



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARE İNCE BAĞIRSAK KRİPTLERİNDEN
ELDE EDİLEN HÜCRELERDEN 3-BOYUTLU
KÜLTÜR İLE ORGANOİD OLUŞTURULMASI**

İdris ER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARE İNCE BAĞIRSAK KRİPTLERİNDEN
ELDE EDİLEN HÜCRELERDEN 3-BOYUTLU
KÜLTÜR İLE ORGANOİD OLUŞTURULMASI**

İdris ER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2016

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi İdris ER'in hazırladığı "FARE İNCE BAĞIRSAK KRİPTLERİNDEN ELDE EDİLEN HÜCRELERDEN 3-BOYUTLU KÜLTÜR İLE ORGANOİD OLUŞTURULMASI" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Figen Celep EYÜPOĞLU

Prof. Dr. S. Ayşe ÖZER

Prof. Dr. Ersan KALAY

Tarih: 12/01/2016

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

12/01/2016

İdris ER

İthaf

Yüksek lisans tezimi, her zaman maddi manevi yanımda olan değerli aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübesini paylaşmayı esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan ve takıldığım her noktada bana yol gösteren değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerimi, fikirlerini, yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ersan KALAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e ve Yrd. Doç. Dr. Bayram TORAMAN'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Esin YULUĞ'a teşekkür ederim.

Araştırma süreci ve tez yazım aşamasındaki katkılarının dolayı değerli arkadaşlarım, Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU BUDAK'a Arş. Gör. Burcu YÜCEL, Arş. Gör. Ceren SÜMER'e, Arş. Gör. Derya KAYA'ya, Orhan SEZGİN'e ve diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimimin büyük bir bölümünde yanımda olan, bana her türlü desteği veren ve hayatımı güzelleştiren Arş. Gör. Asiye Büşra BOZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan Metehan AKÇA'ya ve Mustafa DAKMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. KTU Cerrahi Uygulama Araştırma Merkezi Veteriner Hekim Sait AL'a ve Veteriner Sağlık Teknikeri İbrahim AYDIN'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her türlü maddi manevi desteği benden esirgemeyen ve sevgilerini her an yanımda hissettiğim annem ve babam Fatma-Celal ER'e sonsuz teşekkür ederim.

Yurtdışında staj imkanı sağlayan Erasmus Ofisine, laboratuvarında bana staj yapma imkanı veren Hans CLEVERS'a ve danışmanlık yapan Nobuo SASAKI'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını TYL-2015-5176 kodlu Yüksek Lisans Tez Projesi (KTÜ BAP) kapsamında destekleyen KTU Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. İdris ER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. İnce Bağırsak	4
4.2. Kök Hücre Kavramı	6
4.2.1. Yetişkin Kök Hücreleri	7
4.2.1.1. İnce Bağırsak Kök Hücreleri	8
4.2.2. Kök Hücre Mikroçevresi	9
4.3. Üç Boyutlu Kültür Sistemi	11
4.4. Organoid Kavramı	11
4.5. Organoid Kültürü	12
4.6. İnce Bağırsak Organoidi	14
4.7. İnce Bağırsak Organoid Oluşumunun Moleküler Mekanizması	15
5. GEREÇ ve YÖNTEM	18
5.1. Gereç	18
5.1.1. Çalışmada Kullanılacak Farelerin Temini	18
5.1.2. Kimyasallar	18
5.1.3. Doku Kültürü Malzemeleri	19
5.1.4. Hücre ve Hücre Yüzey Antikorları	19
5.1.5. Cihazlar	19
5.1.6. Sarf Malzemeler	20
5.1.7. Solusyonlar	21
5.2. Yöntem	24
5.2.1. Fare İnce Bağırsak Kript İzolasyonu	24

5.2.2. Toplanan Kriptlerden Tek Hücre Süspansiyonu Elde Edilmesi	26
5.2.3. Matrijelin Hazırlanması ve Tek Hücre Süspansiyonunun Matrigel ile Ekilmesi	26
5.3. Organoid Kültürü İçin Basal Medyum Hazırlanması	27
5.3.1. Fare İnce Bağırsak Organoidlerinin Kültür Ortamı	28
5.4. Organoidlerin Pasajlanması	28
5.5. Organoidlerin ve Fare İnce Bağırsak Dokusunun Parafine Gömülmesi	29
5.5.1. Parafine Gömülen Örneklerden Kesit Alma	31
5.5.2. Alınan Kesitler İçin Hematoxylin & Eosin Boyaması	31
5.6. Organoidi Oluşturan Hücrelerin Akım Sitometri Analizleri	32
5.7. Organoidi Oluşturan Paneth Hücrelerinin Anti-Lizozim İle İmmünohistokimyasal Boyanması	35
5.8. Organoidlerin Sıvı Nitrojende Dondurulması	36
5.9. Dondurulmuş Organoidlerin Çözülmesi	37
6. BULGULAR	38
6.1. Fare İnce Bağırsaklarından Kriptlerin İzolasyonu	38
6.2. Kriptlerden İzole Edilen Hücrelerden Organoidlerin Oluşturulması	39
6.3. Organoidlerin Hematoksilen ve Eosin Boyanması	41
6.4. Organoidlerdeki Paneth Hücrelerinin Anti-Lizozim İle İmmünohistokimyasal Olarak Tespit Edilmesi	43
6.5. Organoidi Oluşturan Hücre Popülasyonundaki Hücrelerinin Akım Sitometrisi ile Tespit Edilmesi	45
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	50
9. KAYNAKLAR	51
10. ETİK KURUL ONAYI	61
11. ÖZGEÇMİŞ	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Hücre Hattı, ksenograft ve organoidlerin karşılaştırılması	14
Tablo 2. Organoid kültürü besiyeri bileşeni	28



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	İnce bağırsak epiteli	5
Şekil 2.	İnce bağırsak kript yapısı	6
Şekil 3.	Kök hücre çeşitleri	7
Şekil 4.	İnce bağırsak organoidin şematize şekli	12
Şekil 5.	Bağırsak kript villus yapısı ve sinyal yolları	16
Şekil 6.	Fare sindirim sistemi şematize hali	25
Şekil 7.	Fare ince bağırsağından kript izolasyonu	26
Şekil 8.	Matrijelin kuyucuklara ekilmesi	27
Şekil 9.	Parafin bloğa gömülmüş eozin ile boyanmış organoidler	30
Şekil 10.	Akım sitometrisi çalışma prensibi	33
Şekil 11.	İnce bağırsaktan izole edilen kriptlerin invert mikroskop görüntüleri	39
Şekil 12.	İnce bağırsak organoid oluşumu	40
Şekil 13.	Kript ve villus kısımlarının invert mikroskop görüntüleri	41
Şekil 14.	Fare ince bağırsak dokusunun HE ile görüntülenmesi	42
Şekil 15.	Organoidlerin HE boyası ile morfolojilerinin görüntüsü	42
Şekil 16.	Organoidlerdeki paneth hücrelerinin immonohistokimyasal olarak gösterilmesi	44
Şekil 17.	Organoidi oluşturan hücre popülasyonundaki CD24 ekspresyonu	45
Şekil 18.	Organoidi oluşturan hücre popülasyonundaki CD44 ekspresyonu	46

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

Bmi1	Polycomb complex protein Bmi1
BMP	Kemik morfojenetik proteini
BSA	Sığır serum albumin
CBC	Kript tabanı kök hücresi
CD	Sınıflandırma belirleyicisi
cm	Santimetre
DAB	Diaminobenzidin
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GFR	Büyüme faktörü kısıtlayıcı
HE	Hematoksilen-Eozin
Ig	Immünglobilin
IgG	Immünglobilin G
IHC	İmmunohistokimya
Lgr 5	Lösin-zengin-tekrar-içeren G-protein bağlı reseptör 5
Lrp5/6	Düşük-yogunluk lipoprotein reseptör-ilişkili protein 5\6
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
MSI1	RNA bağlayıcı protein Musashi homolog 1
PDTX	Hasta kökenli tümör ksenograft
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PFA	Paraformaldehit
PI	Propidyum iyodid
RNA	Ribo nükleik asit
rpm	Dakika başına devir sayısı
WIP1	Yabanil tip p53-uyarıcı fosfataz 1
TGF-β	Değişim (transforming) büyüme faktörü beta
2D	İki boyutlu
3D	Üç boyutlu

1. ÖZET

Fare İnce Bağırsak Kriptlerinden Elde Edilen Hücrelerden 3-Boyutlu Kültü İle Organoid Oluşturulması

İnce bağırsak epitelı, basit yapısı ve sürekli yenilenme yeteneği sayesinde memeli yetişkin kök hücre çalışmalarında kullanılabilir en uygun dokulardan biridir. İnce bağırsağın epitel yapısını kript ve villus yapıları oluşturmaktadır. Villuslar, alt mukozada bulunan kript adı verilen yapıda yerleşik kök hücre popülasyonundan sürekli olarak yenilenmektedir. Bu tez kapsamında, kök hücrelerin sürekli çoğalıp farklılaşma özelliğinden dolayı ince bağırsak epitelı seçilmiştir. Kriptin yapısında bulunan kök hücreler etraflarındaki niş (mikroçevre) hücrelerinin desteğiyle fonksiyonlarını yerine getirmektedir. Bu nedenle, doku kültürü çalışmalarında, tek bir hücre tipi yerine doku oluşumunda rol alan farklı hücre gruplarıyla çalışılması gerekmektedir. Bilim adamları bu gibi durumlarda canlı model organizmalara yönelmektedirler. Canlı organizmalar üzerinde çalışma zorluklarının aşılmasına yönelik arayışlar, 3-boyutlu (3D) kültürler ile elde edilebilen organoid sistemlerinin oluşturulmasına yol açmıştır. Hedef organdan köken alan ve stroma oluşturma yeteneğine sahip kök hücrelere, gerekli koşulların sağlanmasıyla oluşturulan, minyatür organ benzeri yapılar, organoid olarak adlandırılır. Organoid sistemi ile çalışılacak dokunun yapısını oluşturan tüm hücrelerin aynı kültür ortamında üretilmesi sağlanmaktadır.

Bu çalışmayla, 3-boyutlu kültür sisteminin kurulması ve organoid oluşturulması amaçlanmıştır. Organoid sisteminin kurulması ileride yapılacak, kript biyolojisi, kök hücre çalışmaları, markır gen arama ve anti kanser tedavilerinin geliştirilmesi gibi çalışmalar için, *in vitro* ortamda organın fizyolojik ortamının taklit edilebilmesi ve genetik dengesizlik oluşmadan uzun süre çoğaltılabilmesi gibi önemli avantajlar sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu çalışmada, fare ince bağırsak kript yapısından izole edilen hücrelerden 3-boyutlu kültür ile *in vitro* ortamda organın minyatür hali olan, ince bağırsak organoidi oluşturulmuştur. Organoidlerin oluşturulması ve yeni çalışmaların planlanması, ülkemize ve üniversitemize dünyada son zamanlarda üzerinde çokça çalışmaların başlatıldığı ve gelişme gösteren bir konuya dahil olma şansı verecektir.

Anahtar Kelimeler: İnce bağırsak epitelı, Kript, Organoid, Yetişkin kök hücre

2. SUMMARY

Establishment Of Organoid From The Cells Of Mouse Small Intestine Crypts By 3-D Culture

Small intestinal epithelium is one of the most convenient tissue for mammalian adult stem cell studies thanks to its simple structure and rapidly regeneration ability. The intestinal epithelium consists of crypt and villus. Villus is enriched by several contiguous, proliferative 'crypt' compartments within the underlying submucosa. In this study, small intestine is chosen due to its property of rapidly proliferation and differentiation ability of stem cells. Tissue stem cells function with the support of niche (microenvironment) cells. Therefore, in tissue culture studies various cell types should be used rather than a single type of cells. Scientists trend to living organisms when they need this kind of situations. Challenges of studying with living organisms have led to the establishment of organoids which are obtained by three-dimensional cultures. Mini-organ like structures generated by providing necessary conditions for stem cells which are originated from target organs and able to form stroma, are called organoids. Organoid systems allow different cell types originated from same tissue to grow in the same culture dish.

In this study it is aim to establish 3-dimensional culture system and organoid. To form the organoid system will provide significant benefits, such as modelling the physiological environment of an organ and long term replication without genetic instability for future studies including crypt biology, stem cell research and marker gene search, development of anti-cancer treatment, etc. In this study, we have been formed organoids from the cells isolated from mice intestine crypt structures using 3-dimensional culture techniques. We strongly suggest that establishment of organoids will contribute to our university, country and the studies which have been shown great progress and attracts growing interest in the world, recently.

Key Words: Small intestine epithelium, Crypt, Organoid, Adult stem cell

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnce bağırsak yapısında bulunan ve kendini yenileme özelliği olan kök hücreler düzenli olarak çoğalabilmekte ve sürekli bir döngü içinde ince bağırsak epitelindeki hücreleri oluşturma yeteneği göstermektedirler. Bir kripte tahminen 4-6 kök hücre bulunmaktadır. Belli bir dokuyu oluşturan ve bu dokuya ait toplam hücre popülasyonu içinde sadece küçük bir kısmı temsil eden yetişkin kök hücrelerin belirlenmesi oldukça zor bir süreçti. Ancak, günümüzde yapılan çalışmalarda yetişkin kök hücreler için seçici olan markırlar kullanılarak, bu hücrelerin doku homeostazisi, doku ve organ tamir mekanizmaları, kanser oluşumu ve gelişimindeki rolleri belirlenmeye başlanmıştır. Son on yılda bağırsak epitelinde bulunan kök hücre popülasyonları için de, çeşitli markırlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (1). Günümüzde, kök hücre çalışmalarında, organ biyolojisinin anlaşılmasında ve kanser çalışmalarında, 2-boyutlu (2D) sistemin yanında 3-boyutlu kültür sistemleri de kullanılmaya başlanmıştır. İki-boyutlu kültür sistemleri, kullanılan hücre hatlarının zaman içinde genotipik değişimler ve düşük pasajlanma kapasiteleri göstermesi, çapraz-kontaminasyonu engellemek için sürekli kontrol grubu oluşturma zorunluluğunun bulunması gibi dezavantajları da beraberinde getirmektedir (2). Bu nedenlerden dolayı çalışmalarda yeni bir kültür sistemi olan 3-boyutlu organoid kültürleri geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, fare ince bağırsak kript yapısından elde edilen ve içerisinde kök hücrelerin de bulunduğu hücre popülasyonundan, 3-boyutlu kültür sisteminde epitel hücrelerinin stroma oluşturan hali olan kript-villus organoid yapısı oluşturulması hedeflenmiştir. Fare ince bağırsağında bulunan kök hücreler bu 3-boyutlu sistemde çoğalıp farklılaşarak ince bağırsağın minyatür hali olan bağırsak organoidlerini oluşturabilmektedir. Organoid sisteminin kurulması ince bağırsak biyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlayacak çalışmalarımız için alt yapı oluşturacaktır. Organoid kültürü, fare hücrelerinden yapılabildiği gibi insandan biyopsi ile alınan materyallerden de oluşturulabilmektedir. Bu çalışma ile birlikte laboratuvarımızda 3-boyutlu doku kültür sisteminin kurulması ile beraber planlanacak yeni çalışmalara zemin oluşturacaktır. Bu kapsamda yapılan bu tez çalışması, ileride yapmayı düşündüğümüz çeşitli hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalar için bir başlangıç oluşturacaktır.

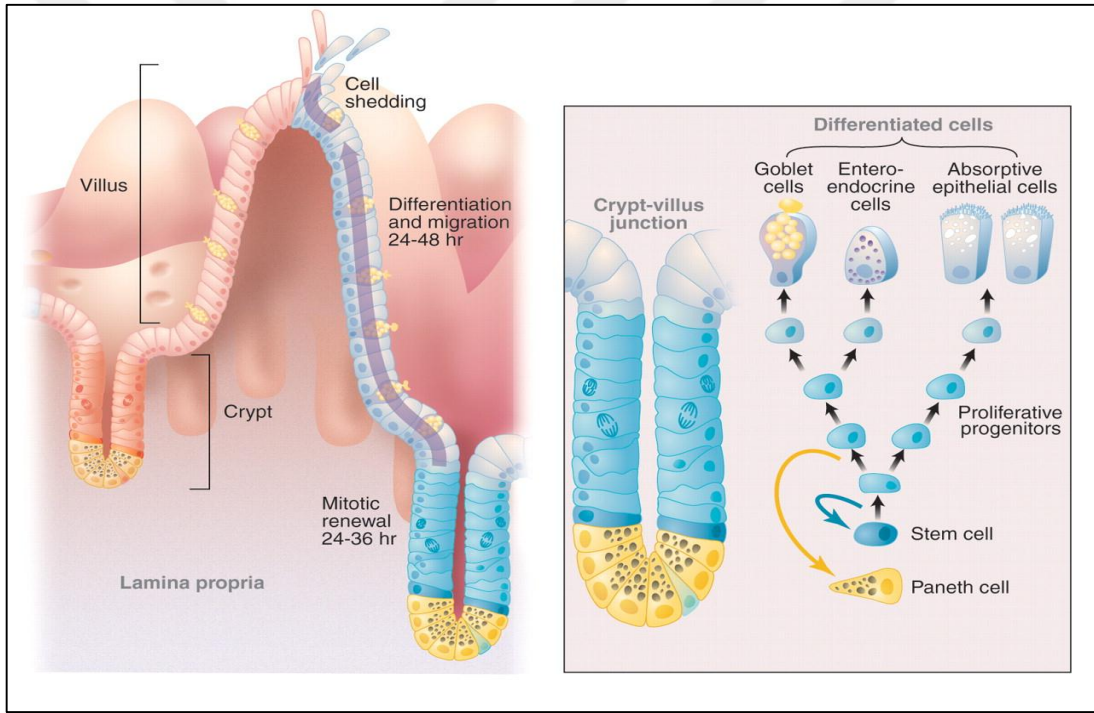
4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnce Bağırsak

İnce bağırsak, sindirim sisteminde son besin sindiriminin, metabolit emiliminin ve endokrin salgılanmanın yapıldığı bölümdür. İnce bağırsak, sindirim kanalının mide ile kalın bağırsak arasında kalan kısmıdır ve yapı olarak duodenum (on iki parmak bağırsağı), jejunum ve ileum olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (3). Duodenum, mideden sonra başlayan, ince bağırsağın ilk ve en kısa bölümü olup mideden gelen ve mide öz suyuna maruz kalmış besinlerin (kimus) pankreastan gelen sindirim enzimleri ve safra kesesinden gelen safra ile bu besinlerdeki yağların, karbonhidratların ve proteinlerin sindirimini gerçekleştirdiği bölümdür (4, 5). Jejunum, ince bağırsağın orta kısmında yer alan bölümdür ve emilimin yapılmaya başlandığı kısımdır. Burada yer alan villuslar sayesinde yüzey alanı maksimum seviyede genişletilmektedir. İleum ise bağırsağın son kısmı olup jejunumda olduğu gibi besinlerin sindirimine ek olarak B12 vitamininin ve safra asidinin emildiği kısımdır (6).

İnce bağırsağın zeminini kaplayan epitel, tek hücre kalınlığında olup, memeli bağırsaklarında patojenlere ve toksinlere karşı bariyer oluşturmaktadır. Buna ek olarak, yaşamak için gerekli olan sindirimi tamamlanmış besin maddelerinin bağırsak lümeninden emiliminden de sorumludur (7). İnce bağırsak epitelinin sütunlu tek tabakalı yapısı, kripte ve villus olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır (Şekil 1). Epiteli oluşturan villuslar, maksimum besin tutulumu ve absorpsiyonu sağlamak için parmak benzeri uzantılı yapılar oluşturup lümen yüzeyini genişleterek, lümeni çevrelemektedir. Villusu oluşturan hücreler, alt mukozada gömülü kripte adı verilen yapılarda lokalize olmuş proliferatif özellikteki kök hücrelerin çoğalıp farklılaşmasıyla sürekli olarak yeniden üretilmektedir (8). Villusu oluşturan hücreler her 3-5 günde bir tamamen yenilenmektedir (9). Kök hücrelerin çoğalıp farklılaşması ile villusu oluşturan üç tip hücre (enterositler, goblet ve enteroendokrin hücreler) ve bunlara ek olarak kripte kalan paneth hücreleri ile birlikte ince bağırsak epitelini oluşturmaktadır. Bu dört tip hücreden, enterositlerin absorpsiyondan, goblet hücrelerinin mukus salgılamasından, enteroendokrin hücrelerinin hormon salgılamasından ve paneth hücrelerinin ise bazı bakterilerin hücre duvarını eriten lizozim enzimini salgılamasından ve antimikrobiyal hormon salgılamasından da sorumlu olduğu bilinmektedir. Lizozim enzimi antibakteriyel özelliğe sahiptir ve bağırsak florasının kontrol edilmesinde rol oynamaktadır. (10). Enterositler, absorpsiyondan sorumlu hücreler olup apikal yüzeyleri mikrovilluslar ile kaplıdır. Mikrovilluslar sayesinde yüzey alanı genişletilerek emilimin ve taşınımın maksimum seviyesinde olması sağlanmaktadır (11). Enterositlerin temel görevleri arasında

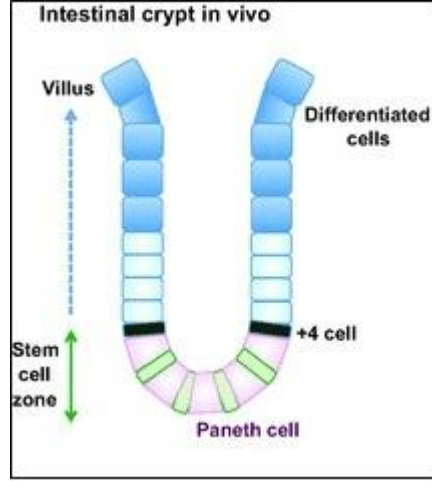
iyonların, suyun, karbohidratların, amino asitlerin, peptitlerin, yağların ve B12 vitamininin Emilimi yanında, bazı immunoglobulinlerin (Ig) salınımı da yer almaktadır. Goblet hücreleri, enterositlerin arasına serpiştirilmiş bir şekilde konumlanmaktadır ve epitel yüzeyinde koruyucu, kaygan bir katman oluşturan mukus salınımından sorumludur. Bağırsak epitelinde bulunan enteroendokrin hücreleri sekretin, tötrensın, kolesistokinin ve nörotensin gibi çeşitli hormonların salınımından sorumludur (12). Enterositler, goblet hücreleri ve enteroendokrin hücreleri villus boyunca göç ederlerken, dördüncü tip farklılaşmış hücre olan Paneth hücreleri kriptin dip kısmında kalmakta ve yaklaşık 6-8 hafta canlılıklarını sürdürmektedir (13). Villus boyunca hareket eden hücreler apoptoz mekanizması ile dengede tutulmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. İnce bağırsak epiteli (Clevers'dan 14)

Kript yapısında yer alan kök hücreler, paneth hücreleri ve öncü hücreler bir düzen içerisinde yerleşmiştir. Test tüpü şeklinde olan kript yapısında, kök hücreler paneth hücreleri arasında bulunmaktadır. Kriptlerin taban kısmını merkez kabul edip yukarıya (kriptten villusa) doğru gidildiğinde 4. pozisyonda bulunan hücreler +4 olarak adlandırılan kök hücrelerdir ve bu hücrelerin aktif olarak bölünme yetenekleri vardır. Bir kriptte tahminen 4-6 kök hücre bulunur ve +4 pozisyonunun üstünde kalan hücreler ise kök hücrelerin aktif bir şekilde bölünmesi ile oluşan, diğer hücrelere farklılaşacak öncü hücreleri oluşturur (15) (Şekil1). Kriptteki +4. pozisyonundaki kök hücrenin hasar görmesi durumunda, kript

tabanındaki bölünme yeteneğine sahip ancak sessiz fazda bulunan kök hücrelerden biri bölünerek +4 pozisyonuna gönderilir (16).

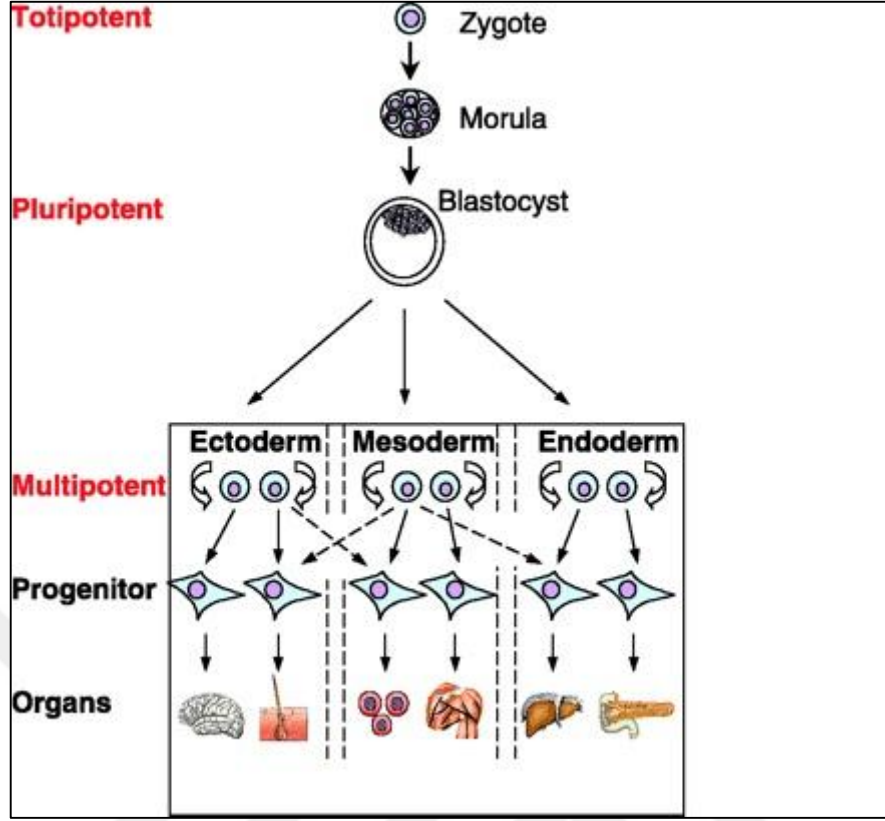


Şekil 2. İnce bağırsak kript yapısı (Sasai'den 16)

4.2. Kök Hücre Kavramı

Kök hücreler, kendilerini yenileyebilme özelliğinde olan, bölündüğünde farklılaşabilen hücreler oluşturan ve klon oluşturma yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanmaktadır (17). Kök hücreler bölündüklerinde, kendileri gibi kök hücre ve yenilenecek dokunun gereksinimi olan, farklılaşma yönünde ilerleyecek hücrelere dönüşürler (18). Kök hücrelerin hayat döngüsü, sperm hücresinin yumurta hücresini döllemesinden başlayarak yaşamın sonuna kadar devam etmektedir (19).

Kök hücreler, temelde totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Totipotent kök hücreler, erken embriyonik dönemdeki 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler olup, teorikte bu hücrelerin her biri yeni bir canlı oluşturma yeteneğindedir. Pluripotent kök hücreler, organizmada birçok dokunun oluşmasını sağlayan kök hücrelerdir. Blastositin iç hücre kitlesindeki hücreler bu özelliktedir ve endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine farklılaşabilmektedir. Multipotent kök hücreler ise yer aldıkları dokunun hücrelerini oluşturmaktadır. Yetişkin kök hücreler bu grupta yer almaktadır (Şekil 3) (20-23).



Şekil 3. Kök hücre çeşitleri (Wobus'tan 23)

4.2.1. Yetişkin Kök Hücreleri

Yetişkin kök hücreleri, erken embriyonik gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler olarak tanımlanmaktadır. Totipotent ve pluripotent embriyonik kök hücreler dışında kalan tüm kök hücreler bu gruba girmektedir. Bu kök hücreler organizmada çoğalan hücrelerin öncüleri olup hasarlanan dokuların yenilenmesinde görev almaktadır. Somatik kök hücreler olarak da adlandırılan bu hücreler bazen dokuya özgü kök hücreler olarak da adlandırılmaktadır (18).

Günümüzde en çok üzerinde durulan yetişkin kök hücre tipleri, hematopoietik, mezenkimal, nöral ve bağırsak kök hücreleridir. Bunların dışında farklı organlarda da kök hücrelerden bahsetmek mümkündür. Yetişkin kök hücrelerin hemen hemen hiçbiri doğrudan farklılaşmış hücrelere dönüşmemekte, buldukları organda önce öncü hücrelere dönüşmekte ve çoğalmanın sonunda tamamen farklılaşmış hücreleri oluşturmaktadır (18).

4.2.1.1. İnce Bağırsak Kök Hücreleri

İnce bağırsak kök hücreleri, organ biyolojisi ve kök hücre çalışmalarında en çok çalışılan model sistemlerden biri haline gelmiştir (24). Bu özelliği, memelilerde kendini en hızlı yenileyen dokulardan biri olmasından kaynaklanmaktadır (25). Vücut için gerekli besin alınımını sürekli ve sağlıklı bir şekilde sağlamak üzere bütün bağırsak epiteli her 3-5 günde bir tamamen yenilenmektedir. Bu yenilenme işlemi kript tabanındaki kök hücrelerinin kript-villus eksenini boyunca çoğalıp farklılaşması ve villus boyunca göç etmesi ile sağlanmaktadır. Tek bir ince bağırsak kök hücrelerinin, kendini yenileyebilme, kript-villus yapısındaki enterosit, enteroendokrin, goblet ve paneth hücresi gibi farklı hücre tiplerini oluşturabilme ve klon (klonalite) oluşturabilme olmak üzere, üç önemli özelliği vardır (18).

İnce bağırsak kök hücrelerinin kript yapısındaki lokalizasyonları hakkında çeşitli fikirler ortaya atılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda kript tabanı orjin olarak alındığında yukarıya doğru sayılan 4. hücrenin kök hücre olduğu düşünülmekteydi (26, 27). Bunun yanında, kök hücrelerin, kript tabanında iki paneth hücrelerinin arasında lokalize olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (28). Bugün kabul edilen model ise ince bağırsak kript tabanında iki ayrı kök hücre popülasyonu olduğu, hücrelerin çoğalması ve kriptin devamlılığını sağlayan mekanizmalardan sorumlu aktif olan kök hücrelerin, +4 pozisyonundaki kök hücreler olduğu, yaralanma ve hasar sonucu yeni bir aktif kök hücre oluşumundan ve kript onarımından sorumlu olanların ise daha pasif olan kript tabanında lokalize olmuş kök hücreler olduğu yönündedir (29, 30). Kök hücrelerden + 4 pozisyonundaki hücrelerin, kript ve villuslardaki tüm hücre türlerini oluşturabildikleri gösterilmiştir (31).

Kriptte yer alan kök hücreleri tespit etmek için çeşitli işaretleme yöntemleri kullanılmıştır. Varsayılan kök hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan ilk yöntem radyoaktif işaretli timidin izleme çalışmalarıdır (32). Bu gibi işaretleme yöntemleri çeşitli RNA bağlayıcı proteinlerin (MSI1, WIP1 vb.) markır olabileceğine yönelik sonuçlar ortaya koymuştur (31, 33). Ancak, yapılan ilave çalışmalar ile bunların ince bağırsak kök hücreleri için spesifik ve kullanışlı birer markır olmayacağı gösterilmiştir (34).

Hans Clevers ve ark. 2007 yılında, kriptin tabanında bulunan kök hücreler tarafından eksprese edilen ve Wnt yolağında bir hedef gen olan Lgr5 (Lösin-zengin-tekrar-içeren G-protein bağlı reseptör 5) isimli bir marker gen tanımlamışlardır (9). Bu Lgr5 pozitif (Lgr5⁺) hücreler, ince bağırsak epitelini oluşturan 4 farklı hücreye de dönüşebilmektedir. Kript tabanında bulunan Lgr5⁺ kök hücreleri kendini yenileyebilme ve pluripotent özellikleri ile bağırsak kök hücreleri için iyi bir markır özelliği taşımaktadır (9). Kriptte bulunan bu Lgr5⁺ kök hücreleri zarar gördüklerinde ve fonksiyonlarını yerine getiremeyip elimine olduklarında, 4. pozisyonun altında kalan yavaş döngülü kök hücreler tekrar etkin bir biçimde Lgr5⁺ hücre grubunu oluşturmaktadır (35).

Günümüzde, fare ve insan modellerinde bu kök hücreleri belirlemek için çok çeşitli markırlar veya bu markırların kombinasyonları (Lgr5, CD133, CD44, CD24 ve Bmi1) kullanılmaktadır (9, 36, 37). Bu markırlardan CD44'ün ince bağırsak kök hücreleri için önemli bir markır olduğu gösterilmiştir. CD44 ekspresyonunun Wnt sinyal yolağını aktive ettiğine yönelik çalışmalar da mevcuttur (36, 38). Diğer bir markır CD24 ise paneth hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. CD24 ekspresyonu olan paneth hücrelerinin kök hücrelerle doğrudan temasta olduğu çeşitli yöntemler ile gösterilmiştir (39). CD24 eksprese eden paneth hücreleri kök hücreler için mikroçevreyi oluşturmaktadır (39).

İnce bağırsak kök hücrelerinin Wnt, Notch ve BMP (Kemik morfogenetik proteini) gibi birçok hücre sinyal yolağı tarafından düzenlendiği bilinmektedir (40, 41). Ayrıca, kök hücreler çevreden gelen sinyaller tarafından da uyarılarak fonksiyonlarını yerine getirmek için düzenlenmektedir (42).

4.2.2. Kök Hücre Mikroçevresi

Kök hücreler, fonksiyonlarını devam ettirebilmek için düzenleyici proteinlerin varlığına ve içsel düzenleyici sinyallere ek olarak, çevredeki hücrelerden gelen dışsal düzenleyici sinyallere de ihtiyaç duymaktadırlar. Kök hücrelerin içinde bulunduğu bu özel histolojik ortam kök hücre mikroçevresi (kök hücre nişi) olarak adlandırılmaktadır (43). Bir kök hücre mikroçevresinin, kök hücreye kazandırdığı içsel ve dışsal kontrol mekanizmaların kombinasyonu kök hücre popülasyonunun varlığını devam etmesini sağlamaktadır (44).

Birçok dokuda bulunan yetişkin kök hücreler, farklılaşmamış ve uzun ömürlü hücrelerdir. Bu hücrelerin hem korunması hem de fonksiyonlarını yerine getirmesinde mikroçevre önemli bir role sahiptir. Nişte yer alan hücrelerin, kök hücrelerin yerleşimini arttırdığı, etkinlik kazanmalarını desteklediği ya da farklılaşmamış halde kalabilmelerini

sağladığı, kısacası kök hücre işlevlerinin uzun süreli korunması için gerekli olduğu bilinmektedir (18).

Yapılan ilk çalışmalarda bağırsağı çevreleyen mezenkimal hücrelerin bağırsak kök hücrelerinin nişi olduğu öne sürülmüştür. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin bağırsak kök hücreleri için tek başlarına niş fonksiyonu sağladıklarına ilişkin bir bulgu saptanamamıştır (18, 45). Kript tabanında lokalize olmuş paneth hücreleri, antimikrobiyal moleküller salgılayan, bağırsak mukozasının savunmasından sorumlu hücreler olarak bilinmektedir. Bu özelliklerinin yanında, paneth hücrelerinin çevreledikleri bağırsak kök hücrelerinin, korunmasında da görev aldıkları bilinmektedir (46). 2011 yılında yapılan *in vitro* çalışmalarda kript tabanındaki bağırsak kök hücrelerini çevreleyen paneth hücrelerinin bağırsak kök hücrelerinin nişi olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada, ince bağırsak kök hücreleri ve paneth hücreleri ayrı ayrı toplanıp, birleştirilerek yapılan kültür ile sadece kök hücreler kullanılarak yapılan kültür karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, kök hücreler ve paneth hücrelerinin birlikte oluşturduğu organoidlerin sadece kök hücrelerden oluşan organoidlerden anlamlı bir şekilde fazla olduğu ve organoidlerin gelişiminin daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Organoidlerin oluşumunun anlamlı bir şekilde arttığı ve gelişimlerinin hızlandığı gösterilmiştir. Paneth hücreleri, kök hücreler için temel niş sinyallerini salgılayarak, kök hücrelerin fonksiyonlarını artırmakta ve kök hücrelerin kendini yenilemesini kolaylaştırmaktadır (39).

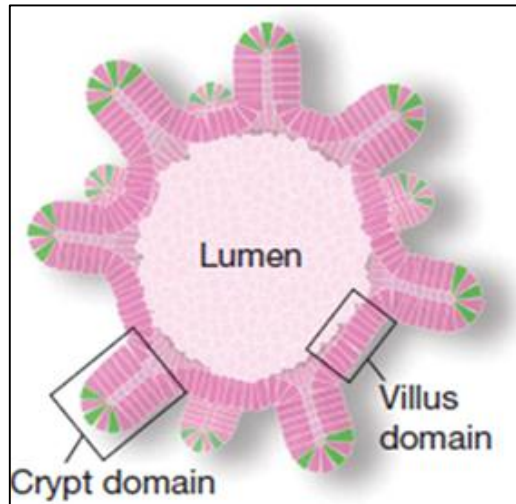
4.3. Üç Boyutlu Kültür Sistemi

Bir yumurta hücresinin sperm tarafından döllenişmesi ile başlayan doku ve organ gelişimi, ileri derecede kompleks olmasına rağmen çok iyi organize edilmiş bir süreçtir. Hayvan modelleri ve hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda organogenez süreci hakkında yadsınamaz bilgiler elde edilmiştir (47, 48). Bu yöntemlerden en fazla kullanılanı 2-boyutlu kültür sistemleridir. Bu yöntemle temel hücre biyolojisi için çok önemli bilgiler sağlanmıştır. Ancak, fizyolojik parametrelerdeki değişiklikler, doku veya organın mimarisi, hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimleri, biyokimyasal etkileşimler ve sinyal yollarındaki yetersizlikten dolayı 2-boyutlu sistemler sınırlı kalmaktadır (49, 50). Bu sebepten 3-boyutlu kültürlerin kullanılması ve geliştirilmesi zorunluluğu ortaya çıkmıştır (51).

Yaklaşık 30 yıl önce araştırmacılar, *in vitro* ortamda, epitel hücrelerin ve farklı kökenli hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için 3-boyutlu ortamı sağlayacak, hücre dışı matriks oluşturacak kollajen jeller ile çalışmaya başlamışlardır. Bu jeller ile 3-boyutlu sferoid (küresel) formlar oluşturulmuş ve 3-boyutlu kültür sistemleri geliştirilmiştir (52).

4.4. Organoid Kavramı

2009 yılında Sato ve arkadaşları tarafından 3-boyutlu bir kültür sistemi olan organoid kültürleri oluşturulmuştur (53). Yetişkin kök hücreler 3-boyutlu bir matriks içerisine ekilmiş ve organ orjinini oluşturan yapının oluşmasına imkan sağlanmıştır (54, 55). Tek bir kök hücreyi stimüle edecek gerekli şartlar sağlanarak hedef organdan köken alan, stroma oluşturabilen minyatür yapıya organoid adı verilmektedir (Şekil.4). 3-boyutlu kültürde oluşturulan organoidlerin, organın normal ortamındaki mimarisine aynı özelliklere ve aynı onarım mekanizmalarına sahip olduğu görülmüştür. Günümüze kadar laboratuvar ortamında bağırsak, kolon, mide, pankreas, prostat ve karaciğer gibi dokularda bulunan kök hücrelerden hem fare hem de insan organoidleri oluşturulmuştur (37, 53, 54, 56-59). Normal organoidlere ilaveten çeşitli kanser dokularından da (ince bağırsak, kolon, pankreas, mesane ve prostat) organoid kültür sistemleri kurulabilmiştir (2, 54, 57, 60-62). Kanser organoidlerinin oluşturulabilmesi ile, kanser biyolojisinin anlaşılabilmesi ve *in vitro* da test edilen ilaçların *in vivo*'da oluşturacağı etkinin tahmin edebilmesi mümkün olacaktır. Böylece kanser organoid kültür sistemi ile klinik öncesi kullanışlı ve güvenilir tümör modellerinin oluşturulması sağlanmıştır (63). Organoidin oluşumuna katılan kök hücrelerin gereksinimleri *in vitro* da karşılanarak bu sistem uzun süre kültür edilebilmektedir (55).



Şekil 4. İnce bağırsak organoidinin şematize şekli (Sato'dan 53)

4.5. Organoid Kültürü

Model sistem ve organizmalar, bilimsel çalışmalarda hücre ve organ biyolojisi, sinyal yolları, canlılık, apoptoz, kanser biyolojisi ve tedaviye yönelik ilaç çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu model sistemlerden en yaygın ve temel olarak kullanılan 2-boyutlu yani tek tabakalı olarak büyütülen hücre kültürleridir (63). Hücre hatları, adenovirüslerden

elde edilen ve ölümsüzlüğe neden olan genler kullanılarak, bazı genlerin overeksprese ettirilmesi ile sonsuz telomeraz aktivitesi kazandırılarak ya da kendiliğinden ölümsüzlük geliştirilen hücreler (kanser hücre hatları) ile oluşturulmaktadır (64, 65). Çeşitli yöntemler kullanılarak oluşturulmuş hücre hatları, oluşturuldukları primer hücreden farklı birçok özellik taşımaktadır. Dolayısıyla hücre kökenli bu sistemler, hedef dokuyu doğru bir şekilde yansıtamamaktadır (66). Hücre kökenli bu sistemlerde canlılık, apoptoz gibi yollar ile ilgili çalışmalar ya da tedaviye yönelik ilaç araştırmaları sınırlı kalmakta ve primer hücrelerin oluşturduğu cevabı doğru olarak yansıtamamaktadır (67). Primer hücreler oluşturuldukları doku veya organ için en kullanışlı ve uygun modellerdir. Ancak, izole edilen hücrelerin *ex vivo* ortamda yaşama süreleri oldukça kısıtlıdır (66).

Özellikle anti-kanser veya diğer hastalıklar için ilaç denemelerinde kullanışlı ve yeterince etkili bir model sistem bulunmamaktadır. Son on yılda potansiyel anti kanser ajanlarının büyük bir hızla artmasına karşın bu ilaçların ancak %10'luk kısmı klinikte başarılı olmuştur (68, 69). İlaçların tedavi edici olamaması ve ilaç geliştirme çalışmalarının klinik düzeyde etkisinin düşük olması, beklenmeyen toksisite göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Bu da çalışılan ilaçların klinik öncesi, uygun bir model sistemde test edilememesinden kaynaklanmaktadır (70). İlaç geliştirme çalışmalarında, ilacın hedefi olan dokuya yönelik çalışmalarda 2 boyutlu hücre kültürleri sıkça kullanılan model sistemlerdir (71). Ancak aday ilacın test edilmesi için bu 2-boyutlu kültürler tek başlarına yeterli olamamaktadır. Dolayısıyla bu durumun ilave bir metot ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu gereklilik hücre kültüründeki hücre-hücre ve hücre-ekstrasellular matriks ilişkisinin sınırlı olması veya yoksunluğundan kaynaklanmaktadır (72). Bunun aksine 3-boyutlu kültürlerde, aynı dokuyu oluşturan farklı hücreler bir arada bulunmakta ve hücre-hücre, hücre-ekstrasellular matriks ilişkisi iyi bir şekilde sağlanmaktadır (73). Yapılan çalışmalarda 3-boyutlu kültürlerin ilaç etkinliği ve toksikoloji çalışmalarında 2-boyutlu kültürlerle göre daha anlamlı sonuçlar ortaya koyduğu gösterilmiştir. Bu da yapılan yeni ilaç çalışmaları, ilaç kombinasyon geliştirme çalışmaları ve diğer çalışmalar için hedef dokuyu taklit etmede en etkili yöntemin 3-boyutlu kültürler olduğunu göstermektedir (74).

Dünyanın birçok bölgesinde, kanser yüksek ölüm oranı ile hala temel bir sağlık problemidir (75). Kanser biyolojisinin anlaşılabilmesi ve ilaç deneme çalışmaları için farklı tümör modelleri oluşturulmuştur (2). Kanser çalışmalarında fare kanser modelleri en yaygın olarak kullanılan stratejidir (76). Diğer bir yaklaşım ise kanser hücre hatları ve hastadan elde edilmiş tümör ksenograflarıdır (PDTX). Bu iki modelin yanında yeni ve gelişmekte olan üçüncü bir kanser modeli de "primer tümör organoid sistemi"dir (2). Bu üç kanser modeli

bazı özellikleri bakımından Tablo 1’de birbirleri ile mukayese edilmiştir. Kanser hücre hatlarının tek tip hücreden oluşması, genotipik değişikliklere sahip olması ve primer kanser hücrelerini bire bir yansıtamaması gibi bazı dezavantajları mevcuttur. Bunun yanında, fare kanser modellerinin maliyetli olması, çalışma sonunda farelerin öldürülmesi, tümör-konakçı ilişkisinin her zaman sağlanamaması ve etik problemlere yol açması gibi bazı temel dezavantajlara sahiptir. Primer tümör organoid sistemi ise cerrahi olarak tümör dokusundan biyopsi alınması ile hayvanlardan ve insanlardan kolaylıkla oluşturulabilmektedir (57). Ayrıca, hastalardan oluşturulan tümör organoidleri bire bir hastadaki tümörü yansıtmakta ve aynı genetik altyapıyı taşımaktadır. Bu da yeni ilaç tasarımlarında ya da kişiye özgü ilaç geliştirilmesinde avantajlar sağlamaktadır.

Tablo 1. Hücre hattı, ksenograflar ve organoidlerin birbirleri ile mukayesesi. (+++): çok iyi, (++): kullanılabilir, (+): mümkün, (-):kullanışlı değil (Sachs’dan 2)

Özellik	Hücre Hatları	Ksenograflar	Organoidler
Çalışma kolaylığı	+++	-	+
Başlatma başarı oranı	+	++	+++
Gelişim	+++	+	+++
Biyolojik stabilite	+	++	++
Kanserin taklidi	+	++	++
Genetik manipülasyon	+++	-	++
Normal kontrol	-	-	++
3-boyutlu gelişim	+/-	+++	++

4.6. İnce Bağırsak Organoidi

İnce bağırsak kriptlerindeki hücre popülasyonu için *in vitro* olarak dokunun normal ortamında bulunan mikroçevresinin taklit edilmesiyle ve minimum ihtiyaçlarının karşılanmasıyla ince bağırsağı oluşturan kript-villus yapısı kültür ortamında oluşturulabilmektedir. Oluşan bu yapı ince bağırsak organoidi olarak adlandırılmaktadır (53). Bu organoidler, ince bağırsağın doğal fizyolojik ortamında bulunan haline hem morfolojik hem de yapısal olarak çok benzerdir (77). Kriptleri oluşturan hücreler, normal

doku ortamında alt mukozaya gömülü halde laminler gibi ara filamentler tarafından çevrelenerek doku mimarisini oluşturmakta ve canlılıklarını sürdürmektedir. Kriptlerden izole edilen hücreler doku ortamını oluşturacak ekstraselüler matriks ile desteklenmez ise anoikis olarak adlandırılan apoptoz benzeri bir mekanizma ile hücre ölümü gerçekleşir (53). Kript biyolojisinin temelini oluşturan Wnt sinyallerini *in vitro* ortamda sağlayabilmek için Wnt agonisti R-spondin, organoid sisteminde kript sayısını artırmak amacıyla BMP sinyallerini baskılayan Noggin ve mitojen olarak da EGF kullanılmaktadır. Bazal membranı oluşturmak için ise özel bir jele ihtiyaç vardır. Kültür ortamında bazal laminayı taklit etmek ve 3- boyutlu ortamı sağlamak amacıyla laminlerce ve kollajenlerce zengin matrijel kullanılmaktadır. Bu şekilde hücreler matrijelli ortamda büyümeyi seçerek hücre ölümünden kurtulurlar (78-81). Matrijel, Engelberth-Holm-Swarm farelerinin sarkomlarından elde edilen lamin, kollajen 4 heperan sülfat proteoglikan ve entaktin/nidojen gibi ekstraselluler matriks proteinleri açısından zengin bir matrikstir (78, 82). Hücre dışı matriks proteinlerinin yanında, TGF-beta, epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve doku plasminojen aktivatörleri gibi çok çeşitli büyüme faktörlerini de içermektedir (81, 83). Matrijel normal ve transforme epitel ve diğer hücre tipleri için etkili bir tutunma ve farklılaşma ortamı oluşturarak 3-boyutlu kültür ortamı sağlamaktadır.

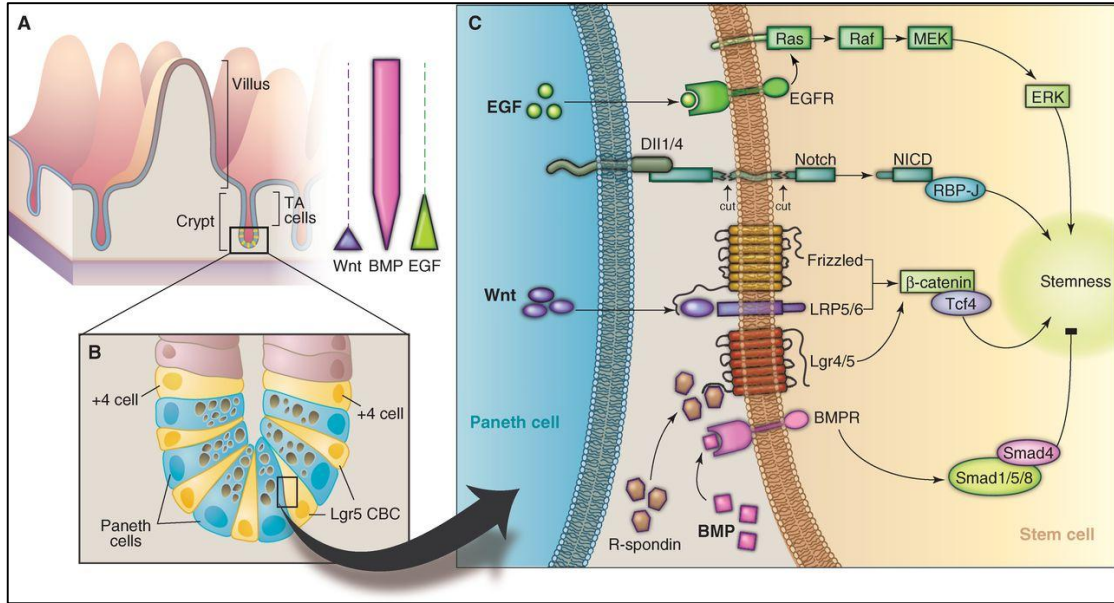
4.7. İnce Bağırsak Organoid Oluşumunun Moleküler Mekanizması

İnce bağırsak homeostazisi Wnt, Notch, EGF ve BMP olmak üzere iyi tanımlanmış dört yolak tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Şekil 5) (84). Bu yollar *in vitro*'da indüklendiğinde kültür ortamında ince bağırsak organoidleri oluşturulabilmektedir (85).

Wnt yolağı, ince bağırsakta bulunan kök hücrelerin hem proliferasyonundan hem de farklılaşmasından sorumludur. İnce bağırsak kök hücre kaderinin belirlenmesinde ve çoğalmanın yönlendirilmesinde hayati önem taşımaktadır (86). Wnt yolağı ince bağırsak kript tabanında kök hücreler ile temas halinde bulunan farklılaşmış paneth hücrelerinin de oluşmasını sağlamaktadır (87). Wnt yolağına gelen sinyaller Frizzled-Lrp5/6 koreseptörleri ile etkileştiğinde β -katenin stabilize olmaktadır. β -katenin de çeşitli proteinleri uyararak bir transkripsiyon faktörü olan Tcf4'ün aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu aktivasyon kök hücrelerin çoğalma potansiyelini artırmaktadır (Şekil 5A-C).

Kök hücrelerde bulunan Lgr5 reseptörü, Wnt agonisti olan R-spondin tarafından uyarılmaktadır. Yani kültür ortamına eklenen R-spondin proteini Wnt sinyallerinin güçlü bir

arttırıcısı olarak rol oynamaktadır. Böylece R-spondin tarafından Wnt bağımlı ince bağırsak kök hücrelerinin çoğalması güçlü bir şekilde indüklenmektedir (88).



Şekil 5. Bağırsak kript villus yapısı ve sinyal yolları. A) Kriptin histolojik konumu, B) Kök hücrelerin ve paneth hücrelerinin lokalizasyonu, C) Kök hücre ve paneth hücrelerinin biyolojik etkileşimleri (Clevers'dan 84).

Notch sinyal yolağı, kök hücre devamlılığının sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (89). Notch sinyal yolağı kök hücrelerin kendini yenileme ve yeni kök hücre oluşturma sürecini kontrol eden bir yoldur. Bölünmekte olan kök hücrelerde ve öncül hücrelerde bloke edildiğinde ise hücreler salgı hücrelerine farklılaşmaktadır (90). Paneth hücreleri salgı yapabilen ve kök hücrelere niş sağlayan hücrelerdir. Paneth hücreleri Notch yolağını uyaran sinyaller salgılayarak, komşu kök hücreleri uyarmakta ve kök hücrelerin bölünmesi ile oluşan öncül hücrelerin enterositlere farklılaşmasını sağlamaktadır (91). Kök hücrelerden oluşan öncü hücreler kript boyunca ilerlediklerinde paneth hücrelerinden uzaklaşırlar. Bu hücrelerden bazıları Notch sinyallerini down regule edip kendi kaderlerini belirleyerek, salgı yapabilen hücrelere farklılaşırlar. Paneth hücreleri ile iletişimi kopmayan öncü hücreler ise Notch sinyalleri aktif olduğu için enterositlere farklılaşırlar (92). Özetle Notch sinyalleri öncü hücrelerin enterosit ya da salgı hücrelerine farklılaşmasını kontrol eder.

EGF, kök hücreler ve kök hücrelerden çoğalan öncü (progenitör) hücreler üzerinde oldukça güçlü bir mitoz indükleyici etkisine sahiptir. EGF, Ras/Raf/Mek/Erk sinyal yolağının ligandı olup bu yolak, hücre çoğalması ve farklılaşma gibi birçok biyolojik süreçte

etkilidir. Bu yolak kript epitelinde oldukça aktif olup kript sayısının artmasını sağlamaktadır (93) (Şekil 5C).

Son olarak BMP villus oluşumunda oldukça aktiftir. BMP sinyal yolağı aktif olduğunda, uyarılan reseptör Smad1/5/8 ve Smad4'ün kompleks oluşturmasını sağlar. Oluşan bu transkripsiyon faktör kök hücrelere negatif yönde etki ederek, kök hücrelerin çoğalmasını baskılamakta ve bu şekilde çoğalmanın dengede tutulmasını sağlamaktadır (Şekil 5C). BMP sinyalleri Nogin tarafından inhibe edildiğinde, kript yapıları villusların kenarları boyunca artış göstermektedir. Yani baskılanan BMP sinyalleri kök hücrelerin çoğalarak yeni kriptler oluşturmasını indüklemektedir. Bu şekilde, kültür ortamına Noggin ilavesi ile kriptlerin sayısının artması sağlanmaktadır (94).

Kültür ortamına ilave edilen çeşitli proteinler ile bahsedilen sinyal yolları baskılanarak ya da indüklenerek ve gerekli suplementler eklenerek ince bağırsak organoidlerinin *in vitro* da oluşturulması sağlanmaktadır (85).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Çalışmada Kullanılan Farelerin Temini

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan deney hayvanları Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Deneylerimizde cinsiyetin önemli olmadığı yaklaşık 1 ile 2 aylık fareler kullanıldı. Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan 18.11.2014 tarihin ve 2014/52 protokol numaralı izin doğrultusunda, fiziksel ötanazi yöntemlerinden olan servikal dislokasyon uygulanarak farelerden ince bağırsak dokusu alındı.

5.1.2. Kimyasallar

EDTA disodyum dihidrat ($\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	AppliChem, A29370500
Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$)	Merck, 1.01547.0.100
Kalsiyum klorür (CaCl_2)	Merck, 910TA654681
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 106462
Etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Mey, Türkiye
1-Butanol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)	Merck, 1.009.882500
Ksilen, ekstra püre (C_8H_{10})	Merck, 1.086.612500
Eozin Y ($\text{C}_{20}\text{H}_6\text{Br}_4\text{Na}_2\text{O}_5$)	Merck, 1.159.350100
Dimetil Sülfoksit ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$)	Sigma, D8418-100
HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)	Sigma, H3375-25
Formaldehit ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$)	Sigma, P6148
Mayers hematoksilen solusyonu	Sigma, MHS1-100
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.064.041000
Potasyum klorür (KCl)	Merck, 1.049.361000
Disodyum hidrojen potasyum ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Reidel-deHaen, 4272
Potasyum fosfat (KH_2PO_4)	Sigma, P9791
Magnezyum klorür ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, 1.058.331000
Kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, 1.023.821000
Trisodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, 1.064.480500
Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma, 27102
Sodyum fosfat tribazik ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	Sigma, 04277

Sodyum azid (NaN_3)

Sigma, S2002

5.1.3. Doku Kültürü Malzemeleri

Matrijel Membran Matriksi

Corning, 356231

Rekombinant Fare Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Gibco, PMG8041

B-27® Supplement

Gibco, 17504044

N-2 Supplement

Gibco, 17502048

Advanced DMEM/F-12

Gibco, 12634010

Penisilin-Streptomisin (10,000 U/mL)

Gibco, 15140122

TrypLE™ Express Enzim (1X)

Gibco, 12605010

Dulbecco Fosfat tamponu

Gibco, 14190094

Rekombinant Fare R-Spondin-1

R&DSystem, 3474-RS-050

Rekombinant Fare Nogin

Peprotech, 250-38

Glutamin 200mM

Lonza, BE17-605E

N-Asetil-L-sistein ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$)

Sigma, A9165-5

Sığır Serum Albumin (BSA)

Amresco, 0332-25

Sığır Fetal Serum (FBS)

Capricorn, FBS-11B

5.1.4. Hücre ve Hücre Yüzey Antikorları

Propidyum İyodid Boyama Solusyonu

BDbiosci 5166211E

Anti-fare CD24 Antikoru

Biologend, 101803

Maymun anti-fare IgG Sekonder Antikor

ThermoScie. A31571

Alexa Flour 488, Eşek Anti-sıçan IgG

Lifetech, A21208

Tavşan anti-insan Lizozim Poliklonal Antikor

RayBio, 119-17210

Keçi anti tavşan IgG

SantaCruz, sc2030

5.1.5. Cihazlar

Soğutmalı yüksek devirli santrifüj

Eppendorf 5804, Almanya

Yüksek devirli santrifüj

Eppendorf 5810, Almanya

Class II steril kabin

MetiSafe, Türkiye

CO₂ Etüv

Heraeus, Almanya

Vorteks

IKA, Çin

Karıştırıcı

Stuart, İngiltere

Su banyosu

Stuart, İngiltere

İnvert mikroskop

Nikon, Japonya

Otomatik pipet seti

Rainin, ABD

Pipetaid	Isolab, Almanya
Hassas terazi	Ohaus, ABD
pH metre	Hanna, Portekiz
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Buz makinesi	Hoshizaki, Japonya
Distile su cihazı	GFL 2004, Almanya
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-86 °C)	Thermo, ABD
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Etüv	Memmert, Almanya
Termomikser (ısıtıcı blok)	Eppendorf, Almanya
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Akım sitometrisi	BD Bioscience, ABD
Mikroskop	Olympus BX51, Japonya
Mikroskop kamerası	Olympus DP71, Japonya
Mikrotom	Leica RM2255

5.1.6. Sarf Malzemeleri

Çeşitli boyutlarda pipet uçları	Axygene, ABD
Mikrosantrifüj tüpler	Axygene, ABD
Falkon Tüpler (15 ve 50 ml)	Greiner Bio-One, Almanya
24 kuyucuklu pleyt	Corning, ABD
Serolojik pipetler	Greiner Bio-One, Almanya
70 µm filitre	BD Falcon, ABD
Parafin Kasetleri	Isolab, Almanya
Metal parafin blok	Isolab, Almanya

5.1.7. Solüsyonlar

1. N-Asetil-L-sistein Çözeltisi

Hazırlanışı:

0.81595 g N-Asetil-L-sistein ($C_5H_9NO_3S$)

5 ml deiyonize su içinde çözüldükten sonra son hacim deiyonize su ile 10 ml'ye tamamlandı. 0.2 μ m enjektör filtresinden geçirilerek steril edildi. 50 μ l olacak şekilde ependorf tüplere alikotlandı.

2. 1 M 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit (HEPES) (pH 7.5)

Hazırlanışı:

1.1915 g HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$)

5 ml deiyonize su içinde çözüldü, toz NaOH ile pH 7.5'e ayarlandıktan sonra son hacim deiyonize su ile 15 ml'e tamamlandı. 0.2 μ m enjektör filtresinden geçirilerek steril edildi ve $-20^\circ C$ 'de saklandı.

3. 1X Fosfat tamponu (Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen) (pH 7.4)

Hazırlanışı:

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na_2HPO_4

0.24 g KH_2PO_4

800 ml deiyonize su içinde çözüldü, 1 N HCl ile pH 7.4'e ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi ve $4^\circ C$ 'de saklandı.

4. 1X Fosfat tamponu (Ca⁺² ve Mg⁺² içeren) (pH 7.4)

Hazırlanışı:

0.033 g	CaCl ₂
0.01 g	MgCl ₂
0.2 g	KCl
0.2 g	KH ₂ PO ₄
8 g	NaCl
1.45 g	Na ₂ HPO ₄

800 ml deiyonize su içinde çözüldü, 1 N HCl ile pH 7.4'e ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavlanarak steril edildi ve 4°C' de saklandı.

5. 0.5 M Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) (pH 8.0)

Hazırlanışı:

1.8612 g	Na ₂ EDTA.2H ₂ O
----------	--

50 ml deiyonize su içinde çözüldü, toz NaOH ile pH 8.0'a ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm enjektör filtresinden geçirilerek steril edildi ve 4°C' de saklandı.

6. 2.5 mM EDTA/PBS çözeltisi

Hazırlanan 0.5 M EDTA çözeltisinden 125 µl alınarak PBS ile son hacim 25 ml'ye tamamlandı.

7. %1 Sığır serum albümin çözeltisi

Hazırlanışı:

0.1 g	Sığır Serum Albumin
-------	---------------------

10 ml deiyonize su içinde çözüldü. 0.2 µm enjektör filtresinden geçirilerek steril edildi. 4°C' de saklandı.

8. Rekombinant (fare) Noggin

Hazırlanışı:

20 µg Noggin 400 µl %0.1'lik BSA çözeltisinde çözüldü. 20 µl olacak şekilde ependorf tüplere alıktlandı.

9. Rekombinant (fare) R-Spondin-1

Hazırlanışı:

50 µg R-spondin-1 1 ml %0.1'lik BSA çözeltisinde çözüldü. 100 µl olacak şekilde ependorf tüplere alıktlandı.

10. %4 Paraformaldehid (PFA) Çözeltisi

Hazırlanışı:

0.4 g PFA

10 ml Mg⁺² ve Ca⁺² içeren PBS içinde çözüldü. 0.2 µm enjektör filtresinden geçirilerek steril edildi. Her defasında taze olarak hazırlandı.

11. %1 Eozin Y Çözeltisi

Hazırlanışı:

0.1 g Eozin Y

10 ml deiyonize su içinde çözüldü.

12. Bloklama Çözeltisi

Hazırlanışı:

8.22 g Sitrik asid

21.52 g Di-sodyumhidrojen fosfat

2 g Sodyum azid

1000 ml deiyonize su içinde çözüldü. 0.2 µm membran filtresinden geçirilerek steril edildi.

Bloklama çalışma solüsyonu hazırlanışı:

190 µl bloklama solüsyonuna her kullanımdan önce 10 µl H₂O₂ eklenir.

13. Fiksasyon solüsyonu

Hazırlanışı:

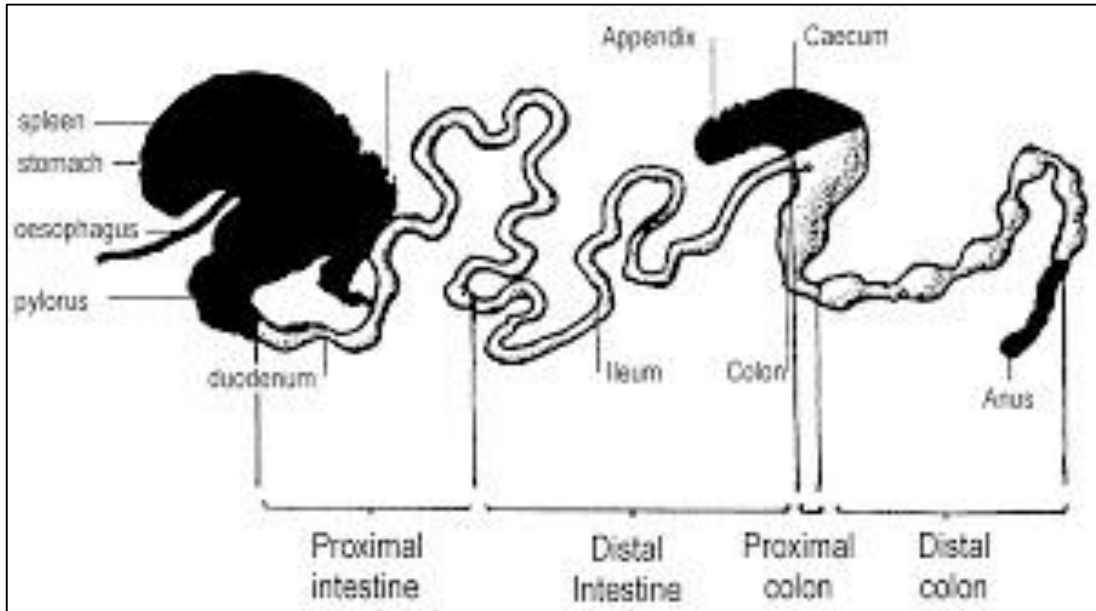
5.88 g Trisodyum sitrat dihidrat

1800 ml deiyonize suda çözüldü. 5 N HCl ile pH 6.0'a ayarlanarak son hacim deiyonize su ile 2000 ml'ye tamamlandı.

5.2. Yöntem

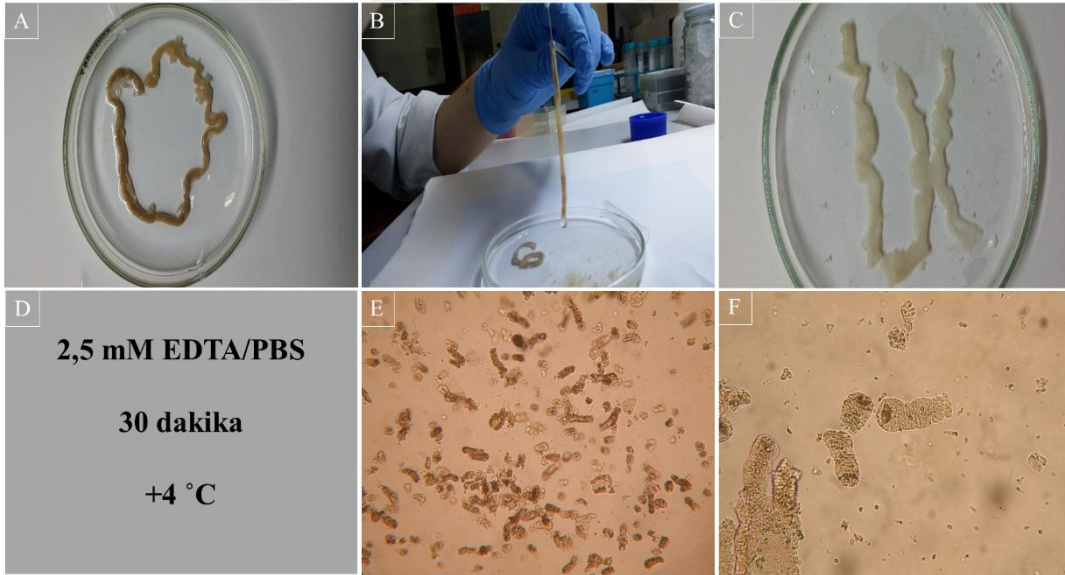
5.2.1. Fare İnce Bağırsak Kript İzolasyonu

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan izin doğrultusunda, fare diseksiyonu ile ince bağırsaktan kript izolasyonu yapılmak üzere fiziksel ötanazi yöntemlerinden olan servikal dislokasyon uygulandı. İnce bağırsağın deudoneum ve jejunum kısımları kesilerek, soğuk PBS içerisine transfer edildi (Şekil 7). Bağırsağı çevreleyen yağ dokusu ve mezenter (bağırsak askısı, ince bağırsağı karın duvarının arka bölümüne tutturarak karın zarı kıvrımı) mümkün olduğunca sivri uçlu bir makas yardımı ile temizlendi. İnce bağırsağın içi şırınga yardımıyla Mg^{+2} ve Ca^{+2} içermeyen PBS ile yıkandı. Bağırsak PBS ihtiva eden petride ince uçlu makas ile boylamasına açıldı. Mg^{+2} ve Ca^{+2} içermeyen PBS ile titreşim hareketleri yapılarak bağırsağın içi yıkandı. Bağırsak temiz bir petriye alındıktan sonra forsepe yardımıyla açıldı ve lam ile villüsler kazınarak temizlendi. Lam ile temizleme işlemi herhangi bir partikül gelmeyene kadar birkaç defa tekrarlandı. Daha sonra bağırsak 3-5 cm olacak şekilde kesildi. Bağırsak parçaları 20 ml PBS içeren falkona aktarıldı ve 5-6 kez kuvvetlice çalkalanarak yıkandı. Bağırsak parçaları tekrar 20 ml PBS içeren falkona aktarıldı ve çalkalanarak yıkandı. Yıkama işlemi PBS de herhangi bir artefak gözlenmeyinceye kadar sürdürüldü.



Şekil 6. Fare sindirim sistemi şematize görünümü (95)

Temizlenen doku parçaları 2.5 mM EDTA içeren 25 ml PBS tüpe aktarıldı. 4°C de 30 dakika karıştırıcıda bırakıldı. Süre sonunda bağırsak parçaları 10 ml PBS içeren falkona aktarıldı. Kuvvetlice çalkalanarak kriptlerin dökülmesi sağlandı. Süpernatant Advanced DMEM/F-12 besiyeri içeren falkona transfer edildi. Bağırsak parçaları üzerine tekrar 10 ml PBS eklendi ve kuvvetlice çalkalanarak süpernatant tekrar Advanced DMEM/F-12 içeren tüpe transfer edildi. Bu işlem birçok kez tekrarlanarak mümkün olduğunca çok kript elde edildi. Toplanan kriptler 1200 rpm'de 4 °C de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 10 ml Advanced DMEM/F-12 besiyeri eklenerek yeniden süspansiyon edildi. Kript-besiyeri karışımı 70 µm filtreden temiz bir falkon tüpe süzüldü. Süzülen karışım 800 rpm'de 4 °C'de 4 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine 5 ml Advanced DMEM/F-12 besiyeri eklenerek yeniden süspansiyon edildi. Elde edilen karışımdan 10 µl alındı ve invert mikroskop altında incelenerek kriptler sayıldı. Kriptler 1500, 3000 ve 5000 kript olacak şekilde 15 ml'lik üç ayrı falkon tüpe alıktırıldı (Şekil 7).



Şekil 7. Fare ince bağırsağından kript izolasyonu. A) Fare ince bağırsağı, B) İnce bağırsak içinin soğuk PBS ile yıkanması, C) Petriye alınan ince bağırsağın boylamasına açılması ve temizlenmesi, D) İnce bağırsak parçalarının 4°C'de 30 dakika inkübasyonu, E) Toplanan kriptlerin invert mikroskop altındaki görüntüsü, X4 büyütme, F) Kriptlerin invert mikroskop altındaki görüntüsü X20

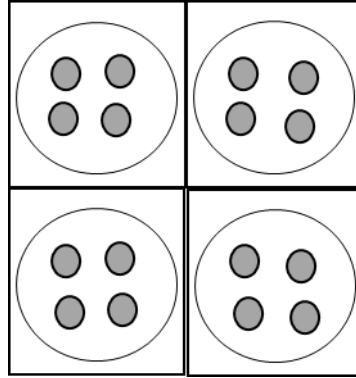
5.2.2. Toplanan Kriptlerden Tek Hücre Süspansiyonu Elde Edilmesi

1500, 3000 ve 5000 kript ihtiva eden 15 ml falkon tüpler 4°C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine 5 ml proteaz (TrypLE™ Express Enzimi 1X) ve 50µl DNaz eklendi. Tüpler 37°C su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kriptler her 10 dakikada bir şırınga ile mekanik olarak parçalandı ve bu işlem 3-4 kez tekrarlandı.

Örneklerin invert mikroskop altında tek hücre haline gelip gelmedikleri kontrol edildi. Tek hücre süspansiyonu haline gelen karışıma, proteaz aktivitesinin inhibe edilmesi için 2 ml FBS eklendi. Süspansiyon 1500 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak, ekim yapılmak üzere pellet buza alındı.

5.2.3. Matrijelin Hazırlanması ve Tek Hücre Süspansiyonunun Matrijel ile Ekilmesi

Ticari olarak satılan ve 4°C'de sıvı fazda bulunan matrijel 400 µl olacak şekilde alikotlandı. Alikotlanan tüpler -20°C'de muhafaza edildi. Ekim yapılacak 24 kuyucuklu pleyt 1 gün önceden 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı. Kullanılacak matrijel en az bir saat önce 4°C'de tutuldu. Matrijel sıvı hale gelince 400 µl olarak alikotlanan matrijel üzerine 200 µl Advanced DMEM/F-12 besiyeri eklenerek karıştırıldı. Tek hücre süspansiyon pelletini içeren 15 ml falkon tüplere 150 µl matrijel/Advanced DMEM/F-12 besiyeri karışımı eklenerek, pellet bu matrijel karışımı ile süspanse edildi. Oluşturulan tek hücre süspansiyonu ekim yapmadan matrijel ile 4°C'de inkübe edildi. Tek bir kuyucuğa 50 µl tek hücre ve matrijel karışımı 4 nokta olacak şekilde damlatıldı (Şekil 8). Matrijelin polimerleşmesi için pleyt 37°C etüvde 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda uygun besiyeri eklenerek ekim tamamlandı. Organoidlerin oluşması için 24 kuyucuklu pleyt 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda kültür edildi. İki günde bir medyum değiştirilerek kültüre devam edildi.



Şekil 8. Matrijelin kuyucuklara ekilmesi

5.3. Organoid Kültürü İçin Bazal Medyum Hazırlanması

Organoid kültür sisteminin gereksinimlerini sağlamak için bazal medyum hazırlandı. 50 ml falkon tüpe 400 µl Glutamin (200 mM), 400 µl HEPES (1 M), 400 µl Penisilin-Streptomisin (10 000 U/mL) konuldu. Son hacim 40 ml olacak şekilde Advanced DMEM/F-12 besiyeri eklendi. Bu bazal medyum fare ince bağırsak organoid kültürü için kullanıldı.

5.3.1. Fare İnce Bağırsak Organoidlerinin Kültür Ortamı

3-Boyutlu kültür sisteminde kök hücrelerin canlılıklarını sürdürebilmesi, çoğalıp farklılaşabilmesi ve fare ince bağırsağının minyatür bir halini oluşturabilmesi için çeşitli sinyal yollarını indükleyecek rekombinant proteinler, çeşitli büyüme faktörleri ve suplementler bazal medyuma eklendi (Tablo 2).

Tablo 2. Organoid kültürü besiyeri bileşenleri

Malzeme	Stok Konsantrasyon	Final Konsantrasyon
Advanced DMEM/F12	1 X	1 X
GlutaMax	200 mM	2 mM
HEPES	1 M	10 mM
Penisilin/streptomisin	50 U/ml	0,5 U/ml
N2 Supplement	100 X	1 X
B-27® Supplement	100 X	1 X
N-Asetil-L-Sistein	500 mM	1 mM
Fare Rekombinant EGF	50 ug/ml	50 ng/ml
Fare Rekombinant Nogin	100 ug/ml	100 ng
Fare Rekombinant RSpondin-1	100 ug/ml	500 ng

5.4. Organoidlerin Pasajlanması

Yeni kullanılacak matrijel, solid forma dönmesi için 4°C'de bir saat inkübe edildi. Pasajlanacak kuyucuklardaki besiyeri pipetaj yapıldı ve matrijelin parçalanması sağlandı. Besiyeri, matrijel ve organoid karışımı 15 ml falkon tüpe aktarıldı. Kuyucuklarda organoid kalmaması için, soğuk Advanced DMEM/F12 besiyeri ile tekrar yıkandı ve toplandı. 15 ml falkona toplanan organoidler, bir cam pastör pipetiyle pipetajlanarak mekanik olarak parçalandı. Organoidler %70 oranında tek hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra 1000 rpm'de 4°C de, 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda aşağıdan yukarıya doğru pellet, matrijel ve en üstte besiyeri olmak üzere tüpte 3 faz gözlemlendi. Besiyeri ve matrijel mümkün olduğunca pellete zarar verilmeden uzaklaştırıldı. Tüp 1-2 dakika buzda bekletildi.

1:6 oranında pasaj yapıldı. Pellete 150 µl solid matrijel eklendi ve karıştırıldı. Matrijel, organoid karışımından 50 µl çekilerek 24 kuyucuklu pleytlere ekim yapıldı. Matrijelin polimerleşmesi için pleyt 10 dakika 37°C etüvde inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 500 µl organoid kültür besiyeri eklenerek 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edildi.

5.5. Organoidlerin ve Fare İnce Bağırsak Dokusunun Parafine Gömülmesi

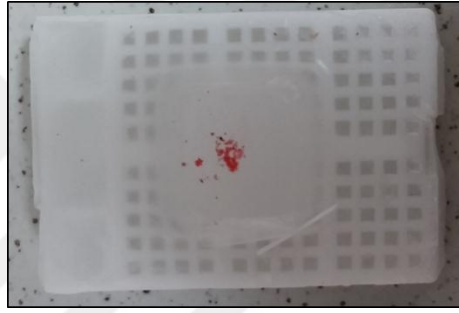
Dokuların mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmesi ile yapılan ve gömme ile sona eren işlemler dizisi "doku takibi" olarak isimlendirilmektedir. Doku takibi dehidrasyon, şeffaflandırma ve sertleştirme aşamalarından oluşmaktadır. Dehidrasyon, dokuların parafine gömülmesi için gerekli olup çeşitli dehidrasyon yöntemleri (etil alkol, metanol, isopropanol, bütanol ve aseton vb.) vardır. Çalışmada dehidrasyon etil alkol ile yapılmıştır. Şeffaflaştırma (temizleme) işlemi için dehidrasyon maddesini temizleyebilen ajanlar kullanılmaktadır. Temizleme işlemi için kullanılan birçok kimyasal içinden (ksilen, tolüen, benzen ve kloroform vb.) ksilen seçilmiş ve fare ince bağırsağı parafine gömülmeden önce kullanılmıştır ancak organoidlerin parafine gömülmesinde bu aşamaya ihtiyaç duyulmamaktadır. Dehidrasyon ve temizlemeden sonra dokuların mikrotom ile kesilebilmesi için sertleştirilmesi gerekmektedir. Bu işlem çeşitli sertleştirme ajanları içinden (parafin, mumlar, reçineler, agar ve jelatin, vb.) parafin ile gerçekleştirilmiştir (96).

Besiyeri pipetaj yapılarak, matrijel mekanik olarak parçalandı ve organoid, besiyeri ve matrijel süspansiyonu 15 ml falkona toplandı. Üzerine 10 ml soğuk Advanced DMEM/F12 eklendi. Organoidlerin hasar görmemesi için düşük hızda, 500 rpm 4°C de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 10 ml %4' lük PFA eklenerek, 4°C'de karıştırıcıda (roller mixer) 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 800 rpm'de 4°C'de, 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pellete zarar vermeden uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 3 ml %70'lik etil alkol eklendi. Organoidler 16 mm cam tüplere aktarıldı. Organoidlerin dibe çökmesi için bir süre beklendi ve alkol uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra 3 ml %70 alkol içerisinde organoidler parafine gömülünceye kadar 4°C de saklandı.

Parafine gömülme aşamasında, alkol tüpün dibinde bir miktar kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Tüpe 2 ml kadar %1 eozin y (y: yellowish, eozin sarısı) çözeltisi eklendi ve bu şekilde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda eozin mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Organoidler %100 etil alkol ile iki defa yıkandı. Her yıkamada 15 dakika %100 etil alkol de inkübasyona bırakıldı. Etil alkol ile yıkama işleminden sonra organoidler butanol ile 3 kez yıkandı. Her yıkama arasında 15 dakika beklendi. Bu süre zarfında

organoidlerin tüp dibine çökmeleri sağlandı. Bu şekilde pellet (organoidler) dağıtılmadan butanol uzaklaştırıldı.

Parafine gömülecek organoidler içerisinde sıvı parafin bulunan cam tüp içerisinde 30 dakika 65 °C'lik etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, sıvı parafin bir miktar uzaklaştırıldı. Kalan parafin ve organoidler, dibi çukur metal parafin bloğa döküldü. Eozin ile sarıya boyanan organoidler, sıvı parafinin içinde sivri uçlu bir metal ile çukurun ortasına toplandı. Organoidler merkeze toplandıktan sonra, parafin kaset nazikçe metal bloğa yerleştirildi. Organoidler dağıtılmadan metal blok parafinin katılaşması için soğuk bir zemine oturtuldu. Bir gün boyunca soğuk zeminde bekletilen parafin kasetler, kesit almaya uygun hale getirildi (Şekil 9).



Şekil 9. Parafin bloğa gömülmüş eozin ile boyanmış organoidler (parafin blok 2.8 x 4 cm)

Fare ince bağırsak dokusundan duodenum kısmı soğuk PBS içerisine alındı. Etrafındaki yağ dokusu ve kan damarları ince uçlu makas yardımı ile uzaklaştırıldı. İçerisi şırınga yardımı ile temizlendi. Doku 3 mm silindirler olacak şekilde parçalara ayrıldı. Parçalar %4'lük PFA çözeltisi içerisinde 3 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda PFA uzaklaştırıldı ve soğuk PBS içerisine transfer edildi. PFA'nın tamamen temizlenmesi için soğuk PBS 3 kez değiştirildi ve doku parçaları yıkandı. Her yıkamada 5 dakika beklendi. Ardından doku parçaları sırasıyla her birinde 10 dakika bekletilmek üzere %50, %70, %80, %95 ve %100 etil alkolden geçirildi. %100 etil alkolde 10 dakika iki kez daha inkübe edilen dokular ksilene aktarıldı. 5 kez 10'ar dakika ksilende yıkanarak etil alkolün uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlemden sonra doku parçaları 56°C sıvı parafinde aynı sıcaklıktaki etüv içerisinde 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından sıvı parafin değiştirilerek doku parçaları aynı şartlarda gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün dokular lümen kısmı kesit alınacak yüzeye dik olacak şekilde parafin kasetlere gömüldü. Bir gün boyunca soğuk zemin üzerinde bekletilen kasetler kesit alınmaya uygun hale getirildi.

5.5.1. Parafine Gömülen Örneklerden Kesit Alma

Parafin kasetler çarklı mikrotom cihazının blok tutucu kısmına tutturuldu. Organoidlerin ve ince bağırsağın bulunduğu parafin kasetlerin ön yüzleri tıraşlandı. Dikey kızak sistemi üzerinde, blok tutucu başlığın aşağı yukarı hareketi ile kesit alındı. Işık mikroskobunda inceleme yapılabilmesi için seri ve ince kesitler alındı (3-5 mikron). Kesitler öne doğru aktığı için belli uzunluktaki kesitler içerisinde su olan bir kaba aktarıldı. Kesitler su yüzeyinde yüzerken, lam ile kesitlerin altından girerek lam yüzeyine yapışmaları sağlandı.

5.5.2. Alınan Kesitler İçin Hematoksilen ve Eozin Boyaması

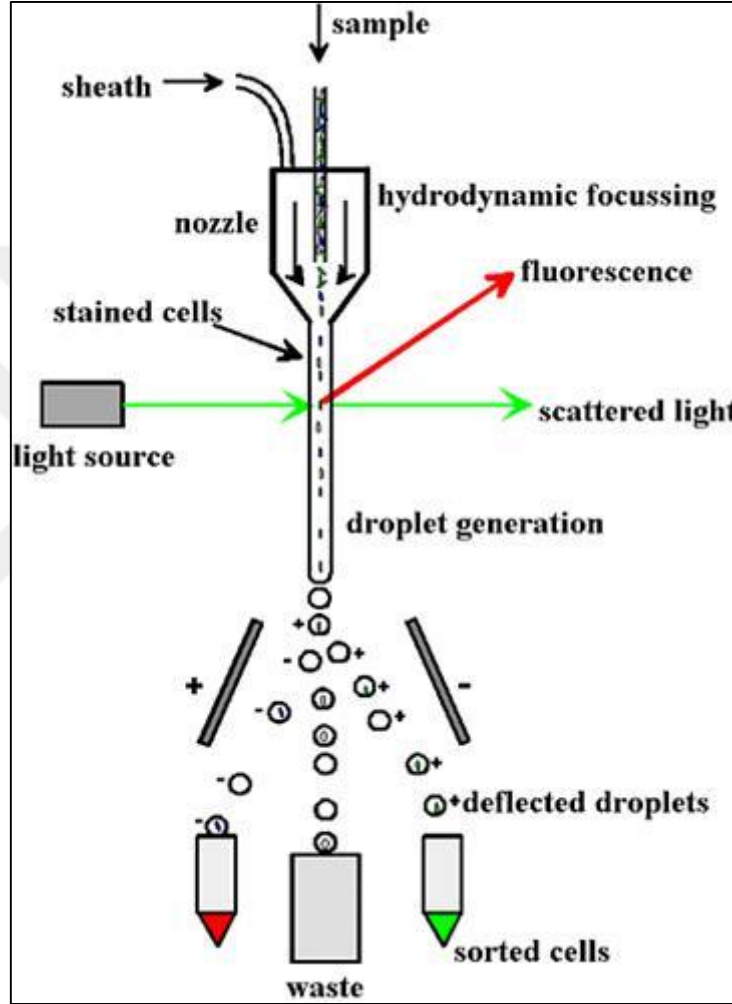
Hematoksilen-Eozin (HE) boyası çekirdek ve sitoplazma ayırımında kullanılır ve dokunun farklı bölgelerini farklı renkte boyar. Hematoksilen çekirdeği mavi-siyah, eozin ise sitoplazmayı ve bağ doku elemanlarını pembe-kırmızı renkte boyar. Hematoksilen solüsyonları, asit ve alimünyum hematoksilenler olmak üzere ikiye ayrılır. Bu çalışmada alüminyum hematoksilenlerden olan Mayer'in hematoksileni kullanıldı.

Hematoksilen-Eozin boyama yapılacak ince bağırsak ve organoidleri barındıran parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler alınarak lam üzerine yerleştirildi. Lamalar 60 °C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün boyama işlemi için Hematoksilen-Eozin boya seti oluşturuldu. HE boya setinin başlangıcını deparafinizasyon ve dehidrasyon solüsyonları oluşturur. Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 5'er dakika 2 kez ksilende tutuldu. Dehidrasyon işlemi için %100, %96, %90, %80, %70, %60, %50, %25 etil alkol serisinde ve dH₂O' da 1'er dakika tutuldu. Kesitler hematoksilen boya solüsyonunda 2 dakika tutuldu. Kesitler 5 dakika çeşme suyunda yıkandı. Kesitler %50, %60, %70, %80, %90 etil alkol serisinde 1'er dakika tutuldu. Ardından kesitler 2 dakika eozin boya solüsyonunda tutuldu. Çeşme suyunda 5 dakika yıkandı. %96 etil alkolde 10 dakika, %100 etil alkol de 2 kez 2'ser dakika tutuldu. Ardından örnekler ksilende 2 kez 2'ser dakika tutuldu. Örnekler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve bir penset yardımıyla hava kabarcıkları çıkarıldı.

5.6. Organoidi Oluşturan Hücrelerin Akım Sitometrik Analizleri

Akım sitometrisi, akan bir sıvının içindeki hücre ya da partiküllerin karakteristiğinin ölçülmesini sağlayan bir yöntemdir (97). Tek hücre seviyesinde analiz yapabilen ve 15-60 saniyede 30000-70000 arası hücre değerlendirebilen akım sitometrisi (flow sitometri) analiz yöntemi günümüzde altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, süspansiyon halindeki materyal, lazer ışığının olduğu bir bölümden geçirilmekte ve bu ışığın önünden geçerken verdiği sinyaller toplanarak analiz edilmektedir. Oluşan sinyallerden

hücrenin/partikülün büyüklüğü ve granülitesi gibi fiziksel özelliklerinin yanında, canlılığı, enzim aktivitesi, hücre türü, DNA içeriği gibi çeşitli özellikleri hakkında da bilgi toplanabilmektedir (98). Bunun yanında bazı sitometreler partikülleri fiziksel (yüklerine göre) olarak da gruplayabilmektedir. Gruplanan bu partiküller ayrı bir tüpe toplanabilmektedir (sorting) (Şekil 10).



Şekil 10. Akım sitometrisi çalışma prensibi (Karaboz'dan 99)

Akım sitometrisi hücre içerisindeki veya yüzeyindeki spesifik yapıların varlığına bağlıdır. Ancak hücrelerin güçlü floresan veren molekülleri yoktur. Bu sebeple hücreler etkili floresan ışımaya yapan boyalarla etiketlenirler. Bu boyalar, hücreler hakkında spesifik bilgiler elde etmek için hücre yüzeyindeki veya içindeki hedef moleküllere boya konjuge antikolarla tutturulur (100).

Hücre yüzey markırları genellikle spesifik hücreler için, hücre yüzeyinde bulunan proteinlerdir. Bu proteinler sınıflandırma belirleyicisi (classification determinant, CD) olarak isimlendirilir ve hücre yüzey moleküllerinin tanınmasında, araştırılmasında kullanılır. Bu

proteinler sayesinde hücrelerin immunfenotiplenmesi gerçekleştirilir. CD molekülleri hücre için çok önemli olan reseptör veya ligand olarak görev görebilir. CD molekülleri akım sitometrisi başta olmak üzere çeşitli yöntemler ile hücre belirlemede kullanılmaktadır.

Organoidlere yüzey boyama uygulamak için, organoidler tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Organoidler 50 ml falkon tüplere toplandı, soğutmalı santrifüjde 1000 rpm 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine 5 ml proteaz (TrypLE Express Enzim) ve 50µl DNaz eklendi Tüpler 37°C su banyosunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Kriptler her 10 dakikada bir şırınga ile mekanik olarak parçalandı ve bu işlem 3-4 kez tekrarlandı. Örneklerin invert mikroskop altında tek hücre haline gelip gelmedikleri kontrol edildi. Tek hücre süspansiyonu haline gelen karışıma, proteaz aktivitesinin inhibe edilmesi için 2 ml FBS eklendi. 2000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler 5 ml soğuk Advanced DMEM/F12 besiyeri ile yıkandı. Santrifüj işlemi tekrarlandı. Yıkama işlemi 2 kez uygulandıktan sonra pellet üzerine 450 µl Advanced DMEM/F12 besiyeri eklenerek yeniden süspansiyon edildi ve ependorf tüpüne aktarıldı. Bu tüpten 50 µl alınarak başka bir tüpe negatif kontrol olarak ayrıldı. Geriye kalan 400 µl'lik süspansiyon içeren tüpe, primer antikor (Anti-mouse CD24) son konsantrasyon 1/200 oranında olacak şekilde eklendi ve buzda 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda örnek 2000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet 500 µl Advanced DMEM/F12 besiyeri eklenerek yeniden süspansiyon edildi. Örnek son konsantrasyon 1/500 olacak şekilde sekonder antikor (Anti-sıçan IgG Sekonder antikor, Alexa Flour 488) ile buzda 30 dakika ve karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda örnek 2000 rpm'de 4°C de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet 500 µl Advanced DMEM/F12 besiyeri eklenerek yeniden süspansiyon edildi. Son konsantrasyon 1/100 olacak şekilde propidyum iyodid (PI) hem kontrole hem de örneğe eklenerek, hücreler akım sitometrisinde sayıldı. Hücrelerin analizleri cihaz üzerindeki programla yapıldı (Tüm antibodiler Advanced DMEM/F12 besiyeri içerisinde uygulandı).

Aynı işlemler CD44 yüzey boyaması için de uygulandı. Tek hücre süspansiyonu haline getirilen organoidler 2000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 450 µl Advanced DMEM/F12 besiyeri eklenerek yeniden süspansiyon edildi ve ependorf tüpüne aktarıldı. Bu tüpten 50 µl alınarak başka bir tüpe negatif kontrol olarak ayrıldı. Geriye kalan 400 µl'lik süspansiyon içeren tüpe, primer antikor (Anti-mouse CD44) son konsantrasyon 1/200 oranında olacak şekilde eklendi ve buzda 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda örnek 2000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet 500 µl Advanced DMEM/F12 besiyeri eklenerek yeniden

süspanse edildi. Örnek son konsantrasyon 1/500 olacak şekilde sekonder antikor (Anti-sıçan IgG Sekonder antikor, Alexa Flour 488) ile buzda 30 dakika ve karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda örnek 2000 rpm'de 4°C de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp, pellet 500 µl Advanced DMEM/F12 besiyeri eklenerek yeniden süspanse edildi. Son konsantrasyon 1/100 olacak şekilde propidyum iyodid (PI) hem kontrole hem de örneğe eklenerek, hücreler akım sitometrisinde sayıldı. Hücrelerin analizleri cihaz üzerindeki programla yapıldı (Tüm antibodiler ve boyalar Advanced DMEM/F12 besiyeri içerisinde uygulandı).

Propidyum iyodid DNA'yı boyayan floresan ışımaya yapan bir boyadır. Erken faz apoptotik hücreler ve/veya ölmüş hücreler için belirleyici özelliğindedir. Bu özelliği ile genellikle bir hücre popülasyonundaki ölüme giden/ölü hücreleri belirlemek için kullanılır (101).

5.7. Organoidi Oluşturan Paneth Hücrelerinin Anti-lizozim İle İmmünohistokimyasal Olarak Boyanması

İmmünohistokimya (IHC), belli bir dokuda bulunan antijenlerin gösterilmesi için işaretlenmiş antikorların kullanıldığı bir yöntemdir. İmmünohistokimya antijen-antikor ilişkisine dayanan, formalin ile fikslenmiş, parafine gömülmüş dokularda spesifik antijenlerin gösterilmesi için uygulanan güçlü bir yöntemdir. İmmünohistokimya yapılmış dokudaki antijen-antikor yapısı ışık mikroskopu altında görüntülenebilmektedir. Bu yöntemin en büyük avantajlarından biri spesifik antijenin etrafındaki doku morfolojisinin klasik histolojik boyama (hemotoksilen) yapılarak gösterilebilir olmasıdır (102).

Organoidler ve ince bağırsak dokusu yukarıda anlatıldığı gibi uygun şekilde parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklar kesit almadan 1 saat önce -20 °C'de inkübe edildi. Mikrotom cihazı yardımıyla 5 µm'lik kesitler alındı. Kesitler lama aktarıldı ve hot pleyt üzerinde 1 saat bekletilen preparatlar 60 °C etüvde 1 gün inkübe edildi. Ertesi gün örnekler 3 kez 5'er dakika ksilende tutuldu. Ardından %100, %96, %90, %80, %70, %60, %50 ve %25 etil alkol serisinde 1'er dakika tutuldu ve distile sudan geçirilerek alkol uzaklaştırıldı. Ardından Hidrojen peroksidad (H₂O₂) içeren bloklayıcı tampon solüsyonu ile 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası preparatlar metal lam boyama sepetine konularak fiksasyon solüsyonu içinde 20 dakika kaynatıldı. Kaynama işlemi tamamlandıktan sonra preparatlar çeşme suyundan geçirildi, ardından PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Preparatlar plastik bir lam taşıma kabına kesitler yukarıya bakacak şekilde konuldu. Ardından kesitin üzeri ön bloklama solüsyonu (%1'lik BSA/PBS) ile tamamen kapatılacak şekilde 30 dakika

inkübe edildi. Primer antikor (Tavşan anti-insan Lizozim Poliklonal Antikor) %0,05 lik BSA/PBS ile 1:2000 dilüsyon oranında sulandırıldı. Ön bloklama sonrası, plastik lam taşıma kabında preperatın üzerini tamamen kaplayacak şekilde primer antikor ile 24 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda preperatlar PBS içinde 3 kez 5'er dakika yıkandı. Sekonder antikor (Anti-tavşan HRP) %0,05 lik BSA/PBS içerisinde 1:1500 olacak şekilde sulandırıldı. Preperatların üzeri tamamen kapanacak şekilde sekonder antibodi ile 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Preperatlar diaminobenzidin (DAB) ile yüzeyleri tamamen kaplanarak 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda su ile yıkanan örnekler hematoksilen solüsyonunda 1 dakika tutuldu. Örnekler %25, %50, %60, %70, %80, %90, %96, %100 etil alkol serisinden geçirildi ve ksilende 5 dakika tutuldu. Örnekler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı ve bir penset yardımıyla hava kabarcıkları çıkarıldı. Örnekler mikroskop altında analiz edildi.

5.8. Organoidlerin Sıvı Nitrojende Dondurulması

Organoid kültürünün sürekliliği için organoidler DMSO içeren %20 FBS/Advanced DMEM/F12 ile dondurularak sıvı nitrojende stoklandı. Bunun için 2-3 kuyucuktan organoidler toplandı, 15 ml falkon tüpüne aktarılıp, 4°C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 900 µl %20 FBS-Advanced DMEM/F12 dondurma medyumuna eklendi ve 2 ml'lik contalı saklama tüplerine (vial) konuldu. 10 dakika buzda bekletilen tüplere 100 µl DMSO eklendi. Tüpler 20 dakika buzda bekletildikten sonra -80°C'de 24 saat saklandı. Ertesi gün sıvı nitrojen tankına aktarıldı.

5.9. Dondurulmuş Organoidlerin Çözülmesi

Organoidleri içeren vial sıvı nitrojenden çıkartıldı. Vialin içinde bir miktar buz kalacak şekilde vial 37°C su banyosunda çözüldü. Çözülen organoidler %20 FBS- Advanced DMEM/F12 içeren 5 ml medyum üzerine pastör pipeti ile aktararak karıştırıldı. Süspansiyon 4°C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 5 ml %20 FBS-Advanced DMEM/F12 medyumunu eklendi ve tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant mümkün olduğunca uzaklaştırdı ve üzerine 50 µl matrijel eklenerek organoidler matrijel ile karıştırıldı. 24 kuyucuklu pleyt'in bir kuyucuğuna 50 µl matrijel organoid karışımı 4 nokta olacak şekilde damlatıldı. Matrijelin polimerleşmesi için pleyt 37°C etüvde 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda uygun besiyeri eklenerek ekim tamamlandı. Organoidlerin büyüüp, gelişebilmesi için 24 kuyucuklu pleyt 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda kültür edildi. Her iki günde bir medyum değiştirilerek kültüre devam edildi.

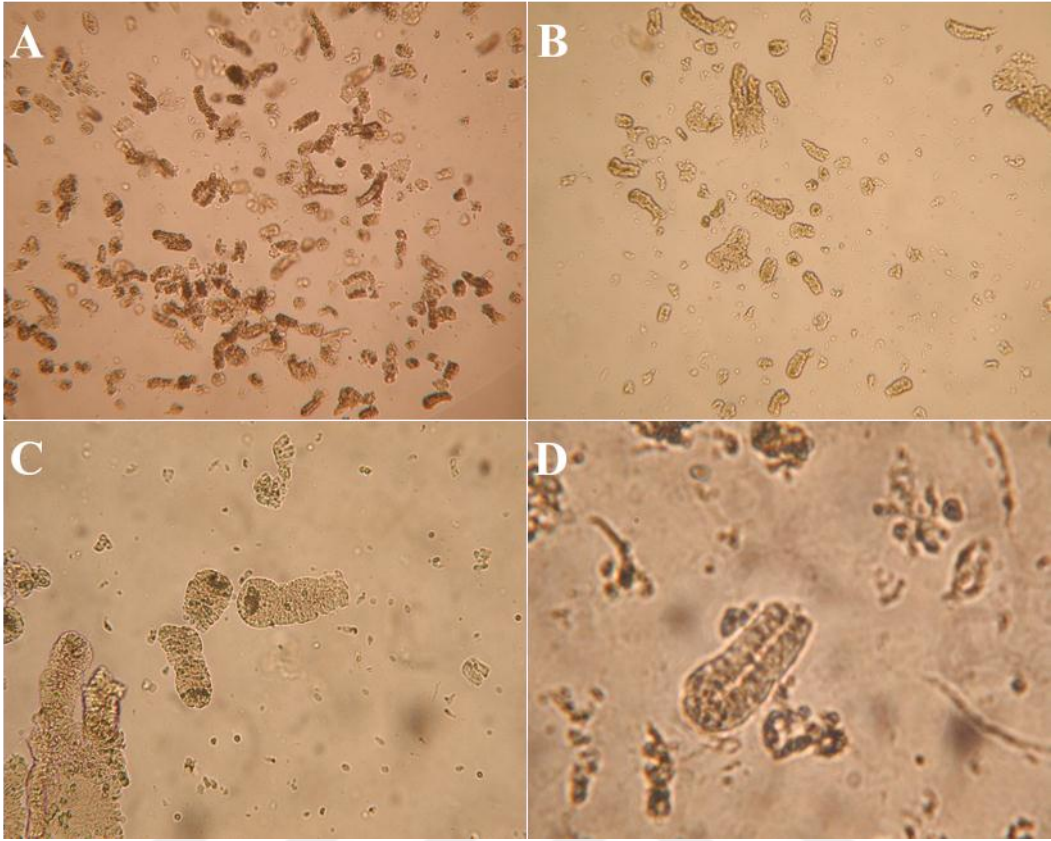
6. BULGULAR

Çalışmamızda, tek bir bağırsak kök hücresinin uygun şartlarda yaşatılabildiği ve gerekli sinyal yollarını indükleyebilecek proteinlerin, supplementlerin ve büyüme faktörlerinin eklenmesi ile ince bağırsak epitelini oluşturan kript-villus yapısı 3-boyutlu kültür yöntemi ile elde edildi. Epitel kök hücrelerinin sürekli faaliyetlerinden dolayı tek bir kök hücreden lümen yapısını oluşturabilen organoidler *in vitro* ortamda oluşturuldu. Oluşturulan organoid yapısındaki kript-villus yapıları HE boyama ile ışık mikroskopunda, kript tabanında bulunan paneth hücreleri hem anti-lizozim boyama ile ışık mikroskopunda hem de CD24 antikoru kullanılarak akım sitometrisinde ve paneth hücreleri arasındaki kök hücreler ise CD44 antikoru kullanılarak akım sitometrisinde gösterildi.

Organoidlerin uzun süre kültür edilebilme, pasajlanabilme ve dondurulup-çözülebilme özellikleri vardır. Bundan dolayı, bu çalışma ile ileride yapacağımız birçok çalışma için, uygun ve elverişli bir model kültür sistemini doku laboratuvarımızda kurmuş olduk.

6.1. Fare İnce Bağırsaklarından Kriptlerin İzolasyonu

Çalışma kapsamında organoid kültürünü oluşturabilmek için, 2-4 aylık Balb-c ırkı farelerden ince bağırsağının deudonum ve jejunum kısımlarındaki kök hücrelerin lokalize olduğu kriptlerin izolasyonu yapıldı (Şekil 11). Sağlıklı bir şekilde kök hücrelerin de içinde bulunduğu hücre popülasyonunun elde edilmesinde kriptlerin izolasyonu büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda, kriptlerin “test tüpü” şeklindeki morfolojilerinin de dağılmamış ve hasar görmemiş olması gerekmektedir.

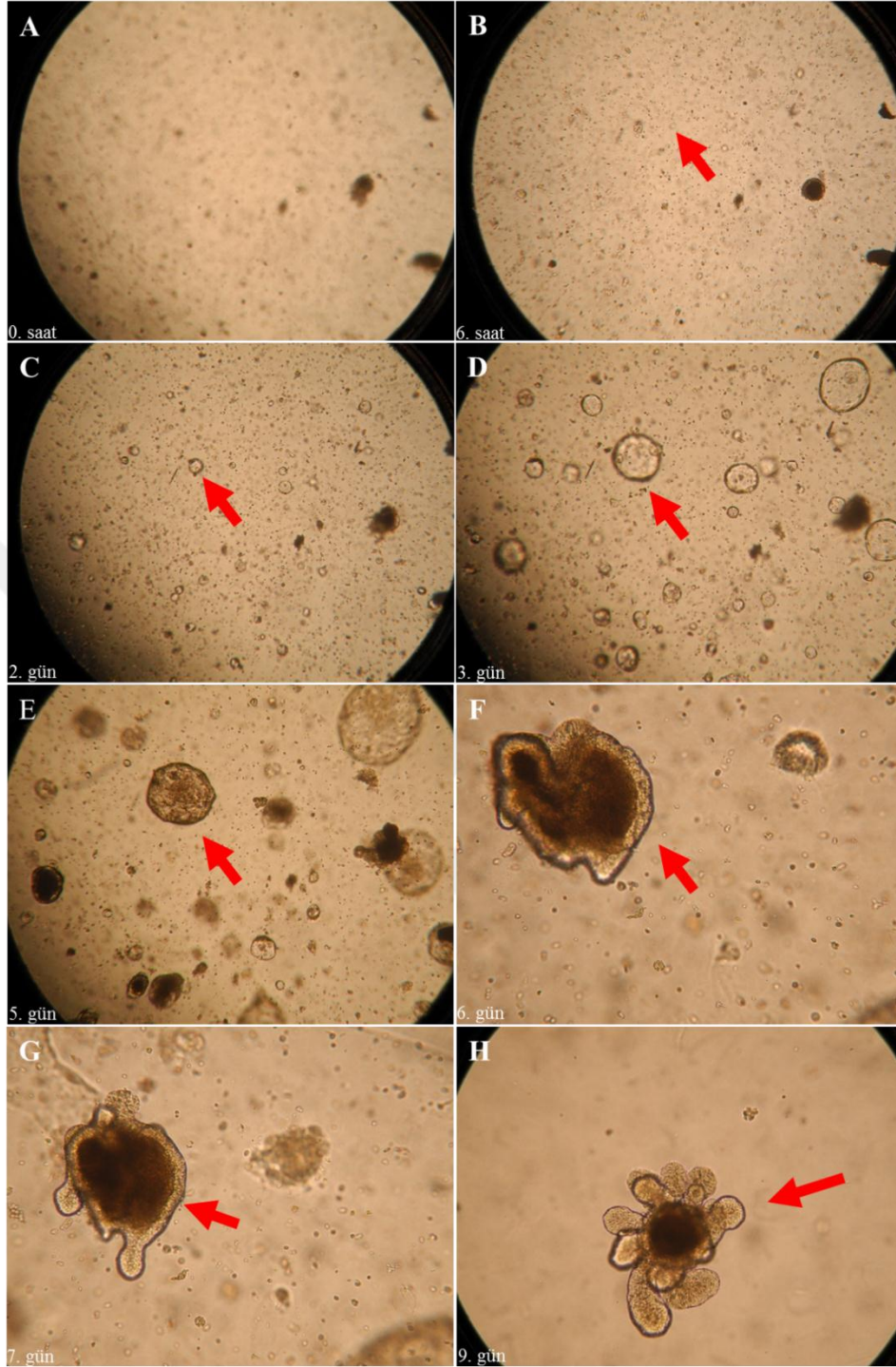


Şekil 11. İnce bağırsaktan izole edilen kriptlerin invert mikroskop görüntüleri. A) X4 büyütme, B) X10 büyütme, C) X20 büyütme, D) X40 büyütme.

6.2. Kriptlerden İzole Edilen Hücrelerden Organoidlerin Oluşturulması

İzole edilen kriptlerden tek hücre süspansiyonu oluşturuldu (Şekil 12A-B). Bu hücreler matrijel ile karıştırılarak 24 kuyucuklu pleytlere ekildi. Uygun besiyeri eklenerek organoidlerin oluşumları invert mikroskop altında gözlemlendi. 10 gün boyunca organoidler izlendi. 2. gün sonunda kök hücrelerin yoğun faaliyetleri sonucu hücreler klon/sferoid yapı oluşturarak küresel lümen yapısı şeklini aldı (Şekil 12C). Bu yapı 4-5. günde lümen oluşumunu tamamladı (Şekil 12D-E). Bu aşamadan sonra lümen yapısından kript kısımları tomurcuklanarak oluştu. Bu aşamada ince bağırsak epitelininin organodi oluşmuş oldu (Şekil 12F-H). Organoidleri oluşturan kript ve villus kısımları ise Şekil 13' de gösterilmiştir.

Şekil
12. İnce



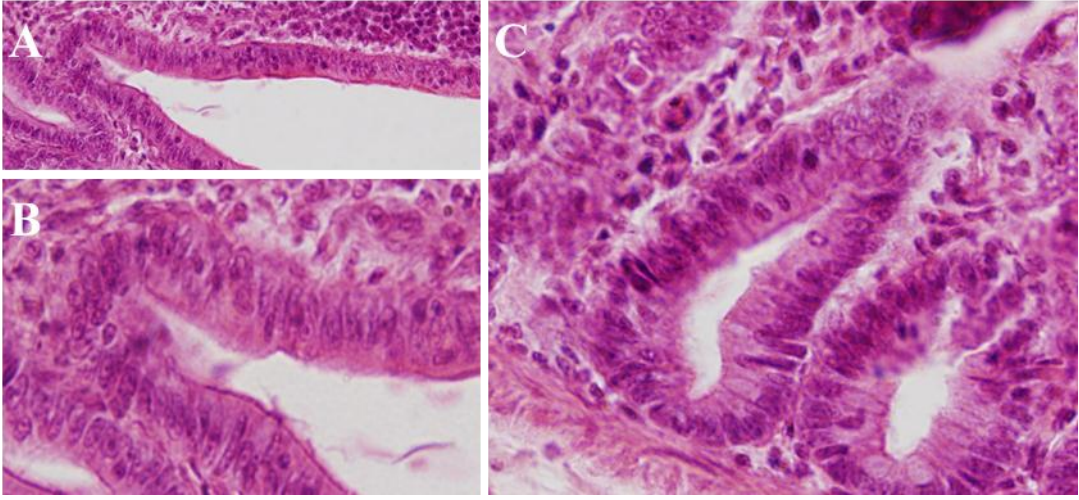
bağırsak organoid oluşumu (0-9. gün). A) Tek hücre süspansiyonu, X4 büyütme, B) Sferoid yapıların oluşmaya başlaması, X4 büyütme, C) Sferoidlerin belirginleşmesi, X4 büyütme, D) Çok sayıda sferoidin farklı boyutlarda görünür hale gelmesi, X4 büyütme, E) Sferoidler üzerinden kript tomurcuklarının görülmeye başlanması, X4 büyütme, F) Sferoidler üzerinde kript tomurcuklarının belirginleşmesi, X10 büyütme, G) Sferoidler üzerinde karakteristik kript ve villus kısımlarının görülmesi, X10 büyütme, H) Olgun organoidin görülmesi. X4 büyütme



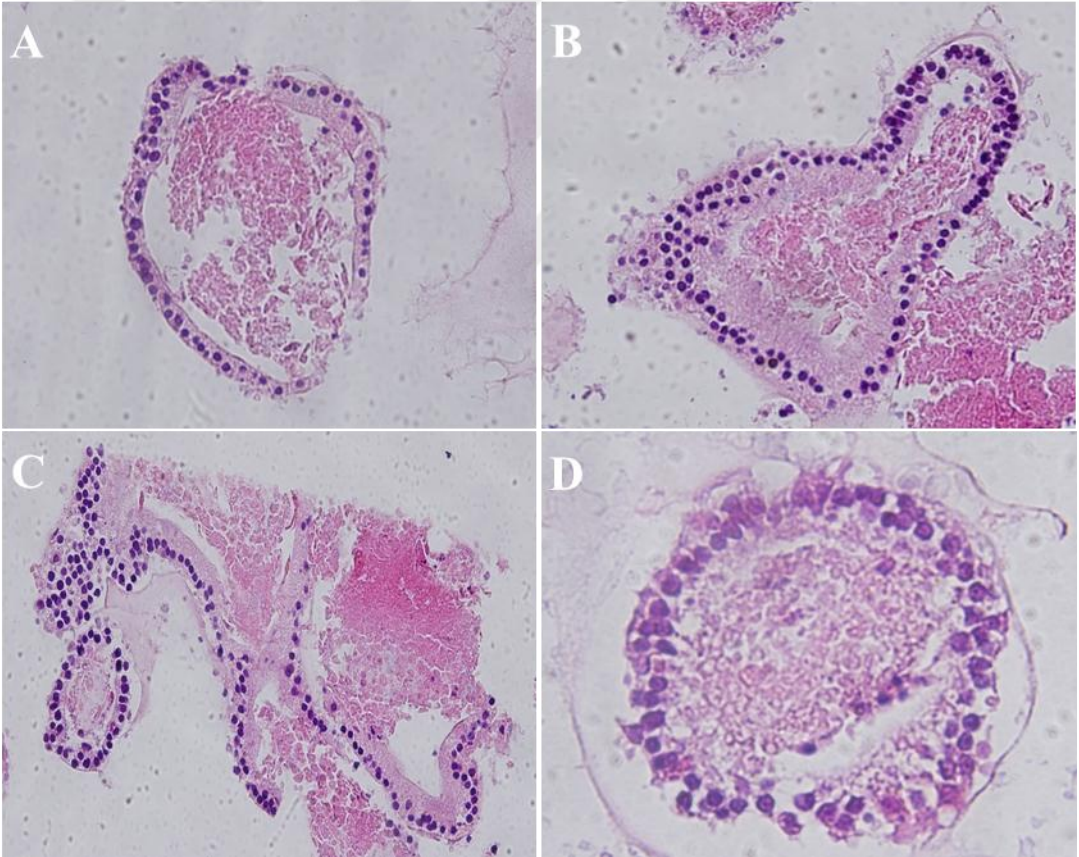
Şekil 13. Kript ve villus kısımlarının invert mikroskop görüntüleri. A) Kript ve villus kısımlarının görüldüğü olgun organoid, X10 büyütme, B) Olgun bir organoiddeki kript ve villus kısımlarının detaylı görünümü, X40 büyütme

6.3. Organoidlerin Hematoksilen ve Eozin Boyanması

Oluşturulan organoidler ve fare ince bağırsağı parafin bloklara gömülerek ayrı ayrı 5-7 μm 'lik kesitler alındı. Bu kesitler histolojik incelemelerde en çok kullanılan Hematoksilen ve Eozin (HE) boyama ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelendi. Fare ince bağırsağının (Şekil 14) ve organoidlerin (Şekil 15) epitel morfolojileri HE boyama ile gösterildi.



Şekil 14. Fare ince bağırsak dokusunun HE ile görüntülenmesi A) X40-B-C) X100 büyütme



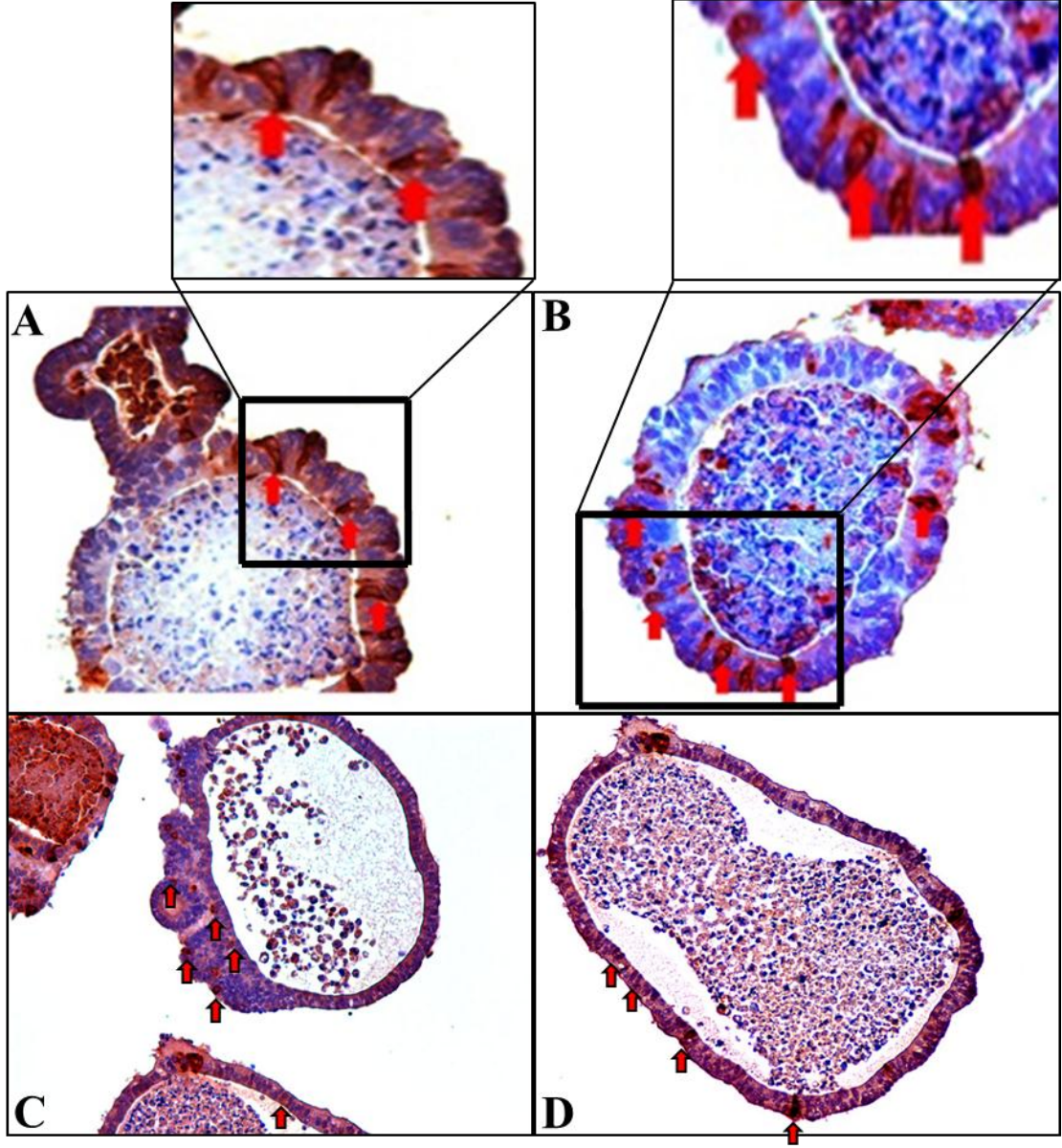
Şekil 15. Organoidlerin HE boyası ile morfolojilerinin görüntüsü, A-C) X40 büyütme, D) X100 büyütme

Yapılan HE boyama ve ışık mikroskopunu analizinin sonucunda, oluşturduğumuz organoidi oluşturan epitelyal dokudaki kript ve villus morfolojisinin ince bağırsak epiteli ile benzer olduğu gösterilmiştir. Hem fare ince bağırsak epitelinin hemde organoidleri oluşturan epitel hücrelerinin “tek katlı prizmatik epitel benzeri hücrelerden” oluştuğu anlaşıldı.

6.4. Organoidlerdeki Paneth Hücrelerinin Anti-Lizozim İle İmmünohistokimyasal Olarak Tespit Edilmesi

Kök hücrelerin niş hücresi olan paneth hücreleri aynı zamanda çeşitli bakterilerin peptidoglukan tabakasını parçalayan lizozim enzimi salgılamaktadır. Kript tabanında bulunan paneth hücrelerinin bu özelliğinden yararlanılarak, anti-lizozim antikoru ile üretilmiş olduğumuz organoidlerdeki lokalizasyonu immunohistokimyasal olarak gösterildi (Şekil 16).

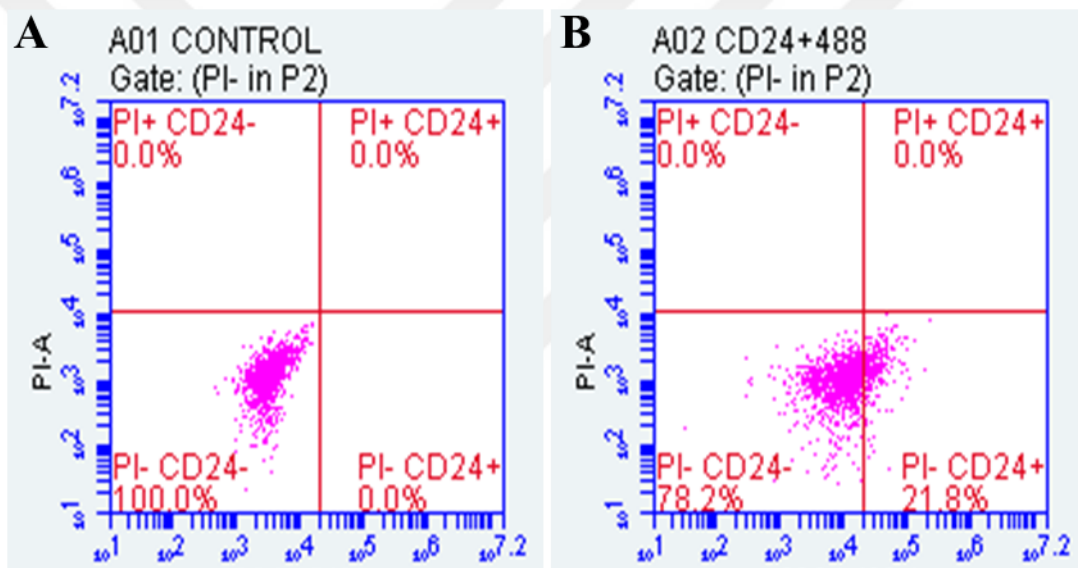
Anti-lizozim antikoru ile ışık mikroskopunda gösterilen Paneth hücrelerinin, lümenin etrafındaki kahverengi hücreler olduğu gösterildi. Boyamalarda iki paneth hücrelerinin arasının anti-lizozim antikoru ile boyanmadığı ve bu boyanmayan hücrelerin bağırsak kök hücresi oldukları düşünüldü.



Şekil 16. Organoidlerdeki paneth hücrelerinin immonohistokimyasal olarak gösterilmesi. A,B ve D) X40 büyütme, C) X20 büyütme ile görüntülenen paneth hücreleri (kırmızı ok).

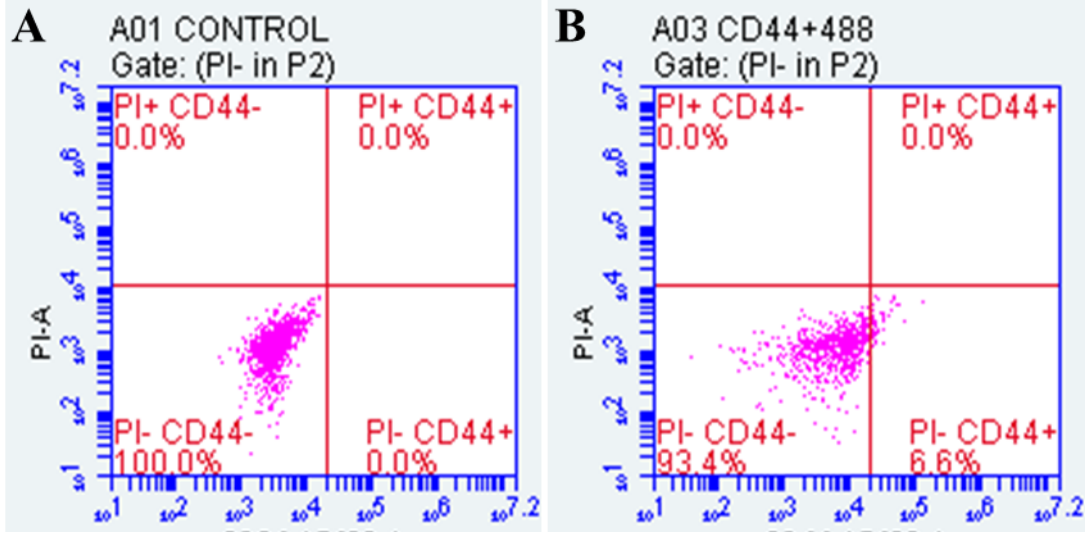
6.5. Organoidi Oluşturan Hücre Popülasyonundaki Hücrelerinin Akım Sitometrisi İle Tespit Edilmesi

Organoidlerin oluşmasını sağlayan kök hücrelere gerekli mikroçevreyi sağlayan ve onların niş hücresi olan Paneth hücreleri, CD24 yüzey antijeninin ekspresyonunu göstermektedir (39). Paneth hücreleri, kök hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirmeleri için zorunlu EGF, Wnt ve Notch ligandı gibi çeşitli molekül ve proteinlerin ekspresyonunu sağlamaktadır. Oluşturduğumuz organoid yapısındaki kript tabanında bulunan ve kök hücreleri çevreleyen paneth hücrelerinin varlığı CD24 antikoru kullanılarak akım sitometri analizi ile gösterildi (Şekil 17).



Şekil 17. Organoidi oluşturan hücre popülasyonundaki CD24 ekspresyonu. A) Yüzey boyaması yapılmayan hücreler, B) Yüzey boyaması yapılan hücreler

Birçok çalışmada CD44 pozitif hücrelerinin bağırsak kriptlerindeki kök hücrelerin yüzey markırını olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (36, 103). Yüzey boyama yapılarak tek hücre süspansiyonundaki kök hücreler CD44 antikoru kullanılarak akım sitometri analizi ile gösterildi (Şekil 18).



Şekil 18. Organoidi oluşturan hücre popülasyonundaki CD44 ekspresyonu. A) Yüzey boyaması yapılmayan hücreler, B) Yüzey boyaması yapılan hücreler

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İki boyutlu kültür sistemleri temel hücre biyolojisi ve tümöröenez için ıgır aan yaklaşımlar sağlamıştır. Buna en iyi örnek, meme kanseri tedavi yöntemlerinden olan östrojen reseptör terapisi, östrojen bağımlı hücre hatlarının 2-boyutlu kültürlerde oluşturulması ve bu hücre hatları ile yapılan araştırmalar sonucunda bulunmuştur (104). Ancak fizyolojik parametrelerdeki değişiklikler, organın veya tümörün doku mimarisi, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri, biyokimyasal etkileşimler ve sinyal yolları göz önüne alındığında 2-boyutlu sistemler yetersiz kalmaktadır. Geliştirilen 3-boyutlu kültür sistemleri ile matrikse gömülü olarak yetiştirilen hücreler veya hücre-sferoidler, dokuların ve tümörlerin *in vivo* ortamdaki mimarisini oluşturmada kullanılmaya başlanmıştır. Bu nedenle bu 3-boyutlu kültür sistemleri kök hücre, organogenez, normal doku ve tümörlü doku mukayesesi, ilaç geliştirme ve toksisite gibi çalışmalar için daha uygun sistemler haline gelmiştir (105).

Hans Clevers ve Toshiro Sato 2009 yılında, biyolojik süreçler ve hastalıkların çalışılmasında ıgır açacak kullanışlı bir model sistem olan ve yetişkin kök hücrelerden organ yapısının kopyasını oluşturan organoid kültür sistemini geliştirdiler. Araştırmacıların bu konudaki çalışmaları halen devam etmektedir (106-108). Günümüzde dünyanın birçok laboratuvarında farklı tipte organoidler ile gerek kanser gerekse diğer hastalıkların tedavisine yönelik araştırmalar yapılmaktadır (108-110). Organoidlerin sınırsız çoğalma potansiyelleri, biyolojik olarak stabil olmaları ve dondurulabilme kabiliyetleri gibi avantajlarından dolayı bu kültürler kullanışlı bir model sistem olarak kullanılabilir. Ülkemizde de bir ilk niteliğinde olan bu çalışma ile, 3-boyutlu organoid kültür sistemi kurulmuştur. Bu kültür sistemi ile birlikte çeşitli araştırma ve geliştirme çalışmaları için kullanışlı ve birçok avantajı olan bu model sistem laboratuvarımıza kurulmuştur.

İnce bağırsak epiteli diğer memeli dokularına kıyasla kendini yenileme oranı en yüksek olan dokudur. Bu sebeple kök hücre, organogenez ve kanser çalışmaları için iyi bir ortam sağlamaktadır. İnce bağırsak dokusunun *in vitro* olarak laboratuvar ortamında 3-boyutlu kültür ile çoğaltılabilmesi yapılacak çeşitli çalışmalar için muazzam bir materyal ortaya çıkarmıştır. İnce bağırsak kök hücreleri bağırsak kriplerinin tabanında lokalize olup bu kök hücrelerin sürekli bölünmeleri ile değişime uğrayacak öncü hücreler oluşur. Bu hücreler, villus boyunca hareket ederek değişik hücrelere farklılaşmakta ve villusun tepesinde apoptoz mekanizması ile dengede tutulmaktadır. Farklılaşma yeteneğinde olan bu hücreler absorpsiyon yapan enterositler, salgı yapan paneth hücreleri, goblet hücreleri ve

enteroendokrin hücreleri gibi değişik hücrelere farklılaşabilmektedir. İnce bağırsaktaki yetişkin kök hücreler 3-boyutlu bir matriks içerisine ekilerek organın minyatür halini oluşturmaktadır. Organoidler, hücre hatlarına göre epitelin doğal fizyolojik ortamda bulunan haline çok daha yakındır. Çalışmamızda, dokunun normal fizyolojik ortamdaki hali taklit edilerek ve kök hücrelerin bölünebilmesini indükleyebilecek minimum ihtiyaçları karşılanarak kript-villus yapısı kültür ortamında oluşturuldu.

Literatürde farklı araştırmacılar tarafından tek bir kök hücre veya kriptin matrijele gömülmesiyle ince bağırsak organoidlerinin oluşturulduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız besiyeri ortamı literatürde uygulanan besi ortamı ile aynı özellikleri taşımaktadır (37, 53, 54, 66, 77, 84). İzole edilen kriptler tek hücre süspansiyonu haline getirilerek, bu hücre süspansiyonu ile organoidler oluşturulmuştur. Tek hücre süspansiyonu içindeki ince bağırsak kök hücreleri organoidlerin oluşumunu gerçekleştirirken, süspansiyondaki diğer hücreler ise apoptoz benzeri bir mekanizma ile ortadan elimine olmuştur. Yapılan çalışmalarda, kullanılan farelerin yaşları 1-5 ay arasında değişmektedir (53, 111). Çalışmamızda, 3 aylık farelerle organoid oluşturulmaya başlandı ancak bu yetişkin farelerden verimli bir şekilde kript dolayısıyla kök hücre izolasyonu yapılamadı. Genç fareler (yaklaşık 4-6 haftalık) kullanılarak yapılan deneyler de ise kript izolasyonunun dolayısıyla kripti oluşturan hücrelerin tek hücre süspansiyonu haline getirilmesi daha kolay gerçekleştirildi. Bu hücrelerden kurulan organoidlerin hem daha hızlı hem de daha verimli oldukları gözlemlendi.

İnce bağırsak organoidlerinin yanı sıra kolon, pankreas, mesane ve prostat dokularından da organoidler elde edilebildi ve çeşitli araştırmalarda kullanılmaya başlandı (2, 61, 107, 108, 110, 112). Sato ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada, hasta adenom ve karsinomlarından biyopsi yöntemi ile organoidleri oluşturdular (54). Böylece kanserli dokudan elde edilen kanser organoidi ile normal dokudan oluşturulan organoid arasında biyolojik olarak mukayese yapılabilme şansı elde edildi.

Organoidler insan normal doku ve tümör yapısını iyi bir şekilde temsil etmektedir (2). Ancak organoid kültürü için uygulanan terapötik yanıtın etkinliği henüz bilinmemektedir. Araştırma için kullanılan kültür şartları bu terapötik yanıtı etkileyebilir. Çünkü kültür bileşenleri çok sayıda büyüme faktörü ve çeşitli yolakları indükleyen proteinler içermektedir. Bu da kanser hücrelerinin onkogen aktivitesini etkileyebilir. Diğer bir bilinmez ise *in vitro* uygulanan bir terapötik ajanın klinik uygulamasının ne kadar etkili olacağıdır. Bu konular henüz araştırma aşamasındadır.

İnce bağırsak kök hücrelerin paneth hücrelerinin arasında yerleştiği bilinmektedir. Paneth hücreleri kök hücrelerin niş hücreleri (mikroçevre) olarak görev görmektedir. Paneth hücreleri, kök hücrelerin fonksiyonlarını yerine getirebilmelerini sağlayan çeşitli proteinleri ve sinyal yollarını aktive edecek ligandları salgılamaktadır. Yapılan araştırmalarda kök hücre ve paneth hücrelerinin birlikte kültür edilmesi ile oluşan organoid verimliliğinin sadece kök hücreler ile kurulan organoidlerden çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir (39). Bu derece önemli olan Paneth hücrelerinin yüzey markırlarından olan CD24 antikoru ile akım sitometrik analizle organoid sistemindeki popülasyonu gösterilmiştir (39). Biz de çalışmamızda CD24 antikoru ile akım sitometrisinde, paneth hücre popülasyonunun ve anti-lizozim antikoru ile de boyanarak paneth hücrelerinin varlığını ışık mikroskopunda gösterdik. Boyamalarda iki paneth hücrelerinin arasının anti-lizozim antikoru ile boyanmadığı ve bu boyanmayan hücrelerin bağırsak kök hücresi oldukları düşünüldü. CD44 antikoru ile de paneth hücreleri arasında ve +4 pozisyonundaki kök hücre popülasyonu akım sitometrisi ile gösterildi. Ancak tek bir yüzey markırını kullanılarak belirlenen popülasyonun kök hücre ya da öncü hücre olduğu tam olarak belirlenemedi. (37). Çalışmamızda, paneth hücreleri ve kök hücreleri toplayabilecek (sorting) bir akım sitometri cihazımız olmadığından, iki hücre topluluğunun birlikte oluşturacağı organoid verimliliği gösterilemedi.

Bu çalışma ile ülkemizde ilk kez doku laboratuvarımızda fare ince bağırsağı için 3-boyutlu organoid kültür sistemi kuruldu. Bu sistemin kurulması, fare ya da insana ait bir çok dokudan organoidlerin oluşturulabilmesi için alt yapı imkanı sağlayacaktır. Dünyada birçok araştırmacının özellikle kanser çalışmalarına odaklandığı günümüzde bu 3-boyutlu organoid kültürü sistemi ile literatüre önemli katkılar sağlayacağımız kanaatindeyiz.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Organoid kültür sisteminin kurulması ve bu sisteme ait alt yapının oluşturulması amacıyla yapılan bu çalışmada aşağıdaki sonuç ve önerilere varılmıştır.

1. Fare ince bağırsak epitelindeki kriпти oluşturan kök hücreler kullanılarak 3-boyutlu kültür sistemi ile organoid oluşturuldu. Bu 3-boyutlu kültür sistemi ülkemizde ilk defa üniversitemizde kullanıldı.
2. Üç-boyutlu kültür sistemi kullanılarak, gerekli etik kurul onayının alınmasını takiben insan normal ince bağırsak organoid modeli oluşturulabilecektir. Bunu takiben hem fare hem de insan ince bağırsak organoidinin oluşmasını sağlayan kök hücrelerin izolasyonunda kullanılacak farklı markırlar belirlenebilir.
3. Oluşturulan ince bağırsak organoidleri kullanılarak, ince bağırsak sistemini etkileyen hastalıkların etiolojisindeki mekanizmalar ortaya çıkarılabilir.
4. Dünyada birçok araştırmacı 3-boyutlu organoid kültürlerini kullanarak çalışmaya başlamıştır. Ancak halen organoidi yapılmamış birçok doku ve organ tipi mevcuttur. Çalışmamızda kurduğumuz alt yapı ile henüz organoidi oluşturulmamış bir dokuya odaklanıp, bu dokunun ihtiyaç profili belirlenerek organoidlerin oluşturulması ile literatüre önemli katkılar sağlanabilir.
5. Yeni oluşturulacak farklı doku organoidleri için kök hücre markır gen arama çalışmaları planlanabilir. Farklı dokulardan oluşturulmuş organoidlerin ekspresyon profillerini ortaya çıkararak buna benzer markır genler tespit edilebilir
6. Kanserli organoid oluşturmada gerekli etik kurul onay alınarak ilk aşamada farelerde istenilen dokuda kanser oluşturulup, ardından bu dokudan alınacak biyopsi materyallerinden kanserli organoid oluşturulabilir. Yine insan organoidi oluşturmak için gerekli etik izinler alınarak, hastalardan alınacak farklı biyopsi materyallerinden hem normal hem de kanserli organoid oluşturulabilir Bu şekilde, çeşitli anti-kanser ilaç ya da doğal bileşimlerle çalışmalar yapabilme şansı elde edilebilir. Aynı zamanda, çeşitli anti-kanser ilaçları tek tek ya da kombine şekilde organoidlere uygulanarak, bu ilaçların etkinlikleri de test edilebilir.

9. KAYNAKLAR

1. Lin SA, Barker N (2011). Gastrointestinal stem cells in self-renewal and cancer. *J Gastroenterol* 46: 1039-1055.
2. Sachs N, Clevers H (2014). Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* 24: 68-73.
3. Bustos Fernandez L, Obiglio H, De Paula A, Machado E, Cerini C, Poklepovic S, Scutteri R (1961). [Value of the intestinal biopsy in the study of the physiology and histology of the small intestine]. *Rev Med Chil* 89: 933-937.
4. Luiz Carlos Junqueira JC (2009). Basic Histology. Temel Histoloji Text & Atlas. 10 th ed. Çeviren: Solakoğlu S, Aytakin Y. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul
5. Harries JT (1982). Mechanisms and mediators of intestinal secretion in the small intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1: 575-582.
6. Wilson TH (1965). The development of vitamin B12 and amino acid absorption by the small intestine. *Biol Neonat* 9: 62-81.
7. Pearse AG, Riecken EO (1967). Histology and cytochemistry of the cells of the small intestine, in relation to absorption. *Br Med Bull* 23: 217-222.
8. Barker N, van de Wetering M, Clevers H (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22: 1856-1864.
9. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegbarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449: 1003-1007.
10. Peeters TL, Vantrappen GR (1976). Purification and partial characterization of lysozyme from mouse small intestine. *Experientia* 32: 1125-1126.
11. McConnell RE, Higginbotham JN, Shifrin DA, Jr., Tabb DL, Coffey RJ, Tyska MJ (2009). The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J Cell Biol* 185: 1285-1298.
12. Krause WJ, Yamada J, Cutts JH (1989). Enteroendocrine cells in the developing opossum small intestine and colon. *J Anat* 162: 83-96.
13. Simons BD, Clevers H (2011). Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Exp Cell Res* 317: 2719-2724.
14. Radtke F, Clevers H (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307: 1904-1909.
15. Leushacke M, Barker N (2012). *Lgr5* and *Lgr6* as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. *Oncogene* 31: 3009-3022.

16. Sasai Y, Eiraku M, Suga H (2012). In vitro organogenesis in three dimensions: self-organising stem cells. *Development* 139: 4111-4121.
17. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
18. Can A (2014). Kök Hücre Akademisyen Tıp Kitabevi No.5 Ankara, 145-330.
19. Smith AG (1992). Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. *Semin Cell Biol* 3: 385-399.
20. Moore KA, Ema H, Lemischka IR (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* 89: 4337-4347.
21. Chambers I, Smith A (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23: 7150-7160.
22. Smith AG (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 435-462.
23. Wobus AM, Boheler KR (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85: 635-678.
24. Stange DE (2013). Intestinal stem cells. *Dig Dis* 31: 293-298.
25. Carulli AJ, Samuelson LC, Schnell S (2014). Unraveling intestinal stem cell behavior with models of crypt dynamics. *Integrative Biology* 6: 243-257.
26. Potten CS (1977). Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature* 269: 518-521.
27. Kaur P, Potten CS (1986). Circadian variation in migration velocity in small intestinal epithelium. *Cell Tissue Kinet* 19: 591-599.
28. Bjerknes M, Cheng H (1981). The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse. *Am J Anat* 160: 51-63.
29. Lund PK (2012). Fixing the breaks in intestinal stem cells after radiation: a matter of DNA damage and death or DNA repair and regeneration. *Gastroenterology* 143: 1144-1147.
30. Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY, Su N, Luo Y, Heilshorn SC, Amieva MR, Sangiorgi E, Capecchi MR, Kuo CJ (2012). The intestinal stem cell markers *Bmi1* and *Lgr5* identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 466-471.
31. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H (2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; *musashi-1*. *Differentiation* 71: 28-41.

32. Cheng H, Leblond CP (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 141: 537-561.
33. Demidov ON, Timofeev O, Lwin HN, Kek C, Appella E, Bulavin DV (2007). Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell Stem Cell* 1: 180-190.
34. Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T (2003). Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 535: 131-135.
35. Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD, de Sauvage FJ (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478: 255-259.
36. Zhang C, Li C, He F, Cai Y, Yang H (2011). Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 137: 1679-1686.
37. Wang F, Scoville D, He XC, Mahe MM, Box A, Perry JM, Smith NR, Lei NY, Davies PS, Fuller MK, Haug JS, McClain M, Gracz AD, Ding S, Stelzner M, Dunn JC, Magness ST, Wong MH, Martin MG, Helmuth M, Li L (2013). Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay. *Gastroenterology* 145: 383-395 e381-321.
38. Guo W, Frenette PS (2014). Alternative CD44 splicing in intestinal stem cells and tumorigenesis. *Oncogene* 33: 537-538.
39. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469: 415-418.
40. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics* 7: 349-359.
41. Katoh M, Katoh M (2007). Notch signaling in gastrointestinal tract (Review). *International Journal of Oncology* 30: 247-251.
42. Jones L (2001). Stem cells: so what's in a niche? *Curr Biol* 11: R484-486.
43. Li L, Xie T (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 605-631.
44. Migliaccio AR (2013). A niche for every cell, for every function. *Haematologica* 98: 1660-1663.

45. Hsu YC, Fuchs E (2012). A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 103-114.
46. Mustata RC, Van Loy T, Lefort A, Libert F, Strollo S, Vassart G, Garcia MI (2011). Lgr4 is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells *ex vivo*. *EMBO Rep* 12: 558-564.
47. Lengyel JA, Iwaki DD (2002). It takes guts: the *Drosophila* hindgut as a model system for organogenesis. *Dev Biol* 243: 1-19.
48. Li L, Luo LF (2013). [Zebrafish as the model system to study organogenesis and regeneration]. *Yi Chuan* 35: 421-432.
49. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T (1981). Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 211: 1052-1054.
50. Runswick SK, O'Hare MJ, Jones L, Streuli CH, Garrod DR (2001). Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat Cell Biol* 3: 823-830.
51. Ader M, Tanaka EM (2014). Modeling human development in 3D culture. *Curr Opin Cell Biol* 31: 23-28.
52. Schor SL, Allen TD, Harrison CJ (1980). Cell migration through three-dimensional gels of native collagen fibres: collagenolytic activity is not required for the migration of two permanent cell lines. *J Cell Sci* 46: 171-186.
53. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262-265.
54. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, Clevers H (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141: 1762-1772.
55. Jung P, Sato T, Merlos-Suarez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H, Batlle E (2011). Isolation and *in vitro* expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 17: 1225-1227.
56. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457: 608-611.

57. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, van de Wetering M, Clevers H (2012). Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337: 730-735.
58. Chua CW, Shibata M, Lei M, Toivanen R, Barlow LJ, Bergren SK, Badani KK, McKiernan JM, Benson MC, Hibshoosh H, Shen MM (2014). Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol* 16: 951-961.
59. Huch M, Boj SF, Clevers H (2013). Lgr5(+) liver stem cells, hepatic organoids and regenerative medicine. *Regen Med* 8: 385-387.
60. Humphries A, Cereser B, Gay LJ, Miller DS, Das B, Gutteridge A, Elia G, Nye E, Jeffery R, Poulsom R, Novelli MR, Rodriguez-Justo M, McDonald SA, Wright NA, Graham TA (2013). Lineage tracing reveals multipotent stem cells maintain human adenomas and the pattern of clonal expansion in tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2490-2499.
61. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK, Wongvipat J, Kossai M, Ramazanoglu S, Barboza LP, Di W, Cao Z, Zhang QF, Sirota I, Ran L, MacDonald TY, Beltran H, Mosquera JM, Touijer KA, Scardino PT, Laudone VP, Curtis KR, Rathkopf DE, Morris MJ, Danila DC, Slovin SF, Solomon SB, Eastham JA, Chi P, Carver B, Rubin MA, Scher HI, Clevers H, Sawyers CL, Chen Y (2014). Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 159: 176-187.
62. Leighton J (1997). Human mammary cancer cell lines and other epithelial cells cultured as organoid tissue in lenticular pouches of reinforced collagen membranes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33: 783-790.
63. Kamb A (2005). What's wrong with our cancer models? *Nat Rev Drug Discov* 4: 161-165.
64. Maqsood MI, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM (2013). Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biol Int* 37: 1038-1045.
65. Reddel RR (2000). The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 477-484.
66. Grabinger T, Luks L, Kostadinova F, Zimmerlin C, Medema JP, Leist M, Brunner T (2014). Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy. *Cell Death Dis* 5: e1228.

67. Allen DD, Caviedes R, Cardenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA (2005). Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm* 31: 757-768.
68. Arrondeau J, Gan HK, Razak AR, Paoletti X, Le Tourneau C (2010). Development of anti-cancer drugs. *Discov Med* 10: 355-362.
69. Hait WN (2010). Anticancer drug development: the grand challenges. *Nat Rev Drug Discov* 9: 253-254.
70. Kola I (2008). The state of innovation in drug development. *Clin Pharmacol Ther* 83: 227-230.
71. Bhadriraju K, Chen CS (2002). Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discov Today* 7: 612-620.
72. Bissell MJ, Rizki A, Mian IS (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* 15: 753-762.
73. Schmeichel KL, Bissell MJ (2003). Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 116: 2377-2388.
74. Breslin S, O'Driscoll L (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 18: 240-249.
75. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63: 11-30.
76. Cheon DJ, Orsulic S (2011). Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol* 6: 95-119.
77. Finkbeiner SR, Freeman JJ, Wieck MM, El-Nachef W, Altheim CH, Tsai YH, Huang S, Dyal R, White ES, Grikscheit TC, Teitelbaum DH, Spence JR (2015). Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids. *Biol Open* 4: 1462-1472.
78. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21: 6188-6193.
79. Kleinman HK, Martin GR (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15: 378-386.
80. Vukicevic S, Somogyi L, Martinovic I, Zic R, Kleinman HK, Marusic M (1992). Reconstituted basement membrane (Matrigel) promotes the survival and influences the growth of murine tumors. *Int J Cancer* 50: 791-795.
81. Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH (1992). Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel

suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 202: 1-8.

82. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25: 312-318.
83. McGuire PG, Seeds NW (1989). The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J Cell Biochem* 40: 215-227.
84. Sato T, Clevers H (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 340: 1190-1194.
85. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262-U147.
86. Korinek V, Barker N, Willert K, Molenaar M, Roose J, Wagenaar G, Markman M, Lamers W, Destree O, Clevers H (1998). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* 18: 1248-1256.
87. Farin HF, Van Es JH, Clevers H (2012). Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology* 143: 1518-1529 e1517.
88. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* 7: 525-534.
89. Purow B (2012). Notch Inhibition as a Promising New Approach to Cancer Therapy. *Notch Signaling in Embryology and Cancer* 727: 305-319.
90. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435: 959-963.
91. Pellegrinet L, Rodilla V, Liu Z, Chen S, Koch U, Espinosa L, Kaestner KH, Kopan R, Lewis J, Radtke F (2011). Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology* 140: 1230-1240 e1231-1237.
92. van Es JH, Sato T, van de Wetering M, Lyubimova A, Nee ANY, Gregorieff A, Sasaki N, Zeinstra L, van den Born M, Korving J, Martens ACM, Barker N, van Oudenaarden

- A,Clevers H (2012). Dll1(+) secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nature Cell Biology* 14: 1099-+.
93. Wong VW, Stange DE, Page ME, Buczacki S, Wabik A, Itami S, van de Wetering M, Poulsom R, Wright NA, Trotter MW, Watt FM, Winton DJ, Clevers H, Jensen KB (2012). Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nature Cell Biology* 14: 401-408.
 94. Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303: 1684-1686.
 95. Nalini N, Chitra S, Sabitha K, Viswanathan P, Menon VP (1996). Effect of *Cocos nucifera* and red chilli on intestinal b-glucuronidase and mucinase activity in experimental colon cancer. *Asia Pac J Clin Nutr* 5: 96-99.
 96. Carson FL, Kingsley WB, Race GJ (1970). Drierite as a dehydrant, indicator, and marker for paraffin embedded tissues. *Am J Med Technol* 36: 283-284.
 97. Villas BH (1998). Flow cytometry: an overview. *Cell Vis* 5: 56-61.
 98. Dunphy CH (2004). Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* 128: 1004-1022.
 99. Karaboz I, Kayar E, Akar S (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi.
 100. Radcliff G, Jaroszeski MJ (1998). Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol* 91: 1-24.
 101. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Jove- Journal of Visualized Experiments*.
 102. Schacht V, Kern JS (2015). Basics of immunohistochemistry. *J Invest Dermatol* 135: e30.
 103. Gracz AD, Fuller MK, Wang F, Li L, Stelzner M, Dunn JC, Martin MG, Magness ST (2013). Brief report: CD24 and CD44 mark human intestinal epithelial cell populations with characteristics of active and facultative stem cells. *Stem Cells* 31: 2024-2030.
 104. Osborne CK, Hobbs K, Clark GM (1985). Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 45: 584-590.
 105. Unger C, Kramer N, Walzl A, Scherzer M, Hengstschlager M, Dolznig H (2014). Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 79-80: 50-67.

106. Koo BK, Stange DE, Sato T, Karthaus W, Farin HF, Huch M, van Es JH, Clevers H (2012). Controlled gene expression in primary Lgr5 organoid cultures. *Nat Methods* 9: 81-83.
107. Bartfeld S, Clevers H (2015). Organoids as Model for Infectious Diseases: Culture of Human and Murine Stomach Organoids and Microinjection of Helicobacter Pylori. *J Vis Exp*.
108. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio, II, Engle DD, Corbo V, Jager M, Ponz-Sarvisé M, Tiriác H, Spector MS, Gracanin A, Oni T, Yu KH, van Boxtel R, Huch M, Rivera KD, Wilson JP, Feigin ME, Ohlund D, Handly-Santana A, Ardito-Abraham CM, Ludwig M, Elyada E, Alagesan B, Biffi G, Yordanov GN, Delcuze B, Creighton B, Wright K, Park Y, Morsink FH, Molenaar IQ, Borel Rinkes IH, Cuppen E, Hao Y, Jin Y, Nijman IJ, Iacobuzio-Donahue C, Leach SD, Pappin DJ, Hammell M, Klimstra DS, Basturk O, Hruban RH, Offerhaus GJ, Vries RG, Clevers H, Tuveson DA (2015). Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 160: 324-338.
109. Leite SB, Roosens T, El Taghdouini A, Mannaerts I, Smout AJ, Najimi M, Sokal E, Noor F, Chesne C, van Grunsven LA (2015). Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials* 78: 1-10.
110. Astashkina AI, Mann BK, Prestwich GD, Grainger DW (2012). A 3-D organoid kidney culture model engineered for high-throughput nephrotoxicity assays. *Biomaterials* 33: 4700-4711.
111. Wang Y, Ahmad AA, Sims CE, Magness ST, Allbritton NL (2014). In vitro generation of colonic epithelium from primary cells guided by microstructures. *Lab Chip* 14: 1622-1631.
112. Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, Brandsma AM, de Jong NW, Bijvelds MJ, Scholte BJ, Nieuwenhuis EE, van den Brink S, Clevers H, van der Ent CK, Middendorp S, Beekman JM (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* 19: 939-945.

10. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

Sayı: 53488718 - 628
Konu:

Tarih:19/11/2014

Sayın: Prof.Dr.Figen CELEP EYÜPOĞLU
Tıbbi Biyoloji ABD.

“Fare İnce Bağırsak Kriptlerinden Elde Edilen Hücrelerden 3-Boyutlu Kültür ile Organoid Oluşturulması” başlıklı 2014/52 protokol no.lu tez çalışması incelenmiş olup bilimsel ve etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Etem ALHAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı


Ek: 1 adet onay belgesi

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı : “Fare İnce Bağırsak Kriptlerinden Elde Edilen Hücrelerden 3-Boyutlu Kültür ile Organoid Oluşturulması”			
Çalışmacılar : Prof.Dr.Figen CELEP EYÜPOĞLU, Yük.Lis.Öğr.İdris ER, Arş.Gör.Ceren SÜMER			
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji			
Etik Kurul Dosya No 2014/ 52	Etik Kurul Toplantı Tarihi 18/11/2014	Etik Kurul Toplantı No 2014/18	Etik Kurul Karar No 4
<p>Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu’nda Prof.Dr.Etem ALHAN’ın başkanlığında toplanıp; “Fare İnce Bağırsak Kriptlerinden Elde Edilen Hücrelerden 3-Boyutlu Kültür ile Organoid Oluşturulması” başlığım taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi’nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (18.11.2014)</p> <p style="text-align: center;">Prof. Dr. Etem ALHAN Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı</p> 			

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : ER, İdris
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01/04/1986, Küre
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0462 377 7957
E-Posta : idriser@yahoo.com
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AbD 61080 TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AbD	Halen
Lisans	: KTÜ- Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü	2010
Lise	: Hasan-Sabriye Gümüş Anadolu Lisesi	2004

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
1. Erasmus Staj Hareketliliği	Hollanda-Hubrecht Enstitüsü	2013
2. Araştırma Görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2015-

YABANCI DİL

İngilizce