapmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir(134-136). Son yıllarda artan kanıtlar, E-kaderin' in meme, mide ve akciğer gibi birçok insan kanserinde istenmeyen klinikopatolojik parametreler ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur(137).

Çalışmamızda oluşturulan Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidlerinde hücre adezyon molekülü olan E-kaderin ve β -katenin ekspresyonları, immüno Floresan boyama yöntemiyle semi-kantitatif olarak belirlendi. Bu adezyon moleküllerinin varlığı hem iki boyutlu hem üç boyutlu hücre kültüründe mono-kültür ve ko-kültür halinde karşılaştırıldı.

Üç boyutlu sferoidler oluşturularak yapılan hücre kültürü çalışmalarında karşılaşılan en büyük problem boyut bakımından standardizasyonların sağlanmasında güçlük çekilmesidir(50). Sferoid oluştururken ekilen hücre sayısı eşit olsa da elde edilen sferoidlerin büyüklükleri kontrol edilememektedir. Bu problemin önüne oldukça fazla sayıda sferoid üreterek içlerinden birbirlerine mümkün olduğunca en yakınları seçilerek geçilebilir. Bunun yanında sferoidlerin boyama işlemleri için başka bir ortama aktarılması gerekmektedir. Bu aktarım sırasında sferoidi görebilmek, düzgünce alabilmek ve parçalanmasına engel olmak deneylerimizi sırasında karşılatığımız zorluklardan biridir. Boyama için fiksasyon işleminden sonra sferoidler genellikle aktarıldıkları kuyucukların içerisinde yüzer halde bulunmaktadır. Bu durum boyama için gerekli işlemler sırasında sferoidlerin pipet ucuna kaçmasına ya da kuyucuğun duvarlarına yapışmasına da neden olabilmektedir. Deney sırasında pek çok sferoidin bu şekilde kaybedilmesi sebebiyle oldukça fazla deney tekrarı gerekmiştir. Boyama yapıldıktan sonra görüntüleme işlemi için lamın üzeri lamel yardımıyla kapatılmıştır. Sferoidlerin boyutlarının tam olarak birbirlerine eşit olma olasılığı mümkün olmadığı için tüm sferoidlerden eşit sayıda ve aynı bölgeye denk gelecek şekilde Z-stack alabilmek de karşılatığımız problemler arasında önemli yer tutmuştur.

E-kaderin rabbit monoklonal antikor ile immünofloresan boyama yapılan Huvec mono-sferoidlerinin E-kaderin ekspresyonunun diğerlerinden daha az olması hipotezimize dair beklentilerimiz arasında yer almaktaydı. Ishikawa mono-sferoidlerinde E-kaderin ekspresyonu diğer iki gruba oranla oldukça yüksek kaydedildi. Renal ve hepatosellüler karsinom hücre hatlarında sferoid oluşumunun E-Kaderin ekspresyon seviyelerinin artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(3). Gerçekleştirdiğimiz immünofloresan boyama ile endometriyal kanser hücre hattında da sferoid oluşumunun E-kaderin ekspresyon seviyesinin artışına bağlı olduğunu göstermiş bulunmaktayız. Froeling ve arkadaşları kanser hücrelerinin stromal hücrelerle birlikte kültürlendiklerinde E-kaderin ekspresyonlarında azalma olduğunu göstermişlerdir(138). Huvec ve Ishikawa hücre hatlarıyla oluşturduğumuz ko-kültür sferoidlerinin ekspresyon seviyeleri Ishikawa mono-sferoidlerinden anlamlı derecede az kaydedildi. Bu sonuç, Ishikawa hücrelerinin Huvec hücreleri ile kültürlendiklerinde, E-kaderin ekspresyonunun baskılandığını düşündürmektedir.

Endotel hücrelerin E-kaderin ekspresyonunun çok az veya hiç olmadığı bilinmektedir. Endotel hücreler VE-kaderin ve N-kaderin eksprese ederler. N-kaderin'in hücre dışı alanında, endotel hücrelerde bulunan fibroblast büyüme faktörü reseptörlerinin, (FGF) aktivasyonundan sorumlu olan bir bölge tanımlanmıştır(139). Huvec hücrelerinde yer alan FGF-1 reseptör aracılı bFGF, E-Kaderin ekspresyonunu azaltmaktadır(140). Hem mono-kültür hem ko-kültür sferoidlerine yapmış olduğumuz immünofloresan boyama sonucunda ko-kültür sferoidlerinin hücresel iletişiminin daha fazla olması nedeniyle Huvec hücrelerinin Ishikawa hücrelerinin E-kaderin ekspresyonunu baskılamış olabileceğini düşünmekteyiz. Azalan E-kaderin ekspresyon seviyesi, *in vivo*'da hücrelerin daha karmaşık bir mikro çevrede bulunduğunu ve sinyal mekanizmalarının daha fazla olduğunu bu nedenle ko-kültür tekniğinin yapılacak araştırmalar için daha açıklayıcı olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür sferoidleriyle gerçekleştirdiğimiz β -katenin monoklonal antikoru ile immünofloresan boyamada, her üç sferoide ait optik kesitlerin intensity değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. E-kaderin ekspresyon seviyesi azalmış olsa bile β -katenin ekspresyon seviyesi mono-kültür ve ko-kültür sferoidi arasında farklılık göstermemiştir. Froeling ve ark. pankreas kanseri hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun azalmasının aksine β -katenin ekspresyonunun stromal hücre varlığında arttığını gözlemlemişlerdir(138). Fakat çalışmamızda ko-kültür sferoidlerinde β -katenin ekspresyonlarında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Sferoidlerin görünmeye başladığı ilk kesitten itibaren sırasıyla 10 adet optik kesit seçildi. Bu işlem yalnızca aynı kesitlerde intensity değerlerini karşılaştırabilmek amacıyla yapıldı. Örneğin E-kaderin intensity değeri bir Huvec mono-sferoidinin 5. kesitinde 2,589 olarak ölçülürken Ishikawa mono-sferoidinde 9,302 ve ko-kültür sferoidinde 26,084 olarak ölçüldü. β -katenin ekspresyon seviyeleri seçtiğimiz 6. kesitte Huvec mono-sferoidi için 0,956 ölçülürken Ishikawa mono-sferoidin 1,955 ve ko-kültür sferoidinde 18,702 olarak ölçüldü. İstatistiksel analiz yapılırken tüm kesitlere ait toplam intensity değeri üzerinden üç grup arasında karşılaştırma yapıldı.

E-kaderin ve β -katenin intensity değerlerini görmek için iki boyutlu hücre kültüründe Huvec, Ishikawa mono-kültür ve ko-kültür modelleri hazırlandı. E-

Kaderin intensity değerleri Ishikawa mono-kültür hücrelerinde diğer iki hücre grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Aynı şekilde β -katenin intensity değeri iki boyutlu Ishikawa mono-kültüründe Huvec ve ko-kültür hücrelerinden anlamlı derecede yüksek kaydedildi. Canlı dokularda bitişik hücre tipleri arasında güçlü bir damarlanma ve etkileşim vardır. İki boyutlu mono-kültür sisteminde tek hücre çeşidi yalnız başına büyütülür ve biyolojik deneyler için kullanılır. Bu açıdan *in vivo* gibi hücreler arası etkileşim ve üç boyutlu görünüme sahip değildir. İki boyutlu mono-kültür sisteminin biyolojik deneylerde üç boyutlu ko-kültür sisteminden daha az güvenilir olduğuna inanılmaktadır(141). Bu nedenle iki boyutlu hücre kültürüyle yapmış olduğumuz mono-kültür ve ko-kültür karşılaştırmamızdan çıkan sonuçların, üç boyutlu hücre kültürü tekniğinde elde ettiğimiz sonuçlarla sağlamlasını gerçekleştirmiş bulunmaktayız. İki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültürlerini karşılaştırabilmek hücrelerin fiziksel ve fonksiyonel durumları göz önünde bulundurulduğunda, optimizasyon sağlamanın zorluğu nedeniyle karşılaştırılamamıştır.

Gerçekleştirdiğimiz tez çalışması hem iki boyutlu hem de üç boyutlu olarak mono-kültür ve ko-kültür modellerinin karşılaştırılması için yapılmış en geniş çaplı çalışma olma özelliğine sahiptir. Daha önce herhangi bir çalışmada sferoidlerin boyutu üç gün boyunca gözlenerek mono-kültür ve ko-kültür arasındaki fark ortaya konulmamıştır. Ayrıca E-kaderin ve β -katenin intensity değerlerinin her iki teknikte iki boyutlu ve üç boyutlu olarak karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Farklı bir ekip tarafında daha önce yapılmış bir deneysel çalışmada, karaciğer ve pankreas kanserlerinde E-kaderin ve β -katenin ekspresyon seviyeleri ko-kültür tekniğiyle ölçülmüştür. Fakat endometriyum kanserinde ko-kültür tekniğiyle E-kaderin ve β -katenin intensity değeriyle ilişkili bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamız aynı zamanda endometriyum kanserinin endotel hücrelerle birlikte kültürlendikten sonra görülen E-kaderin ve β -katenin intensity değerlerini ortaya koymaktadır. Bundan sonraki çalışmalarımızda, iki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültüründe mono-kültür ve ko-kültür modellerinde E-kaderin ve β -katenin ekspresyon miktarlarını Western Blot tekniğiyle belirleyerek, mRNA ekspresyon seviyeleriyle ilgili daha detaylı ve kantitatif sonuçlarla karşılaştırma parametrelerini artırmayı hedeflemekteyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Carey MS, Gawlik C, Fung-Kee-Fung M, Chambers A, Oliver T, Group CCOPGIGCDS. Systematic review of systemic therapy for advanced or recurrent endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 2006;101(1):158-67.
2. Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology*. 1999;67(3):148-57.
3. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*. 2008;3(9-10):1172-84.
4. Calmels TP, Mattot V, Wernert N, Vandebunder B, Stéhelin D. Invasive tumors induce c-ets1 transcription factor expression in adjacent stroma. *Biology of the Cell*. 1995;84(1-2):53-61.
5. Nyga A, Cheema U, Loizidou M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *Journal of cell communication and signaling*. 2011;5(3):239.
6. Wijnhoven B, Dinjens W, Pignatelli M. E-cadherin–catenin cell–cell adhesion complex and human cancer. *British Journal of Surgery*. 2000;87(8):992-1005.
7. Cell Culture https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture 2020 [cited 2020 29.03]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_culture.
8. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today*. 2013;18(5-6):240-9.
9. Brown M-J, Bahsoun S, Morris MA, Akam EC. Determining conditions for successful culture of multi-cellular 3D tumour spheroids to investigate the effect of mesenchymal stem cells on breast cancer cell invasiveness. *Bioengineering*. 2019;6(4):101.
10. Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*. 2017;32(4):266-77.
11. Taylor MW. A history of cell culture. *Viruses and man: a history of interactions*: Springer; 2014. p. 41-52.
12. Bowey-Dellinger K, Dixon L, Ackerman K, Vigueira C, Suh YK, Lyda T, et al. Introducing mammalian cell culture and cell viability techniques in the undergraduate biology laboratory. *Journal of microbiology & biology education*. 2017;18(2).
13. Unchern S, editor *Basic techniques in animal cell culture*. Drug Deliv Syst Workshop; 1999.
14. Jedrzejczak-Silicka M. *History of cell culture*: InTech; 2017.
15. Ambrose CT. An amended history of tissue culture: Concerning Harrison, Burrows, Mall, and Carrel. *Journal of medical biography*. 2019;27(2):95-102.
16. Mc Keehan WL, Barnes D, Reid L, Stanbridge E, Murakami H, Sato GH. *Frontiers in mammalian cells culture. In vitro cellular & developmental biology*. 1990;26(1):9-23.
17. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science: AMS*. 2018;14(4):910.

18. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*. 2014;12(4):207-18.
19. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020;7:33.
20. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to cell culture. *Human Cell Culture Protocols: Springer*; 2012. p. 1-13.
21. Chandrasekaran A, Avci HX, Ochalek A, Rösingh LN, Molnar K, Laszlo L, et al. Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem cell research*. 2017;25:139-51.
22. Carter M. Animal cell culture: Scientific e-Resources; 2019.
23. Adherent cells [cited 2020 03.04.]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/subculture-of-adherent.html>.
24. Confluent cells vs Suspended cells [cited 2020 03.04.]. Available from: <http://mayasresearch.blogspot.com/2011/09/confluent-cells-vs-suspended-cells.html>.
25. Fibroblastic cells [cited 2020 03.04.]. Available from: <https://www.sciencellonline.com/human-adrenal-cortical-cells.html>.
26. Epithelial cells [cited 2020 03.04.]. Available from: <https://www.sciencellonline.com/mouse-renal-proximal-tubular-epithelial-cells-2249.html>.
27. Lymphoblastic cells [cited 2020 03.04.]. Available from: <https://www.slideshare.net/suknamgoong/cell-culture-01>.
28. Neuronal cells [cited 2020 03.04.]. Available from: <https://www.sciencellonline.com/mouse-neurons-hippocampal.html>.
29. Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2008;14(1):61-86.
30. Kim BB, Tae JY, Ko Y, Park JB. Lovastatin increases the proliferation and osteoblastic differentiation of human gingiva-derived stem cells in three-dimensional cultures. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019;18(5):3425-30.
31. Ko KR. Development Of High-throughput 3d Neural Cell Culture Platforms For Modelling Parkinson's Disease. 2017.
32. Notbohm J, Napiwocki B, de Lange W, Stempien A, Saraswathibhatla A, Craven R, et al. Two-dimensional culture systems to enable mechanics-based assays for stem cell-derived cardiomyocytes. *Experimental mechanics*. 2019;59(9):1235-48.
33. Bai RG, Muthoosamy K, Manickam S, Hilal-Alnaqbi A. Graphene-based 3D scaffolds in tissue engineering: fabrication, applications, and future scope in liver tissue engineering. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:5753.
34. Sun T, Jackson S, Haycock JW, MacNeil S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. *Journal of biotechnology*. 2006;122(3):372-81.
35. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology*. 2011;21(12):745-54.
36. Koledova Z. 3D cell culture: an introduction. *3D Cell Culture: Springer*; 2017. p. 1-11.

37. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I, editors. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in cancer biology*; 2005: Elsevier.
38. 2D vs 3D [cited 2020 05.04]. Available from: <https://www.creative-biolabs.com/adc/2d-vs-3d.htm>.
39. Yildiz-Ozturk E, Gulce-Iz S, Anil M, Yesil-Celiktas O. Cytotoxic responses of carnosic acid and doxorubicin on breast cancer cells in butterfly-shaped microchips in comparison to 2D and 3D culture. *Cytotechnology*. 2017;69(2):337-47.
40. Dong Z, Zhang H, Gong X, Wei W, Lv Y, Chen Z, et al. The Role of the Tumor Microenvironment in Neuropilin 1-Induced Radiation Resistance in Lung Cancer Cells. *Journal of Cancer*. 2019;10(17):4017.
41. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130(4):601-10.
42. Alghuwainem A, Alshareeda AT, Alsowayan B. Scaffold-Free 3-D Cell Sheet Technique Bridges the Gap between 2-D Cell Culture and Animal Models. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(19):4926.
43. Mabrouk M, Beherei HH, Das DB. Recent progress in the fabrication techniques of 3D scaffolds for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2020:110716.
44. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha E, Solomon FP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of cellular physiology*. 2015;230(1):16-26.
45. Chan B, Leong K. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal*. 2008;17(4):467-79.
46. Ferreira L, Gaspar V, Mano J. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models-Advances and prospects. *Acta biomaterialia*. 2018;75:11-34.
47. Matsusaki M, Case CP, Akashi M. Three-dimensional cell culture technique and pathophysiology. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014;74:95-103.
48. Liu Z, Vunjak-Novakovic G. Modeling tumor microenvironments using custom-designed biomaterial scaffolds. *Current opinion in chemical engineering*. 2016;11:94-105.
49. Xu X-x, Liu C, Liu Y, Li N, Guo X, Wang S-j, et al. Encapsulated human hepatocellular carcinoma cells by alginate gel beads as an in vitro metastasis model. *Experimental cell research*. 2013;319(14):2135-44.
50. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015;17(1):1-15.
51. Kani MH, Chan E-C, Young RC, Butler T, Smith R, Paul JW. 3D cell culturing and possibilities for myometrial tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*. 2017;45(7):1746-57.
52. Zurina I, Shpichka A, Saburina I, Kosheleva N, Gorkun A, Grebenik E, et al. 2D/3D buccal epithelial cell self-assembling as a tool for cell phenotype maintenance and fabrication of multilayered epithelial linings in vitro. *Biomedical Materials*. 2018;13(5):054104.
53. Huang H, Zhang P, Chen H, Ji L, Chao H. Comparison between polypyridyl and cyclometalated ruthenium (II) complexes: anticancer activities against 2D and 3D cancer models. *Chemistry—A European Journal*. 2015;21(2):715-25.

54. Shield K, Ackland ML, Ahmed N, Rice GE. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecologic oncology*. 2009;113(1):143-8.
55. Ryu N-E, Lee S-H, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 2019;8(12):1620.
56. Shri M, Agrawal H, Rani P, Singh D, Onteru SK. Hanging drop, a best three-dimensional (3D) culture method for primary buffalo and sheep hepatocytes. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-14.
57. Amaral RL, Miranda M, Marcato PD, Swiech K. Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. *Frontiers in physiology*. 2017;8:605.
58. Gupta N, Liu JR, Patel B, Solomon DE, Vaidya B, Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioengineering & translational medicine*. 2016;1(1):63-81.
59. Mehling M, Tay S. Microfluidic cell culture. *Current opinion in Biotechnology*. 2014;25:95-102.
60. Damiati S, Kompella UB, Damiati SA, Kodzius R. Microfluidic devices for drug delivery systems and drug screening. *Genes*. 2018;9(2):103.
61. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International journal of molecular sciences*. 2018;19(1):181.
62. Matsuda Y, Kawamoto Y, Teduka K, Peng W-X, Yamamoto T, Ishiwata T, et al. Morphological and cytoskeletal alterations of nervous system tumor cells with different culturing methods. *International journal of oncology*. 2011;38(5):1253-8.
63. Shimasaki T, Yamamoto S, Arisawa T. Exosome Research and Co-culture Study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2018;41(9):1311-21.
64. Im G-I. Coculture in musculoskeletal tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2014;20(5):545-54.
65. Zou J, Bai B, Yao Y. Progress of co-culture systems in cartilage regeneration. *Expert opinion on biological therapy*. 2018;18(11):1151-8.
66. Hu KY, Wang DG, Liu PF, Cao YW, Wang YH, Yang XC, et al. Targeting of MCT1 and PFKFB3 influences cell proliferation and apoptosis in bladder cancer by altering the tumor microenvironment. *Oncology reports*. 2016;36(2):945-51.
67. Marino S, Bishop RT, de Ridder D, Delgado-Calle J, Reagan MR. 2D and 3D in vitro co-culture for cancer and bone cell interaction studies. *Bone Research Protocols: Springer*; 2019. p. 71-98.
68. Paschos NK, Brown WE, Eswaramoorthy R, Hu JC, Athanasiou KA. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2015;9(5):488-503.
69. Perduns R, Volk J, Plum M, Gutzki F, Kaefer V, Geurtsen W. Effects of HEMA on Nrf2-related gene expression using a newly developed 3D co-culture model of the oral mucosa. *Dental Materials*. 2019;35(9):1214-26.
70. Tan PH, Aung K, Toh S, Goh JC, Nathan S. Three-dimensional porous silk tumor constructs in the approximation of in vivo osteosarcoma physiology. *Biomaterials*. 2011;32(26):6131-7.
71. Morales D, Lombart F, Truchot A, Maire P, Hussein M, Hamitou W, et al. 3D Coculture Models Underline Metastatic Melanoma Cell Sensitivity to Vemurafenib. *Tissue Engineering Part A*. 2019;25(15-16):1116-26.

72. Chhetri A, Chittiboyina S, Atrian F, Bai Y, Delisi DA, Rahimi R, et al. Cell Culture and Coculture for Oncological Research in Appropriate Microenvironments. *Current protocols in chemical biology*. 2019;11(2):e65.
73. Lund ME, Campbell DH, Walsh BJ. The Role of Glypican-1 in the Tumour Microenvironment. *Tumor Microenvironment*: Springer; 2020. p. 163-76.
74. Osman A, Afify SM, Hassan G, Fu X, Seno A, Seno M. Revisiting Cancer Stem Cells as the Origin of Cancer-Associated Cells in the Tumor Microenvironment: A Hypothetical View from the Potential of iPSCs. *Cancers*. 2020;12(4):879.
75. Singh S, Tran S, Putman J, Tavana H. Three-dimensional models of breast cancer–fibroblasts interactions. *Experimental Biology and Medicine*. 2020:1535370220917366.
76. Chmielik E. Pathology and Tumor Microenvironment: Past, Present, and Future. *Pathobiology*. 2020:1-3.
77. Nazemi M, Rainero E. Cross-talk between the tumor microenvironment, extracellular matrix, and cell metabolism in cancer. *Frontiers in Oncology*. 2020;10.
78. Li X, Song Q, Guo X, Wang L, Zhang Q, Cao L, et al. The Metastasis Potential Promoting Capacity of Cancer-Associated Fibroblasts Was Attenuated by Cisplatin via Modulating KRT8. *OncoTargets and therapy*. 2020;13:2711.
79. Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer letters*. 2017;387:61-8.
80. Saggiaro M, D'Angelo E, Bisogno G, Agostini M, Pozzobon M. Carcinoma and Sarcoma Microenvironment at a Glance: Where We Are. *Frontiers in Oncology*. 2020;10.
81. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*. 2016;18(1):84.
82. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(8):457.
83. Wang YY, Attané C, Milhas D, Dirat B, Dauvillier S, Guerard A, et al. Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI insight*. 2017;2(4).
84. Stockmann C, Schadendorf D, Klose R, Helfrich I. The impact of the immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodeling. *Frontiers in oncology*. 2014;4:69.
85. Jiang Y, Wang C, Zhou S. Targeting tumor microenvironment in ovarian cancer: Premise and promise. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2020:188361.
86. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18(1):1-19.
87. Kang HW, Kim W-J, Yun SJ. The role of the tumor microenvironment in bladder cancer development and progression. *Translat Cancer Res*. 2017;6(Suppl 4):S744-S58.
88. Okegawa T, Pong R-C, Li Y, Hsieh J-T. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochimica Polonica*. 2004;51(2):445-57.

89. Togo S, Sato K, Kawamura R, Kobayashi N, Noiri M, Nakabayashi S, et al. Quantitative evaluation of the impact of artificial cell adhesion via DNA hybridization on E-cadherin-mediated cell adhesion. *APL bioengineering*. 2020;4(1):016103.
90. Janiszewska M, Primi MC, Izard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;jbc. REV119. 007759.
91. Schmidt EP, Kuebler WM, Lee WL, Downey GP. Adhesion molecules: master controllers of the circulatory system. *Comprehensive Physiology*. 2011(2):945-73.
92. Sousa B, Pereira J, Paredes J. The crosstalk between cell adhesion and cancer metabolism. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(8):1933.
93. Stadler M, Scherzer M, Walter S, Holzner S, Pudelko K, Riedl A, et al. Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-16.
94. von Lersner A, Drosen L, Zijlstra A. Modulation of cell adhesion and migration through regulation of the immunoglobulin superfamily member ALCAM/CD166. *Clinical & experimental metastasis*. 2019;36(2):87-95.
95. Ghasemi A, Saeidi J, Azimi-Nejad M, Hashemy SI. Leptin-induced signaling pathways in cancer cell migration and invasion. *Cellular Oncology*. 2019:1-18.
96. Cellular Adhesion Molecules [cited 2020 03.05]. Available from: <https://sites.google.com/site/chsanatomyphysiology27/home/cellular-adhesion-molecules-cam>.
97. Abdal Dayem A, Lee S, Y. Choi H, Cho SG. The impact of adhesion molecules on the in vitro culture and differentiation of stem cells. *Biotechnology journal*. 2018;13(2):1700575.
98. Eslami A, Philpot J. The role of integrins in wound healing. *The Science Creative Quarterly*. 2005.
99. Immunoglobulin Superfamily [cited 2020 03.05]. Available from: <https://www.britannica.com/science/domain-antibody-structure>.
100. Cell Junctions 2017 [cited 2020 03.05]. Available from: https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/Cell_Junctions.
101. Silva M, Videira PA, Sackstein R. E-selectin ligands in the human mononuclear phagocyte system: implications for infection, inflammation, and immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2018;8:1878.
102. Cadherin [cited 2020 03.05]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/cadherin.html>.
103. Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *Journal of molecular histology*. 2004;35(3):309-18.
104. Liu X, Chu K-M. E-cadherin and gastric cancer: cause, consequence, and applications. *BioMed research international*. 2014;2014.
105. Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto SI, Oka H, Kimura Y, Tamura S, et al. Beta-catenin expression in human cancers. *The American journal of pathology*. 1996;148(1):39.
106. Pálmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, et al. Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the

induction of E-cadherin and the inhibition of β -catenin signaling. *The Journal of cell biology*. 2001;154(2):369-88.

107. Woo DK, Kim HS, Lee HS, Kang YH, Yang HK, Kim WH. Altered expression and mutation of β -catenin gene in gastric carcinomas and cell lines. *International journal of cancer*. 2001;95(2):108-13.

108. Wang Z, Zhang H, Hou J, Niu J, Ma Z, Zhao H, et al. Clinical implications of β -catenin protein expression in breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(11):14989.

109. Zhou L, Yang K, Wickett RR, Kadekaro AL, Zhang Y. Targeted deactivation of cancer-associated fibroblasts by β -catenin ablation suppresses melanoma growth. *Tumor Biology*. 2016;37(10):14235-48.

110. Lee C-H, Hung H-W, Hung P-H, Shieh Y-S. Epidermal growth factor receptor regulates β -catenin location, stability, and transcriptional activity in oral cancer. *Molecular cancer*. 2010;9(1):64.

111. Loh C-Y, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: Signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells*. 2019;8(10):1118.

112. Samuelov L, Sprecher E, Tsuruta D, Bíró T, Klopper JE, Paus R. P-cadherin regulates human hair growth and cycling via canonical Wnt signaling and transforming growth factor- β 2. *Journal of investigative dermatology*. 2012;132(10):2332-41.

113. Liang W, Ferrara N. The complex role of neutrophils in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer immunology research*. 2016;4(2):83-91.

114. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: glioblastoma. *Molecular Neurobiology*. 2020:1-18.

115. Li T, Kang G, Wang T, Huang H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology letters*. 2018;16(1):687-702.

116. Viallard C, Larrivé B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017;20(4):409-26.

117. Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U, editors. *The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis*. *Seminars in cancer biology*; 2009: Elsevier.

118. Sobierajska K, Ciszewski WM, Sacewicz-Hofman I, Niewiarowska J. Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *Tumor Microenvironment*: Springer; 2020. p. 71-86.

119. Rahimi N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Molecular cancer therapeutics*. 2012;11(3):538-48.

120. Szymborska A, Gerhardt H. Hold me, but not too tight—endothelial cell–cell junctions in angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2018;10(8):a029223.

121. Bischoff J. Cell adhesion and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(3):373-6.

122. 8-well chamber [cited 2020 04.08]. Available from: <https://ibidi.com/chamber-slides/45-8-well-chamber-removable.html>.

123. 12-well chamber [cited 2020 04.08]. Available from: <https://ibidi.com/chamber-slides/46-12-well-chamber-removable.html>.

124. Kim MJ, Chi BH, Yoo JJ, Ju YM, Whang YM, Chang IH. Structure establishment of three-dimensional (3D) cell culture printing model for bladder cancer. *PloS one*. 2019;14(10):e0223689.
125. Hess MW, Pfaller K, Ebner HL, Beer B, Hekl D, Seppi T. 3D versus 2D cell culture: implications for electron microscopy. *Methods in cell biology*. 96: Elsevier; 2010. p. 649-70.
126. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of anatomy*. 2015;227(6):746-56.
127. Sokolova V, Rojas-Sánchez L, Białas N, Schulze N, Epple M. Calcium phosphate nanoparticle-mediated transfection in 2D and 3D mono-and co-culture cell models. *Acta biomaterialia*. 2019;84:391-401.
128. He W, Kuang Y, Xing X, Simpson RJ, Huang H, Yang T, et al. Proteomic comparison of 3D and 2D glioma models reveals increased HLA-E expression in 3D models is associated with resistance to NK cell-mediated cytotoxicity. *Journal of proteome research*. 2014;13(5):2272-81.
129. Yue X, Lukowski JK, Weaver EM, Skube SB, Hummon AB. Quantitative proteomic and phosphoproteomic comparison of 2D and 3D colon cancer cell culture models. *Journal of proteome research*. 2016;15(12):4265-76.
130. Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*. 2016;7(29):45745.
131. Van Duinen V, Trietsch SJ, Joore J, Vulto P, Hankemeier T. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Current opinion in biotechnology*. 2015;35:118-26.
132. Swaminathan S, Cranston AN, Clyne AM. A Three-Dimensional In Vitro Coculture Model to Quantify Breast Epithelial Cell Adhesion to Endothelial Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2019;25(10):609-18.
133. Flores-Pérez A, Rincón DG, Ruiz-García E, Echavarría R, Marchat LA, Álvarez-Sánchez E, et al. Angiogenesis analysis by in vitro coculture assays in transwell chambers in ovarian cancer. *MicroRNA and Cancer*: Springer; 2018. p. 179-86.
134. Koyuncuoglu M, Okyay E, Saatli B, Olgan S, Akin M, Saygili U. Tumor budding and E-Cadherin expression in endometrial carcinoma: are they prognostic factors in endometrial cancer? *Gynecologic oncology*. 2012;125(1):208-13.
135. Lewczuk Ł, Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K. Cell adhesion molecules in endometrial cancer—A systematic review. *Advances in medical sciences*. 2019;64(2):423-9.
136. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Molecular biology of the cell*. 2016;27(21):3233-44.
137. Zheng X, Du X-L, Jiang T. Prognostic significance of reduced immunohistochemical expression of E-cadherin in endometrial cancer—results of a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(10):18689.
138. Froeling FE, Mirza TA, Feakins RM, Seedhar A, Elia G, Hart IR, et al. Organotypic culture model of pancreatic cancer demonstrates that stromal cells modulate E-cadherin, β -catenin, and Ezrin expression in tumor cells. *The American journal of pathology*. 2009;175(2):636-48.

139. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*. 2004;84(3):869-901.
140. Wu J-C, Yan H-C, Chen W-T, Chen W-H, Wang C-J, Chi Y-C, et al. JNK signaling pathway is required for bFGF-mediated surface cadherin downregulation on HUVEC. *Experimental cell research*. 2008;314(3):421-9.
141. Pandurangan M, Hwang I. Application of cell co-culture system to study fat and muscle cells. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;98(17):7359-64.



9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.33218
Konu : Etik Kurulu Kararı

19/07/2019

Sayın Semiha Mervenur KALENDER

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Ishikawa ve HUVEC hücreleri ile oluşturulmuş sferoid mono-kültür ve sferoid ko-kültür modellerinin morfolojik ve immünohistokimyasal (E-Kaderin ve Beta-Katenin) olarak karşılaştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 19.07.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden FD7BA770X2 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

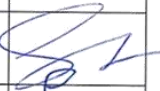

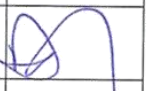
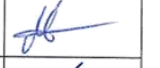

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ishikawa ve HUVEC hücreleri ile oluşturulmuş sferoid mono-kültür ve sferoid ko-kültür modellerinin morfolojik ve immünohistokimyasal (E-Kaderin ve Beta-Katenin) olarak karşılaştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Semiha Mervenur KALENDER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Öğrencisi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
Karar Bilgileri	Karar No: 584	Tarih: 17/07/2019		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCA	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Semiha Mervener	Soyadı	Kalender
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	09.05.1996
Uyruğu	T.C	TC Kimlik No	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans		
Lisans	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik	2018
Lise	Üsküdar Halide Edip Adıvar Anadolu Lisesi	2014

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi
Almanca	Orta	Orta	Orta

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
Ales Puanı	64,9	67,7	69,7
YökDil Puanı	65		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
MS Office	İyi
İmage J	İyi
SPSS	İyi
GraphPad	İyi
Endnote	İyi

Sertifikalar

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	İstanbul Medipol Üniversitesi	2019
---------------------------------------	-------------------------------	------