

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ PROGRAMI**

**İKİ VE ÜÇ BOYUTLU GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE (U-87 MG, T98G) KABAZİTAKSEL'İN
HÜCRESEL ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMALI ANALİZİ**

Özge ÖZER

**Danışman
Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU**



MANİSA-2015

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ PROGRAMI**

**İKİ VE ÜÇ BOYUTLU GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE (U-87 MG, T98G) KABAZİTAKSEL'İN
HÜCRESEL ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMALI ANALİZİ**

Özge ÖZER

**Danışman
Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU**



MANİSA-2015

**Özge
ÖZER**

**İKİ VE ÜÇ BOYUTLU GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE (U-87 MG, T98G) KABAZİTAKSEL'İN HÜCRESEL
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMALI ANALİZİ**

2015

TEZ ONAYI

Özge ÖZER tarafından hazırlanan " **İki Ve Üç Boyutlu Glioblastoma Multiforme Hücre Kültürlerinde (U-87 MG, T98G) Kabazitaksel'in Hücresel Etkilerinin Karşılaştırılmalı Analizi**"adlı tez çalışması 03.12.2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU**

Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Erdal BALCAN**

Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Fatma Zuhale EROĞLU**

Ege Üniversitesi

Enstitü Müdürü **Prof.Dr. Kenan DOST**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Özge ÖZER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLO DİZİNİ	VIII
TEŞEKKÜR.....	IX
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Boyutun Tanımı.....	3
2.2. <i>In Vitro</i> Sitotoksosite Araştırmalarında İki Boyutlu ve Üç Boyutlu Hücre Kültürü.....	5
2.3. Üç Boyutlu Hücre Kültürü ile Yapılabilen Araştırmalar	8
2.4. Glioblastoma Hücre Serilerinin Önemi	9
2.4.1. Glioblastoma	9
2.4.2. Glioblastoma Mikroçevresi	10
2.4.3. Yaygın Kullanılan Glioblastoma Hücre Serileri	12
2.5. Hücre Döngüsü ve Düzenleyici Moleküller	13
2.5.1. Hücre Döngüsü.....	13
2.5.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	14
2.5.3. Hücre Döngüsü Evrelerinin Analizi	17
2.6. Kabazitaksel'in Hücre Döngüsüne Etkileri	17
2.7. Sitotoksosite ve Hücre Ölüm Tipleri.....	20
2.7.1. Apoptozis.....	22
2.7.1.1. Anneksin V.....	25
2.7.2. Nekroz	26
2.8. Kabazitaksel ile Yapılmış Literatür Çalışmaları	27
2.9. Bu Tez Çalışmasında Araştırılan Hipotezler	29
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. Hücre Hatlarının Temini, Çoğaltımı ve İdamesi	30
3.2.2. Canlı ve Ölü Hücrelerin Sayım Yöntemi.....	32
3.2.3. Hücre Serilerinin İkilenme Sürelerinin Hesaplanması	33
3.2.4. Kabazitaksel'in Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	34
3.2.5. Üç boyutlu (3B) Hücre Kültürünün GBM Hücreleri İçin Optimizasyonu	34
3.2.6. İki Boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürlerine Kabazitaksel Uygulaması	35
3.2.7. Sitotoksosite Yüzdelerinin Hesaplanması	36
3.2.8. Faz-Kontrast Mikroskopunda Kabazitaksel ile Muamele Edilmiş Hücrelerin Morfolojik İncelenmesi	37
3.2.9. Hücre Döngüsü Evrelerinin Muse Hücre Analiz Cihazında Belirlenmesi	38

3.2.10. Muse® Annexin V & Dead Cell Kitiyle Canlı ve Ölü Hücrelerin Evrenmesi	39
3.2.11. İstatistiksel Analiz	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	42
4.1. Bulgular.....	42
4.1.1. Hücre Serilerinin İkenme Sürelerinin Hesaplanması.....	42
4.1.2. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürünün GBM Hücreleri İçin Optimizasyonu	42
4.1.3. İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) GBM Hücre Kültürlerinde Kabazitaksel'in Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması.....	43
4.1.3.1. İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) T98G Hücre Kültürlerinde Kabazitaksel'in Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması.....	43
4.1.3.2. İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) U-87 MG Hücre Kültürlerinde Kabazitaksel'in Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	44
4.1.4. İki boyutlu (2B) Kültürleri Yapılan T98G ve U-87 MG Hücre Serilerinde 10^{-5} ve 10^{-4} M Kabazitaksel Uygulamasında Gözlenen Etkinin Araştırılması.....	51
4.1.5. İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) Kültürleri Yapılan T98G ve U-87 MG Hücre Serilerinde Kabazitaksel Aracılı Sitotoksositeye Bağlı Değişikliklerin Faz-Kontrast Mikroskopunda Görüntülenmesi.....	54
4.1.6. Kabazitaksel ile Muamele Edilmiş T98G ve U-87 MG Hücre Serilerinin İki Boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) Kültürlerinde Hücre Döngüsü Evrelerinin Karşılaştırılmalı Analizi.....	56
4.1.7. Kabazitaksel ile Muamele Edilmiş T98G ve U-87 MG Hücre Serilerinin İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) Kültürlerinde Apoptozisin Karşılaştırılmalı Analizi	59
4.2. Tartışma.....	63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

7-AAD	7-Aminoaktinomisin D
AGII	Astrojitoma Grade II
AGIII	Astrojitoma Grade III
AIF	Apoptosis-Inducing Factor (Apoptozis indükleyici faktör)
AKT	V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog
ANOVA	Analysis of Variance (Varyans analizi)
Apaf-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 (Apototik peptidaz aktive edici faktör 1)
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein
Bad	Bcl-2-Associated Agonist Of Cell Death (Bcl-2 ilişkili hücre ölüm agonisti)
Bak	Bcl-2-Antagonist/Killer (Bcl-2 antagonisti)
Bax	Bcl-2-Associated X Protein (Bcl-2 ilişkili X proteini)
Bcl-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist (BH3'le etkileşen domain ölüm agonisti)
Bik	Bcl-2-Interacting Killer (Apoptosis-Inducing) (Bcl-2 etkileşimli apoptozis tetikleyen hücre ölüm proteini)
Bok	Bcl-2-Related Ovarian Killer (Bcl-2 ilişkili ovaryum hücresi ölüm proteini)
BrdU	Bromodeoxyuridine (Bromodeoksiüridin)
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate (Siklik adenzin monofosfat)
CDC25A	Cell Division Cycle 25A (Hücre bölünme döngüsü 25A)
CDK	Cyclin- Dependent Kinase (Siklin bağımlı kinaz)
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate (Siklik guanozin monofosfat)
Chk	Checkpoint Kinase (Kontrol noktası kinazı)
CKI	Cyclin- Dependent Kinase Inhibitor (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü)
CTX	Cabazitaxel (Kabazitaksel)

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTX	Docetaxel (Dosetaksel)
ECM	Extra Cellular Matrix (Ekstrasellüler matriks)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Epidermal çoğalma faktörü reseptörü)
EndoG	Endonükleaz G
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal sığır serumu)
FDA	Food and Drug Administration US (Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu)
GBM	Glioblastoma (Glioblastoma Multiforme)
GDP	Guanosine Diphosphate
GTP	Guanosine Triphosphate
IAP	Inhibitor Of Apoptosis (Apoptozis inhibitörü)
IDH1	Izositrat dehidrogenaz 1
LC3	Light Chain 3 (Hafif zincir 3)
LDH	Laktatdehidrogenaz
MAPs	Microtubul Associated Proteins (Mikrotübül ilişkili proteinler)
MDM2	Mouse Double Minute 2
MDR1	Multi-Drug Resistance Gene 1 (Çoklu ilaç direnci geni 1)
MEM	Minimum Essential Medium
MTOC	Microtubul-Organising Center (Mikrotübül organize edici merkez)
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat Buffer Salin)
PI	Propidyum İyodid
PS	Phosphatidil Serine (Fosfatidilserin)
P-gp	P-glikoprotein
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog (Fosfataz ve tensin homologu)
PTX	Paclitaxel (Paklitaksel)
p16INK4	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (Siklin bağımlı kinaz inhibitör geni)

p19INK4d	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (Siklin bağımlı kinaz inhibitör geni)
p21	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (CDKN1A , Cip1) (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A)
RB	Retinablastoma
RIPK1	Receptor (TNFRSF)-Interacting Serine-Threonine Kinase 1 (Reseptör etkileşimli serin/threonin protein kinaz 1)
RNase A	Ribonuclease A (Ribonükleaz A)
RPM	Revolutions Per Minute (Dakikadaki dönüş sayısı)
SD	Standard Deviation (Standart sapma)
TdT	Terminal Deoksinukleotidil transferaz
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR1	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1
TLR	Toll-Like Receptor (Toll benzeri reseptör)
TP53	Tumor Protein P53
TUNEL	TdT dUTP (deoxyuridine-triphosphatase) nick end labeling.
WEE1	G2 Checkpoint Kinase (G2 kontrol noktası kinazı)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 İki boyutlu (2B) kültürlerde hücreler polarizasyon kaybı nedeniyle organizasyon oluşturma özelliklerini kaybederler. Üç boyutlu (3B) kültürlerde ise hücreler <i>in vivo</i> benzeri polarizasyon oluşturarak organize bir şekilde doku oluşumuna giderler	4
Şekil 2.2 Hücrelerin davranışlarını ve dokunun dinamik durumunu etkileyen kimyasal, fiziksel ve topolojik faktörler	5
Şekil 2.3 İki boyutludan (2B), üç boyutlu (3B) kültürlere geçildiğinde artan veriye bağlı oluşan karmaşıklık düzeyi <i>in vivo</i> ya daha çok benzerdir.....	8
Şekil 2.4 İki boyutlu (2B, monolayer) kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre serilerinin kristal viyole ile boyandıktan sonra faz-kontrast mikroskopunda 40X büyütmede çekilen görüntüleri.....	12
Şekil 2.5 Hücre döngüsü evreleri.....	15
Şekil 2.6 Hücre döngüsünde etkileşen moleküller.....	16
Şekil 2.7 Kabazitaksel'in (CTX C ₄₅ H ₅₇ NO ₁₄) Dosetaksel'den (DTX, C ₄₃ H ₅₃ NO ₁₄) önemli bir farkı DTX'te bulunan iki hidroksil grubunun metil grupları ile yer değiştirmesidir.....	19
Şekil 2.8 Taksan grubu ajanlar tübülünün polimerizasyon ve depolimerizasyon dinamiğini bozarak polimerizasyonu stabil hale getirir.....	20
Şekil 2.9 Dış yoldan tetiklenen apoptotik makineyi oluşturan moleküllerin akış diyagramı.....	23
Şekil 2.10 İç (mitokondriyal) yoldan tetiklenen apoptotik makineyi oluşturan moleküllerin akış diyagramı.....	24
Şekil 2.11 Hücrelerin apoptozise gittiğinin bir göstergesi hücre membranının sitoplazmaya bakan kısmında yer alan Fosfatidil Serinin (PS) ekstrasellüler bölgeye göç etmesidir. Bu değişim apoptotik hücrelerde Anneksin V'in Ca ²⁺ bağımlı olarak PS'ye bağlanmasıyla gözlenebilir.....	26
Şekil 3.1 Hücre kültürünün yapıldığı steril kabin (laminar flow hood).....	31
Şekil 3.2 A. Hücrelerin inverted mikroskopta görüntülenmesi. B. Tripan mavisi ile boyanmış hücre süspansiyon örneğinin hücre sayım lamına aktarılması. C. Hücre sayım cihazı.	33
Şekil 3.3 Asılı damla plakasında üç boyutlu sferoid oluşum şeması.....	35
Şekil 3.4 XTT test sonuçlarının çok modlu plaka okuyucuda ölçümü.....	37
Şekil 3.5 Faz kontrast mikroskopunda hücrelerin ve sferoidlerin görüntülenmesi	38
Şekil 3.6 Muse Hücre Analiz Cihazı.....	40
Şekil 4.1 GBM (T98G ve U-87 MG) hücre kültürlerinin çoğalma eğrileri.....	42
Şekil 4.2 GBM (T98G ve U-87 MG) hücre serilerinin üç boyutlu (3B) kültürlerinde başlangıç canlı hücre sayılarının optimizasyon grafiği.	43
Şekil 4.3 İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde 10 ⁻⁸ ve 10 ⁻⁷ M Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilen T98G ve U-87 MG hücre serilerinin sitotoksitelerinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.4 İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde 10 ⁻⁶ ve 10 ⁻⁵ M Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilen T98G ve U-87 MG hücre serilerinin sitotoksitelerinin karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.5 İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde 10 ⁻⁴ M	

Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilen T98G ve U-87 MG hücre serilerinin sitotoksitelerinin karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.6 Kabazitaksel'in (CTX) iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) T98G hücre kültürlerinde IC ₅₀ değerlerinin 3D Surface Plot grafiğiyle karşılaştırılması	49
Şekil 4.7 Kabazitaksel'in (CTX) iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) U-87 MG hücre kültürlerinde IC ₅₀ değerlerinin 3D Surface Plot grafiğiyle karşılaştırılması	50
Şekil 4.8 T98G ve U-87 MG hücre serilerinin iki boyutlu (2B) kültürlerinde Kabazitaksel'in (CTX) 10-100 µM konsantrasyon aralığındaki sitotoksik etkisi	53
Şekil 4.9 Kabazitaksel'in (CTX) IC ₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) T98G hücre kültürlerinin morfolojik olarak karşılaştırılması	55
Şekil 4.10 Kabazitaksel'in (CTX) IC ₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) U-87 MG hücre kültürlerinin morfolojik olarak karşılaştırılması	56
Şekil 4.11 Kabazitaksel'in (CTX) IC ₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) T98G hücre kültürlerinde hücre döngüsü evrelerinin karşılaştırılmalı analizi.....	58
Şekil 4.12 Kabazitaksel'in (CTX) IC ₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) U-87 MG hücre kültürlerinde hücre döngüsü evrelerinin karşılaştırılmalı analizi.....	59
Şekil 4.13 İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde Kabazitaksel'in (CTX) IC ₅₀ konsantrasyonu (2B IC ₅₀ : 1 µM, 3B IC ₅₀ : 13.98 µM) muamele edilen T98G hücrelerinin apoptotik evrelerinin karşılaştırılması	61
Şekil 4.14 İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde Kabazitaksel'in (CTX) IC ₅₀ konsantrasyonu (2B IC ₅₀ : 9.825 µM, 3B IC ₅₀ : 92.4 µM) muamele edilen U-87 MG hücrelerinin apoptotik evrelerinin karşılaştırılması	62

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürü modellerinin karşılaştırılması.	7
Tablo 2.2 Apoptotik hücrelerin evrenmesinde Anneksin V ve 7-AAD belirteçleri.	26
Tablo 4.1 İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültürleri yapılan ve Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilen GBM (T98G ve U-87 MG) hücrelerinin % sitotoksiteleri (% S).....	45
Tablo 4.2 Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilmiş iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) T98G ve U-87 MG hücre serilerinin IC ₅₀ değerleri	48
Tablo 4.3 Kabazitaksel (CTX, 10 - 100 µM) ile muamele edilen T98G ve U 87 MG hücre serilerinin iki boyutlu (2B) hücre kültürlerinde % sitotoksiteleri (% S).	52
Tablo 4.4 Kabazitaksel'in (CTX) IC ₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre serilerinin hücre döngüsü evrelerine ait yüzdelerin karşılaştırılması.....	57
Tablo 4.5 Kabazitaksel'in (CTX) IC ₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre serilerinin canlılık ve apoptotik yüzdelerinin karşılaştırılması	60

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca eşsiz bilgi birikimi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, araştırmayı ve sorgulamayı öğreten değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU'na; bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için gerekli laboratuvar imkanlarını (Ege Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı) kullanmama izin veren ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Rüçhan USLU ve Sayın Doç. Dr. Şaziye Burçak KARACA'ya; deneyler sırasında Muse Hücre Analiz Cihazı konusunda her türlü imkan ve desteği sağlayan Sayın Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM ve Ar. Gör. Eda AÇIKGÖZ'e; bu yolda ilerlememi sağlayan, bilgi birikimleriyle yardım eden ve her zaman destekleyen ekip arkadaşlarım Doktora Öğrencisi Aslı KISIM ve Doktora Öğrencisi Emir BOZKURT'a; desteklerini her zaman hissettiğim Ar. Gör. Eren Can AYBEK ve ekip arkadaşım Yüksek Lisans Öğrencisi Ezgi ERSÖZ'e; bu çalışmada gereken finansal desteği 15-TIP-37 nolu projeye sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğüne; 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine; tüm yaşamım boyunca bana maddi ve manevi destek olan annem Tülay ÖZER, babam Vahap Latif ÖZER ve ablam Bade ÖZER ŞAHİN'e sonsuz teşekkürler. Sizler olmadan bu çalışma var olamazdı.

Özge ÖZER
Manisa, 2015

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İKİ VE ÜÇ BOYUTLU GLİOBLASTOMA MULTIFORME HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE (U-87 MG, T98G) KABAZİTAKSEL'İN HÜCRESEL ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMALI ANALİZİ

Özge ÖZER

Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU

Üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde elde edilen ilaçlara ait IC₅₀ değerlerinin iki boyutlu (2B) kültürlerle göre *in vivo*'ya benzerliğinin daha yüksek olduğuna dair uzlaşma vardır.

Bu tez çalışmasının amacı 2B ve 3B kültürleri yapılan glioblastoma (GBM) hücre serilerinde (U-87 MG, T98G) Kabazitaksel (CTX) ilacının sitotoksik, apoptotik ve hücre döngüsü evrelerine etkisini karşılaştırılmalı olarak ortaya koymaktır.

3B (sferoid) hücre kültürlerini oluşturmak için asılı damla yöntemi kullanıldı. CTX'in 2B ve 3B kültürlerde hücre canlılığına etkisi XTT yöntemi ile ölçüldü ve buradan elde edilen verilerle sitotoksik etkisi hesaplandı. Hücre döngüsü ve apoptozis evrelemesi için Muse Hücre Analiz cihazıyla uyumlu testler kullanıldı.

CTX'in hücre kültürlerine ait hesaplanan IC₅₀ değerleri sırasıyla 1 µM (2B T98G 48 Saat), 13.98 µM (3B T98G 72 Saat), 9.825 µM (2B U-87 MG 72 Saat), 92.4 µM (3B U-87 MG 96 Saat). CTX'in hücre döngüsünü 2B kültürlerde G2/M evresinde, 3B kültürlerde ise G0/G1 evresinde durdurduğu saptanmıştır. Hücrelerde CTX aracılı erken ve geç apoptotik hücrelerin yüzdeleri 42.75 (2B T98G), 45.56 (3B T98G), 44.36 (2B U-87MG), 27.07 (3B U-87 MG) olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında CTX'in hücresel etkilerinin 2B ve 3B GBM kültürlerinde farklılaştığı ilk defa gösterildi. Bu çalışmanın bulguları ışığında yapılacak *in vitro* sitotoksikite çalışmalarının, verilerin *in vivo*'ya benzerliği açısından sadece 2B değil aynı zamanda 3B kültürler ile birlikte yapılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Üç boyutlu (3B) hücre kültürü, Glioblastoma, Kabazitaksel, Sitotoksikite, Hücre döngüsü, Apoptozis.

2015, 79 Sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

COMPARATIVE ANALYSIS OF CABAZITAXEL'S CELLULAR EFFECTS ON TWO- AND THREE-DIMENSIONAL GLIOBLASTOMA MULTIFORME (U-87 MG, T98G) CELL CULTURES

Ozge OZER

Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Selim UZUNOGLU

There is a common idea about IC_{50} values of drugs obtained from three dimensional (3D) cell cultures are more *in vivo*-like than from two dimensional (2D) cell cultures.

The objective of this thesis was to investigate and compare the effects of Cabazitaxel (CTX) on cytotoxicity, apoptosis and cell cycle in glioblastoma cell lines [GBM (T98G and U-87MG)] cultured as 2D and 3D.

Hanging-drop technique was performed for the formation of 3D (sferoid) cell cultures. Effect of CTX on cell viability was evaluated by using XTT assay and the data obtained from the assay was used for calculating cytotoxicity. The tests which are compatible with Muse Cell Analyzer were used for cell cycle and apoptosis analyzes.

IC_{50} values of CTX were calculated as $1\mu\text{M}$ (2D T98G, 48 hours), $13.98\mu\text{M}$ (3D T98G, 72 hours), $9.825\mu\text{M}$ (2D U-87MG, 72 hours), $92.4\mu\text{M}$ (3D U-87MG, 96 hours). It was determined that CTX arrested cell cycle at G2/M phase for 2D cultures and G0/G1 phase for 3D cultures. CTX-mediated early and late apoptotic cell percentages were determined as 42.75 (2D T98G), 45.56 (3D T98G), 44.36 (2D U-87MG), 27.07 (3D U-87 MG).

In this study, it has shown for the first time that cellular effects of CTX differentiate in 2D and 3D GBM cultures. It is suggested in the light of this study's findings that *in vitro* cytotoxicity studies should perform with not only 2D cell cultures but also with 3D cell cultures for obtaining data *in vivo*-like.

Key words: Three-dimensional (3D) cell culture, Glioblastoma, Cabazitaxel, Cytotoxicity, Cell cycle, Apoptosis.

2015, 79 Pages

1. GİRİŞ

Bilimsel bir problemi çözmeye kullanılan iki temel yaklaşımdan biri tüme varımdır. Bu yöntemde modelleme ve örnekleme veri toplamanın öncül basamaklarını oluşturur. Model organizma ve/veya örneklemeden elde edilen ön bulgular (*in vitro*) ekstrapolasyonla bütüne, yani daha karmaşık organizmalara (*in vivo*) uyarlanır. Bu bilimsel metodolojide en çok tartışılan konulardan biri *in vitro* bulguların *in vivo*ya ne ölçüde uyarlanabileceğidir. Kanser alanında ilaç geliştirme araştırmalarında en çok kullanılan öncül veri toplama model sistemi hücre kültürüdür. Hücre kültürü uzun yıllardır laboratuvar koşullarında iki boyutlu (monolayer) olarak yapılmaktadır. Dolayısıyla *in vitro* hücre kültürlerinde etkileri araştırılan potansiyel anti-kanser ajanların sitotoksik etkilerinin *in vivo*ya ne ölçüde benzer olduğu hala devam eden bir tartışmadır.

90'lı yılların başlarından itibaren hücreler üç boyutlu (sferoid) kültür ortamlarında çoğaltılarak bu soruna çözüm olabilecek yöntemler geliştirilmeye başlandı. Sferoid yapıdaki hücre topluluğunda hücrelerarası etkileşimin ve ekstrasellüler matriksin monolayer formdaki hücrelere göre daha karmaşık ve *in vivo*ya daha benzer olduğu konusunda genel bir anlayış ortaya çıktı. Son yıllarda giderek artan sayıda çalışmada *in vitro* sitotoksikite deneylerinin hem iki hem de üç boyutlu kültür ortamlarında karşılaştırmalı olarak yapılması ekstrapolasyon işleminin daha verimli yapılabilmesini sağladı. Bu sayede, bilhassa kanser tedavisi için potansiyel ilaçların araştırılması sürecinde başlangıç model sistemi olarak kullanılan *in vitro* hücre kültürlerinde yapılan sitotoksik araştırmaların üç boyutlu kültür ortamlarında da yapılmasının önemi anlaşıldı. Bu tez çalışmasında kanser türleri içerisinde invazyonu ve tedaviye direnci çok hızlı gelişen glioblastoma multiforme (glioblastoma, GBM) kanser hücre hatlarının (T98G, U-87 MG) hem iki boyutlu hem de üç boyutlu (gliomasfer) kültür ortamlarında çoğaltıldı ve optimize edildi. GBM gelişiminde en önemli etken hücrelerin mikroçevresindeki ekstrasellüler matriks moleküllerinin (özellikle hyaluronik asit) miktarlarındaki değişim olması nedeniyle *in vitro* olarak iki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültürü modelinde sitotoksik araştırma yapmak önem kazanmaktadır. Bu tez çalışmasında her iki hücre kültürü modeli üzerinde taksan grubu ilaçlardan biri olan,

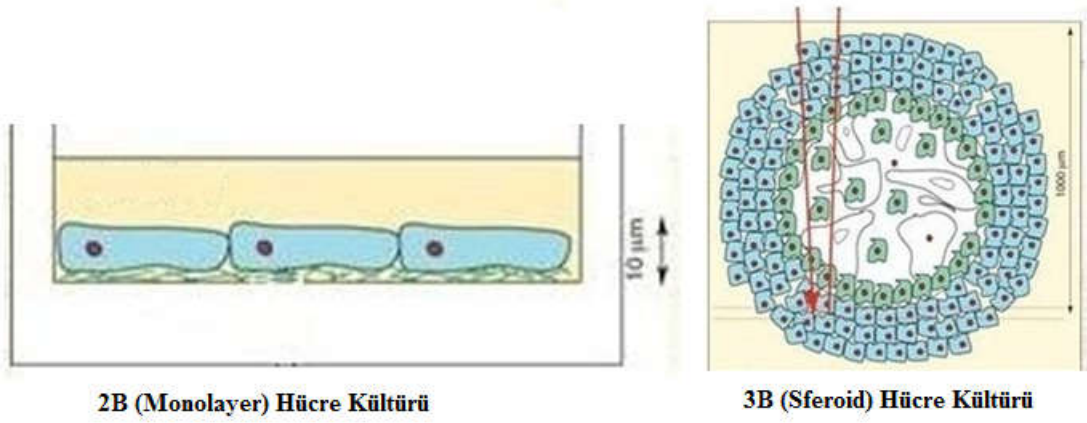
kan-beyin bariyerinden geçebilen Kabazitaksel ilacının hücresel etkilerinin karşılaştırılması olarak araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

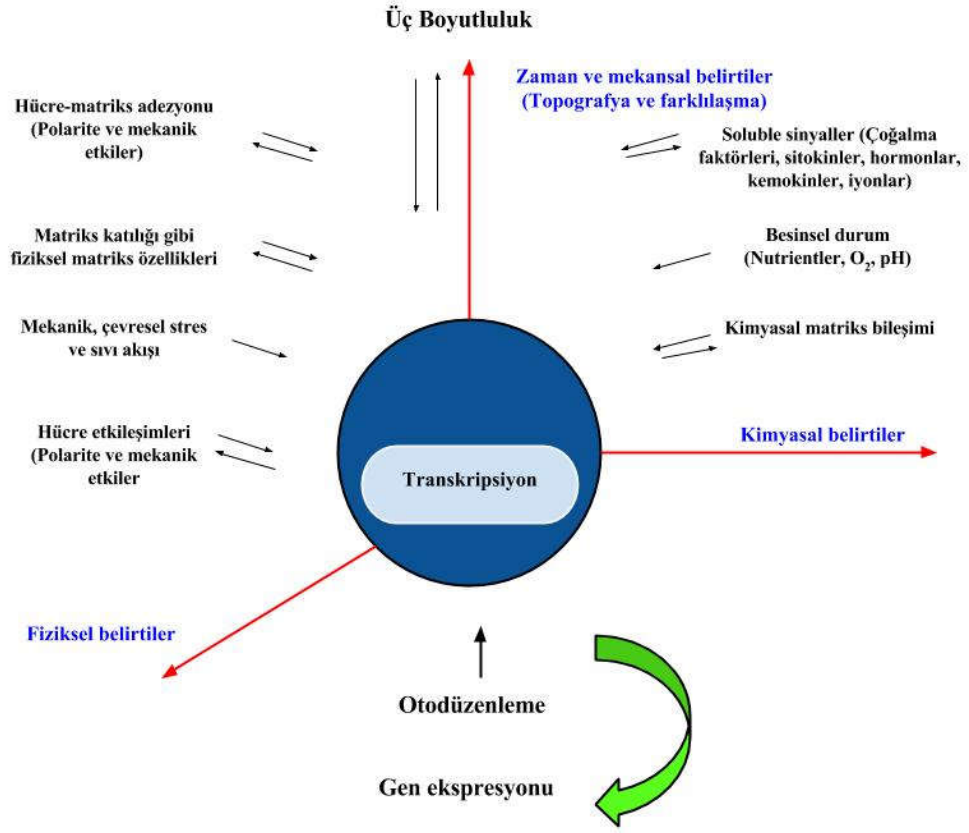
2.1. Boyutun Tanımı

Boyut, sözlük anlamı olarak bir nesnenin (veya uzayın) onu tanımlayan özelliklerinin (yükseklik, uzunluk, derinlik, uzay-zaman) topolojik ölçüsüdür. Nokta (0B), sıfır boyut durumunu (boyutsuzluk) temsil eder. Sadece uzunluk ölçüsüne sahip çizgisel doğru bir boyutludur (1B). Yükseklik ve uzunluk özelliklerine sahip nesnelere (kare, dikdörtgen vb) iki boyutludur (2B). Yükseklik, uzunluk ve derinlik özellikleri olan nesnelere üç boyutluluğu (3B) temsil eder. Uzayda nesnelere hareketiyle açığa çıkan veya hissedilen zaman dördüncü boyutu (4B) temsil eder [1]. Canlı sistemler morfolojik ve anatomik olarak 3B'dir. Moleküller hareket veya titreşim halinde olduğundan dördüncü boyut olan zamanın açığa çıkmasına ve izlenmesine yol açarlar. Bundan dolayı canlılardaki her hadise zaman şeridinde aktığından canlı sistemler uzay-zaman birlikteliğinin karakteristik örneğini oluşturur. Bundan dolayı canlılık, patoloji, hastalık ve ölüm 4B ekseninde tanımlanır ve açıklanır.

In vivoda hücreler mikroçevrenin etkisiyle buldukları ortamda polarizasyon oluştururlar. 3B yapı olan dokunun bütünlüğünün ve homeostasinin sağlanması, polarizasyonun gereken düzeyde olmasına bağlıdır [2]. *In vitro*da yapılan tek katmanlı (monolayer) hücre kültürlerinde hücreler uzunlukça artarken yükseklik ve derinlik özelliklerini büyük ölçüde kaybederler. Bu nedenle tek katmanlı hücre kültürü 2B hücre kültürü modeli olarak tanımlanır. *In vitro* 3B hücre kültürü (sferoid) modelinde ise hücreler *in vivodakine* benzer polarizasyon gösterdiklerinden morfolojileri de *in vivo*ya yaklaşıyor [3, 4]. Hücreler 2B kültür modelinde kaybolan derinlik ve değişen yükseklik, uzunluk ölçülerini 3B kültürde geri kazanırlar (Şekil 2.1, 2.2).



Şekil 2.1. İki boyutlu (2B) kültürlerde hücreler polarizasyon kaybı nedeniyle organizasyon oluşturma özelliklerini kaybederler. Üç boyutlu (3B) kültürlerde ise hücreler *in vivo* benzeri polarizasyon oluşturarak organize bir şekilde doku oluşumuna giderler [5].



Şekil 2.2. Hücrelerin davranışlarını ve dokunun dinamik durumunu etkileyen kimyasal, fiziksel ve topolojik faktörler (Li ve Cui, 2014'den yeniden düzenlenmiştir) [6].

2.2. *In Vitro* Sitotoksosite Araştırmalarında İki Boyutlu ve Üç Boyutlu Hücre Kültürü

In vitro hücre kültürleri bir molekülün (ilaç, kimyasallar vb) hücre üzerindeki toksik etkisini ölçmek için ilk başvurulan yöntemdir. Geleneksel hücre kültürleri kültür kapları kullanılarak ankoraj bağımlı hücrelerin tek katmanlı (monolayer) ve 2B çoğalmalarını sağlar. Bu modelde kısa sürede büyük hücre popülasyonları elde edildiğinden hücre canlılık testleri üzerinden sitotoksitenin hesaplanması pratik ve ekonomiktir. Ancak hücrelerin kültüre edildikleri kapların *in-vivo* mikroçevreyi yansıtmaması ve hücrelerin *in-vivo* mikroçevrelerini oluşturma imkanı bulamaması

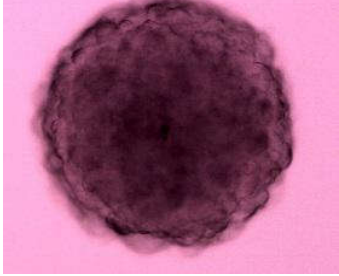
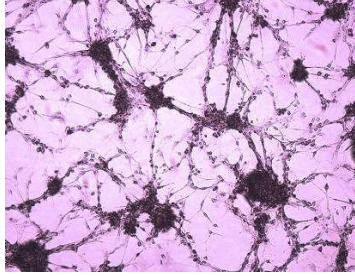
nedeniyle 2B hücre kültürleri *in vivo*da gerçekleşen hücrel olayları tam olarak temsil etmez. Bu hücre çoğaltma yöntemi hücrelerin polarizasyon kaybına ve ekstrasellüler matriks (Extra Cellular Matrix - ECM) moleküllerini sınırlı alandan salgılanarak *in vivo*da sahip oldukları özellikleri kaybetmelerine neden olur (Tablo 2.1) [7, 8]. *In vitro* araştırmaların *in vivo*ya benzerliği ve sonuçlarının kullanılabilirliği uzun yıllardır tartışma konusu olsa da bu araştırmalar ön bilgi ve öngörü sağladığından dolayı önemini korumaktadır. Son yıllarda gelişen teknoloji hücre serilerini *in vitro* 3B olarak kültüre etmeyi mümkün kılmıştır.

3B hücre kültürü, hücre agregatlarının doku sferoidleri veya gömülü hücreler olarak canlı dokularında bulunan yapısal proteinlerin ve diğer biyolojik moleküllerin ECM'i taklit ettiği bir doku iskelesinde veya sıvı tabanlı yöntemlerde oluşmasını sağlayarak belirli bir dereceye kadar *in vivo* olayları taklit eden model bir sistemdir. 3B hücre kültürü ile hücre-hücre ve hücre- matriks etkileşimleri, hücre çoğalması ve farklılaşması düzenlenerek *in vivo* benzeri doku mimarisi ve homeostasis korunabilmektedir. Bu nedenle *in vitro* çalışmalarda hücrelerin ECM moleküllerini tam olarak salgılayabildikleri *in vivo* benzeri mikroçevrenin sağlanması, *in vitro* bulguların *in vivo*ya yansıtılması noktasında kritik önem taşımaktadır (Şekil 2.3) [9, 10]

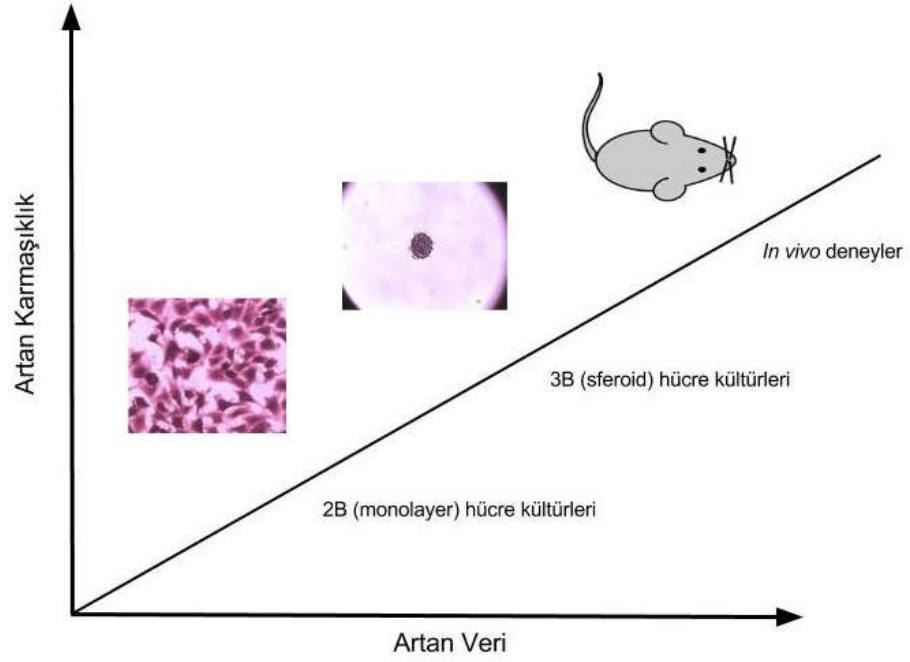
3B hücre kültürü oluşturabilmek için araştırma amacına uygun seçilebilecek iskele ve sıvı tabanlı yöntemler bulunmaktadır. İskele tabanlı yöntemler hidrojel ve matriks olarak iki gruba ayrılır [11, 12, 13]. Sıvı tabanlı yöntemler ise asılı damla, ultra-düşük tutunma sağlayan mikropalakalar, mikro taşıyıcı sistemler, rotasyon tabanlı sistemler ve mikro-akışkan çipler olarak beş gruba ayrılır [13, 14, 15, 16, 17].

Günümüzde 3B hücre kültürü için uygulanabilir ve ekonomik olan asılı damla yöntemi tek bir sferoidin elde edilebildiği ve besiyeri değişimine imkan veren bir yöntemdir. Bundan dolayı kullanım yaygınlığı giderek artmaktadır.

Tablo 2.1. İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürü modellerinin karşılaştırılması.

<p style="text-align: center;">3B</p> 	<p style="text-align: center;">2B</p> 
Hücrelerin <i>in vivo</i> benzeri morfolojileri korunur	Hücreler <i>in vivo</i> morfolojilerini kaybederler.
Hücre-hücre etkileşimleri, polarizasyonu, hücre göçü ve mekansal örgütlenme daha zengindir	Hücre-hücre etkileşimleri, polarizasyonu, hücre göçü ve mekansal örgütlenme sınırlıdır.
Deney süreleri ve sonuçların eldesi <i>in vivo</i> ya göre daha kısa, <i>in vitro</i> ya göre daha fazla süre gerektirir.	Deney süreleri ve sonuçların elde edilme süresi kısadır.
Sıvı veya iskele tabanlı bir çevrede hücrelerin komşu hücrelerle etkileşim yüzeyleri <i>in vivo</i> benzerlik gösterir.	Kültür kabı içinde çoğalan hücrelerin hem tutunma yüzeyleri hem de diğer hücrelerle etkileşim yüzeyleri sınırlıdır. Bu sınırlama hücre-hücre etkileşimlerini dolayısıyla hücre davranışlarını doğrudan etkiler.
ECM salgılanması çok yönlü olduğundan hücre ve ekstrasellüler matriks etkileşimleri de zengindir.	Hücreler ECM moleküllerini belirli bir yönde ve sınırlı yüzeyden salgılar.
Uzun süreli kültürleri yapılamadığından hücrelerin moleküler tipolojisinde farklılaşma oluşum riski düşüktür.	Kültürler uzun süreli yapılabildiğinden pasajlar arasında genetik değişiklikler meydana gelebilir. Bu ise hücrelerin zaman içerisinde moleküler tiplendirmelerinin farklılaşmasına yol açar.
Hücre çoğalması moleküler iskele üzerinde gerçekleştiğinden ve ECM sentezi zengin olduğundan hücreler arasında parakrin sinyal iletimi duyarlılığı <i>in vivo</i> ya benzerlik gösterir	Hücrelerin aralarında moleküler iskelenin olmayışı <i>in vivo</i> ya göre parakrin sinyal iletimi duyarlılığında artışa yol açar.
Matriks ve moleküler iskelenin sertliği <i>in vivo</i> doku matriksi sertliğine oldukça yakındır.	Hücrelerin tutunduğu kültür kaplarının (flasklar) sertliği <i>in vivo</i> doku matriksinin sertliğine göre daha fazladır.
<i>In vitro</i> ya göre maliyeti daha yüksek bir modeldir ancak <i>in vivo</i> ya göre daha ekonomiktir.	Maliyeti daha düşük bir modeldir.

*Fotoğraflar laboratuvarımızda çekilmiş olup, U-87 MG hücrelerinin 2B ve Hidrojel (agaroz) yöntemi ile oluşturulan 3B kültürlerinin faz-kontrast mikroskop (Leica Microsystems, Heerbrugg, İsviçre) görüntülerinden alınmıştır.



Şekil 2.3. İki boyutludan (2B), üç boyutlu (3B) kültürlere geçildiğinde artan veriye bağlı oluşan karmaşıklık düzeyi *in vivo*ya daha çok benzerdir (Bal-price ve Hogberg, 2014'den yeniden düzenlenmiştir) [18].

2.3. Üç Boyutlu Hücre Kültürü ile Yapılabilen Araştırmalar

3B hücre kültürü yöntemleri kullanılarak hücre kültürleriyle hücrelerin çeşitli davranışları, birbirleriyle ve ilaçlarla etkileşimleri araştırılabilir. Bu açıdan literatürde 3B hücre kültürü ile yapılmış hücre canlılığı, hücre döngüsü, sitotoksikite, hücre farklılaşması, gen ve protein ekspresyonu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Yapılan bir çalışmada kollajen I matrikste 3B olarak kültüre edilen HeLa hücrelerinin canlılık oranlarının aynı hücre serisinin 2B kültürlerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır [19]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre serileri A549 ve PC9'un 3B ve 2B kültürlerinde Erlotinib'in sitotoksik etkilerinin ölçüldüğü bir çalışmada 3B sferoid A549'da IC_{50} değerinin 2B kültürlerinden altı kat daha az olduğu gözlemlenirken 3B PC9'da IC_{50} değerinin 2B kültürlerinden beş kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir [20]. A549 ile yapılan başka bir çalışmada 3B kültürlerin 2B kültürlere göre çinko oksit nanopartiküllerine karşı daha hassas olduğu bulunmuştur [21]. Matriks

yöntemiyle 3B kültürleri yapılan insan karaciğer kanseri hücre serisi HepG2 üzerinde denenen hepatotoksik ilaçların hücrelerde *in vivoda* olduğu gibi toksik olduğu gözlenmiş ancak 2B HepG2 kültürlerinde sitotoksositeye rastlanmamıştır [22]. 8-30 yaş arası donörlerden alınan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin doku iskelesinde kondrojenik farklılaşmaya devam edebilmeleri; insan embriyonik kök hücrelerinin matris kaplı mikro kuyucuklarda embriyoid body formasyonu oluşturabilmeleri; embriyonik kök hücrelerinin kollajen matrisde hepatositlere farklılaşabilmeleri 3B kültürlerde yapılan hücre farklılaşması çalışmalarına örnek verilebilir [14, 23, 24]. DU-145 prostat kanseri hücre serisiyle yapılan EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) protein ekspresyonu çalışmasında 2B kültürlerde bu proteinin aşırı eksprese edildiği ölçülürken, 3B kültürlerde *in vivoda* olduğu gibi eksprese edildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada PC-3 prostat kanseri hücre serisinde PSA (Prostat Spesifik Antijen) sentezinin 2B kültürlerde görülmediği ancak 3B kültürlerde görüldüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmada MDA-MB-468 meme kanseri hücre serisi PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog) protein ekspresyonunun her iki hücre kültürü ortamında da olmadığı, AKT (V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog) protein ekspresyonunun ise her iki kültür ortamında olduğu gösterilmiştir [25]. Meme epitel hücre serisi 184A1'in 2B ve 3B kültürlerinde radyasyonun hücre döngüsüne etkilerinin ölçüldüğü bir çalışmada hücre serisinin hem 2B hem de 3B kültürlerinin G2 fazında durduğu bulunmuştur [26]. Bu durum 2B ve 3B kültürlerde yapılan ancak elde edilen veriler arasında bir fark görülmeyen çalışmaların da olduğunu göstermektedir.

2.4. Glioblastoma Hücre Serilerinin Önemi

2.4.1. Glioblastoma

Glial hücreler nöronlarla sürekli iletişimde bulunarak nöronal metabolizmayı ve nöronlar arası iletişimi düzenler. Astrositler, oligodendrositler, mikroglia ve ependim hücreleri olarak dört sınıfta incelenir. Bu hücrelerden kaynaklanan tümörler genel olarak glioma olarak isimlendirilir. Gliomalar beyin dokusunda oluşan tümörlerin yaklaşık % 80'ni oluşturur ve glial hücrelerden kökenlenir. İnsidansı dünyada 100.000'de 7'dir [27, 28, 29].

Gliomalar köken aldıkları hücreye göre astrositoma, oligodendroglioma, ependimoma ve karışık glioma olarak sınıflandırılır. WHO astrositomaları dört alt gruba ayırmıştır; Evre I veya pilositik astrositoma, evre II veya düşük evre astrositoma (AGII), evre III veya anaplastik astrositoma (AGIII), evre IV veya glioblastoma (GBM, Glioblastoma multiforme). GBM, gliomalar içerisinde %65 sıklıkta görülür ve en ölümcül olanıdır. Daha çok 40 yaş üstü erkek bireylerde görüldüğü belirtilmektedir. GBM hastalarının tedavisinde cerrahi işlem, radyoterapi ve kemoterapi uygulanır. Yaşam ömrü 12-15 ay arası olup GBM hastaları içerisinde 5 yıllık sağkalım oranı %5'tir. GBM hücrelerinin normal beyin parankiması içine diffüz infiltrasyon olması, aralıksız tümör büyümesi ve tümör hücrelerinin radyasyon ve kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmesi tedaviyi geciktiren ve zorlaştıran etkenlerdir [28].

GBMler ortak histolojik özellikler göstermelerine rağmen bu tümörler moleküler düzeyde hastadan hastaya oldukça çeşitlilik gösterir [30]. GBM genel olarak tümörün genetik yapısı temel alınarak primer (vakaların yaklaşık %93'ü) ve sekonder (vakaların %5- %10 arası) olarak ikiye ayrılır. Primer GBM genellikle 50 yaş üstü bireylerde gözlenir. Genetik olarak *EGFR* amplifikasyonu, *PTEN* mutasyonu ve *p16INK4a* delesyonu ile karakterizedir. %10'unda *MDM2* (murine double minute 2) geninin amplifikasyonu görülmektedir [31]. Sekonder GBM daha genç bireylerde gözlenir. Ortalama başlangıç yaşı 45 olan bireylerde genetik olarak TP53, RB2 mutasyonları saptanmıştır. *IDH1* (Izositrat dehidrogenaz 1) gen mutasyonu tüm sekonder GBMlerde belirlenmiştir [32]. Kromozom 10q kaybı her iki GBM tipinde de ortaktır [28]. Çocuklardaki GBM'lerde *EGFR* veya *MDM2* proto-onkogenlerinin amplifikasyonu ve *p15/p16* delesyonu rastgele gözlenmektedir [33].

2.4.2. Glioblastoma Mikroçevresi

Beyindeki ECM moleküllerinin özellikle de hyaluronan molekülünün glioma hücrelerinin invazyon ve malignitesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. GBM invazyonunda ekstrasellüler etkileri anlamadaki asıl engel *in vivo*da beyin dokusunu saran glioma topluluğunun kompozisyonel ve yapısal elementleri bulunduran matriks sistemlerinin kurulabildiği *in vitro* model eksikliğidir [34]. Üç boyutlu (3B) hücre

kültürü bu açıdan *in vivo*ya benzerliğiyle GBM modellemesi için doğru bir seçim olabilir.

Normal beyin dokusundaki ekstrasellüler alan beyin %15 – 25'ini kaplamaktadır. Beynin geri kalanı nöronlar, glialar, astrositik uzantılar ve kan damarlarından oluşmaktadır. Ekstrasellüler alanda nöron ve glialardan salgılanan çeşitli iyonlar, nörohormonlar, peptidler, metabolitler ve ECM molekülleri bulunmaktadır. Beyin ECM'i özellikle proteine bağlı olmayan hyaluronik asit ve proteine bağlı olan heparan sülfat ve kondroidin sülfat gibi sülfatlanmış glikozaminoglikanlar içerir. Ayrıca damar düzenini (vaskülatür düzen) sağlayan kollajen, laminin ve fibronektin de bulunur [35, 36].

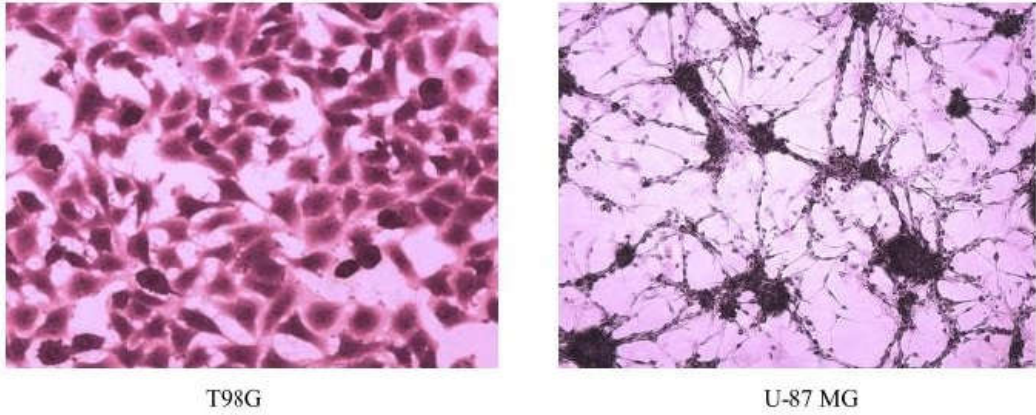
Mikroçevre GBM oluşumunda önemli etkiye sahiptir. GBMler de dahil tüm glioma hücreleri invazyonu kolaylaştırmak ve invazyonun aktif olduğu bölgede ECM'yi yeniden modellendirmek için kendi mikro çevrelerine ECM molekülleri (hyaluronik asit, fibronektin, laminin, kollajen, vitronektin, tenaskin, vb), enzimler ve matriks metalloproteinazlar sentezler. Hyaluronik asit beyin dokusunda bulunan en önemli (primer) ECM molekülüdür. Ortamdaki hyaluronik asit moleküllerinin sayısındaki değişimler glioma oluşumu ile karakterizedir. GBMler normal beyin dokusunda bulunandan çok daha fazla düzeyde hyaluronik asit eksprese eder. Hücre içi aşırı hyaluronik asit birikimi GBM hücrelerinin göç, çoğalma ve invazyon süreçleri için uygun mikroçevreyi oluşturmalarını sağlar. Hücre dışında aşırı hyaluronik asit birikimi ise GBM çoğalması ve motilitesini düzenleyen hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkilidir [34]. Bu açıdan *in vitro* GBM çalışmalarında klasik 2B hücre kültüründe hücrelerin belirli yüzeyleriyle kültür kaplarına tutunmaları sonucu ECM moleküllerinin sınırlı yüzeylerden salgılanarak *in vivo* benzeri bir mikro çevre oluşumu sağlanamamaktadır. Bu durum hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunda *in vivo* koşullara göre farklılaşmaya yol açmaktadır. 3B hücre kültüründe ise hücreler kültür plakası gibi sert bir yüzeye tutunmadan sferoid yapı oluşturarak çevrelerinde ECM moleküllerinin birikerek *in vivo* benzeri bir mikroçevrede çoğalmaları sağlanabildiğinden sinyal yolları aktivasyonu *in vivo*ya benzerdir.

2.4.3. Yaygın Kullanılan Glioblastoma Hücre Serileri

In vitro çalışmalarda kullanılmak üzere üretilmiş ve özellikleri tanımlanmış çok sayıda insan GBM hücre serisi bulunmaktadır. Bunlar içerisinde en yaygın kullanılan GBM hücre hatları T98G ve U-87 MG'dir (Şekil 2.4).

T98G hücre serisi ilk olarak 1979 yılında 61 yaşında beyaz ırk kökenli GBM beyin tümürlü bir hastadan elde edilmiştir. Epitelyal özellikte ve ankoraj bağımlı (adherent) hücrelerdir. T98 hücre serisinin poliploid varyantıdır. Morfolojik olarak fibroblast hücrelerine benzer. Hiperpentaploid hücrelerdir ve kromozom sayıları 128 – 132 arasındadır [37]. T98G'nin *p53* ve *PTEN* tümör baskılayıcı genleri mutanttır ancak *Rb* (Retinoblastoma) geninde mutasyon yoktur. Proto-onkogen *Bcl-2* ekspresyonu vardır [38, 39, 40].

U-87 MG hücre serisi, 44 yaşında beyaz ırk kökenli bir GBM hastasından 1966 yılında elde edilmiştir. Epitelyal özellikte ankoraj bağımlı (adherent) hücrelerdir ve morfolojik olarak yıldızlı yapıdadır. Hipodiploid hücrelerdir ve 44 kromozoma sahiptir [41]. U-87 MG'nin tümör baskılayıcı genlerinden *p53* yabancıl tip, *PTEN* ve *p16* geni mutanttır, *Rb* ekspresyonu vardır. Proto-onkogen *Bcl-2* ekspresyonu vardır [42, 43, 44, 45].



Şekil 2.4. İki boyutlu (2B, monolayer) kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre serilerinin kristal viyole ile boyandıktan sonra faz-kontrast mikroskopunda 40X büyütmede çekilen görüntüleri (Özge Özer).

2.5. Hücre Döngüsü ve Düzenleyici Moleküller

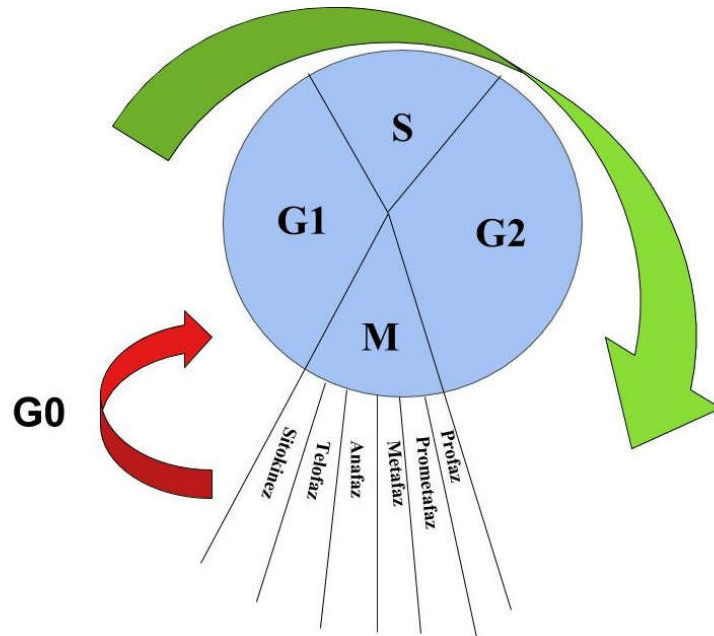
Hücreler büyüme ve çoğalma için karar veren ve birbirleriyle etkileşen proteinlerin oluşturdukları karmaşık bir sisteme sahiptir. Bu sistem hücrelerin durgunluk evresinde kalmasını ya da hücre döngüsü evrelerinin ilerlemesini ya da durdurulmasını sağlayan hücre içi ve hücre dışı sinyalizasyon mekanizmasından oluşur.

2.5.1. Hücre Döngüsü

Ökaryotik hücrelerin çoğunda hücre döngüsü Gap 1 (G1), Sentez (S), Gap 2 (G2) ve Mitoz (M) olmak üzere dört evreden oluşmaktadır (Şekil 2.5). Bu evreleri tamamlayan hücreler Gap 0 (G0) adı verilen dinlenme evresinde kalırlar.

- ◆ **Gap 1 (G1) Evresi:** Hücre metabolik fonksiyonlarının normal olarak devam eder ve organeller dublike edilir. DNA replikasyonuna hazırlanılır ve diploid (2n) kromozom içerir.
- ◆ **Sentez (S) Evresi:** DNA replikasyonunu takiben kromozom dublikasyonu gerçekleşir. Böylece kromozom sayısı tetraploid (4n) olur.
- ◆ **Gap 2 (G2) Evresi:** Hücre içeriği artmaya devam ederek mitozu hazırlanır.
- ◆ **Mitoz (M) Evresi:** Hücre bölünmesinin gerçekleştiği evredir. Profaz, Prometafaz, Metafaz, Anafaz, Telofaz ve Sitokinez olmak üzere altı alt evrede tamamlanır.
 - *Profaz* evresinde genetik materyal iki adet kromatid oluşturarak kondense bir durumda sentromerlerinden birleşir ve kromozom yapısı meydana gelir. Hücre iskelet molekülleri dağılır, mikrotübüller kutuplara çekilmeye başlar ve kromozomların tutunacakları mitotik iğ (spindle) iplikleri oluşur. Golgi cisimi ve endoplazmik retikulum parçalanır.
 - *Prometafaz* evresinde kromozomlar kinetokorlarıyla mikrotübüllere tutunur ve oluşmuş mitotik iğ ipliklerinin ekvatoruna taşınmaya başlar.
 - *Metafaz* evresinde mikrotübüller tamamen kutuplara çekilmiş olur ve ekvatora yerleşen kromozomlar metafaz plağını oluşturur.
 - *Anafaz* evresinde kromozomların sentromerleri kohezin aktivitesi ile ayrılır ve kromatidler eşit sayıda zıt kutuplara çekilmeye başlar.

- *Telofaz* evresinde kromatidler her iki kutupta toplanır, golgi cismi ve endoplazmik retikulum yeniden oluşturulur.
- *Sitokinez* evresinde telofazı takiben hücre bölünmesi gerçekleşir ve iki yeni hücre oluşur.
- ◆ **Gap 0 (G0) Evresi:** Mitoz evresinden sonra hücreler her hangi bir bölünme sinyali gelmediği sürece bölünmezler ancak metabolik olarak aktiftirler. Bu dinlenme evresi G0 olarak adlandırılır [35, 46].



Şekil 2.5. Hücre döngüsü evreleri.

2.5.2. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre döngüsünde işlemekte olan evrenin tamamlanmasından önce diğer bir evreye geçişi engellemek için G1, S, G2/M ve M olarak dört kontrol noktası vardır. Bu kontrol noktalarında her hangi bir DNA hasarı yakalanırsa hücre durdurulur.

G1 Kontrol Noktası: Bölünecek hücredeki DNA hasarı, bölünme için gerekli moleküller ve hücrenin yeterli büyüklükte olup olmadığı kontrol edilir.

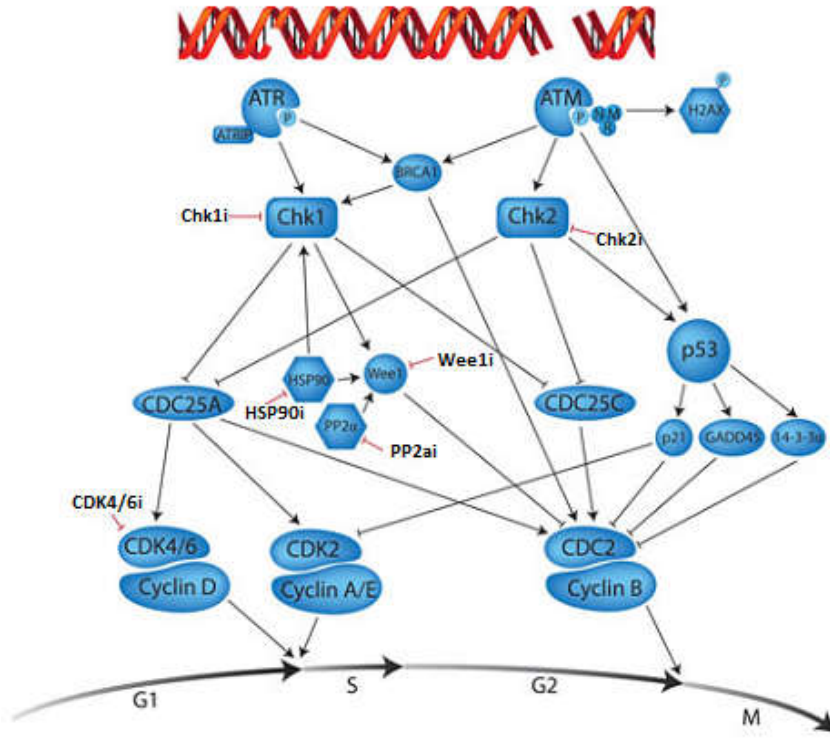
S Kontrol Noktası: Replikasyon sırasında oluşan DNA hasarı ya da hasarlı DNA algılanır.

G2/M Kontrol Noktası: Doğru replike edilmemiş ve hasarlı DNA algılanır.

İğ İpliği Oluşum Kontrol Noktası: Bu kontrol noktasında metafazdan sonra anafaz evresine geçilmeden kromozomların iğ ipliklerinin ekvator bölgesinde düzgün olarak sıralanması kontrol edilir [35, 46].

Hücre döngüsünü düzenleyen moleküller siklinler, siklin bağımlı kinazlar (Cyclin- Dependent Kinase, CDK), ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleridir (CKI). Siklinler ve onların fosforillenmesini sağlayan CDK'lar birlikte kompleks oluşturarak hücre döngüsünün ilerlemesini sağlar. G1 evresinde Siklin D, CDK4 ve CDK6 kompleksi, G1'den S evresine geçişte Siklin E ve CDK2 kompleksi, S evresinde Siklin A ve CDK2 kompleksi, G2 ve M evrelerinde Siklin B ya da Siklin A ve CDK1 kompleksi hücre döngüsünün düzenlenmesini sağlar. Hücre döngüsünü düzenleyen diğer önemli moleküller Aurora kinaz ailesi üyeleridir (Aurora A, B, C). Aurora kinazlar serin/threonin protein kinazlardır. İğ ipliği oluşum kontrol noktasın, sentrozom ve sitoskelet fonksiyonu ve sitokinez düzenlenmesinde önemli rol oynarlar [47].

G1, S ve G2/M kontrol noktalarında hasarlı ya da replike edilmemiş DNA varsa sensör proteinleri tarafından çevrelenerek ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein) ve ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) protein kinazları aktive eder. ATR Chk1 (Checkpoint Kinase 1)'i, ATM Chk2 (Checkpoint Kinase 2)'yi fosforiller. Fosforillenen Chk1 veya Chk2 proteini p53'ün fosforillenmesini sağlar. p53, bir CKI protein olan p21 sentezinde iş görür. p21 proteini G1, S ve G2 evrelerindeki CDKlar ile kompleks oluşturarak hücre döngüsünü durdurur (Şekil 2.6) [35, 46, 48].



Şekil 2.6. Hücre döngüsünde etkileşen moleküller (Alexander ve ark., 2012'den yeniden düzenlenmiştir) [49].

GBM gelişiminde G1 kontrol noktasının düzenlenme bozukluğu (deregülasyonu) sık görülür. Çalışmalarda primer GBM tümörlerinin %50'sinden fazlasında *p16INK4* lokusunun tamamen kaybı ya da *CDK4* geninde amplifikasyon görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca kromozom 19p13.2'de delesyon olduğu gösterilmiştir. Bu kromozom bölgesi iki tane CDK substratı ekspresye eden (*CDK4* ve *CDK6*'ya spesifik) *p19INK4d* (siklin bağımlı kinaz inhibitör geni) geninin bulunduğu bölgedir. Ancak çalışmalarda bu gende herhangi bir delesyon saptanmamıştır ve GBM hücre serilerinde *p19INK4d* geninin ekspresyonu saptanmıştır. Ancak *CDK4* ve *CDK6* ekspresyonu 18 GBM hücre serisinden 8'inde (% 44'ünde) normal beyin dokusuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [50]. GBMlerin % 11'inde *CDK4* geninin amplifikasyonuna rastlanılmıştır. Bunun sonucu olarak *CDK4* proteini ekspresyonunda aşırı artış olduğu saptanmıştır [51]. GBMlerde Hücre döngüsü kontrol moleküllerinden biri olan *CDC25A*'nın (Cell Division Cycle 25A) ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir

[52]. *WEE1* (G2 Checkpoint Kinase) geni ekspresyonunda dolaylı azalma (downregüle) olduğu bildirilmiştir [53].

2.5.3. Hücre Döngüsü Evrelerinin Analizi

Hücre döngüsü evrelerinin analizinde kullanılan farklı yöntemler vardır. En çok kullanılan yöntem Propidyum İyodid (PI) ile analizdir. PI nükleer DNA'ya bağlanma özelliğine sahiptir ve bu sayede DNA miktarına göre hücrelerin hangi evrede olduklarının belirlenmesinde kullanılır. Ölçüm ve hücrelerin ayrıştırılması için akım sitometrisi kullanılır. PI özgüllüğünü artırmak ve işaretleme yapmak için ayrıca RNaseA, Bromodeoxyuridine (BrdU), Siklinler, Deoksinukleotidil transferaz (TdT) ve F-aktin kullanılır [54, 55].

Bu tez çalışmasında PI ve RNase A karışım solüsyonu kullanıldı. RNaseA pirimidine özgüdür ve PI'nın DNA boyama özgüllüğünü bu sayede artırır. PI yoğunluğu DNA içeriği arttıkça artar. Bu nedenle analizde G2/M evresi en koyu boyanan evredir.

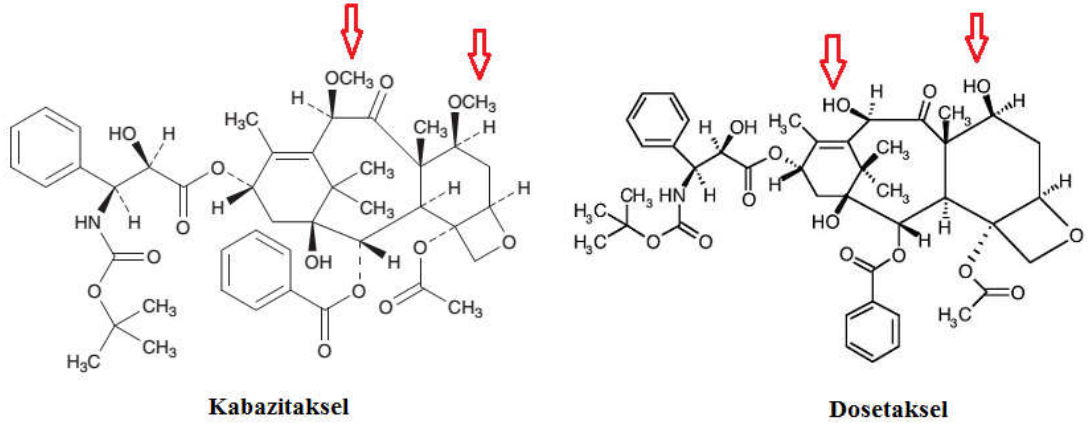
2.6. Kabazitaksel'in Hücre Döngüsüne Etkileri

Hayvan hücrelerinde bulunan sentrozom organeli mitotik iğ ipliği ile kromozom ayrılmasında, hücresel mimaride ve sitoplazmik taşınımında önemli göreve sahip mikrotübülleri organize etmede rol oynar [56]. Soluble (çözünebilen) tubulin hücrelerde bir molekül α -tübülin (alfa tübülin) ve bir molekül β -tübülin (beta tübülin) alt üniteleriyle heterodimer olarak bulunur. Polimerizasyon sırasında heterodimerler protofilament formu oluşturmak için birbirlerine bağlanırlar. 13 protofilament içi boş bir silindir şeklinde organize olarak mikrotübül omurgasını oluştururlar. Oluşan üçlü mikrotübül yapılarına da sentriol adı verilir. Mikrotübüller, serbest dimerlerin sürekli polimerize yapılara dahil edilip soluble mikrotübül dimerlerinin tübülin havuzuna salınması nedeniyle kararsız bir denge halinde bulunurlar. Bu mikrotübül dinamikleri polarizasyona bağlı olarak matkap benzeri asimetric kümelenme/yıkıma bağlı ilerleme (Threadmilling) ve dinamik kararsızlık ile korunur. Bu mekanizmada tübülin üniteleri mikrotübülün artı uca eklenip karşı eksi uçtan çıkarılarak kromozomlar taşınırken mikrotübül uzunluğunda net değişim olmaz [57]. Mikrotübül stabilizasyonundan görevli

proteinler mikrotübül ilişkili proteinlerdir (MAPs, Microtubul Associated Proteins). Mikrotübüllerin toplanması ve dağılması ise GTP-GDT hidroliziyle artı uçta β -tübülün tarafından gerçekleştirilir. GTP- β tübülün mikrotübül toplanmasından, GDP- β tübülün mikrotübül ayrılmasından sorumludur [58].

Mitoz sırasında farklı tipte mikrotübüller aktive olur. Bunlar, sentriollerin merkezinden çevreye yayılan ışınsal (astral) mikrotübüller, iki kutup arasında ilerleyen ve kromozomların tutunduğu kinetokor mikrotübülleri ve iki kutup arasında uzanan ve kardeş kromatidlerin anafazda kutuplara çekilmesini sağlayan interpolar mikrotübüllerdir Kutupta sentriol ve sentriol proteinlerinin bulunduğu bölge mikrotübül organize edici merkez (MTOC, Microtubul-Organising Center) olarak isimlendirilir [59].

Kabazitaksel [CTX (Cabazitaxel, TXD258, XRP6258, JevtanaTM)], porsuk ağacı (Taxus spp.) iğnelerinin ekstraksiyonundan izole edilen 10-deacetyl baccatin III'ten sentez edilmiş yarı sentetik taksoid bir bileşiktir [57]. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından 17 Haziran 2010 tarihinde hormon dirençli metastatik prostat kanseri tedavisi için onaylanmıştır ve günümüzde kastrasyona dirençli prostat kanseri hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır. Kimyasal adı (2 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4-acetoxy-13-({(2R,3S)-3[(tertbutoxycarbonyl)amino]-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl} oxy) -1 hydroxy -7,10 dimethoxy -9oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-ylbenzoate – propan-2-one (1:1) olan CTX'in yapısal formülü C₄₅H₅₇NO₁₄•C₃H₆O'dur (Şekil 2.7) ve moleküler ağırlığı 894 Da'dır [60].

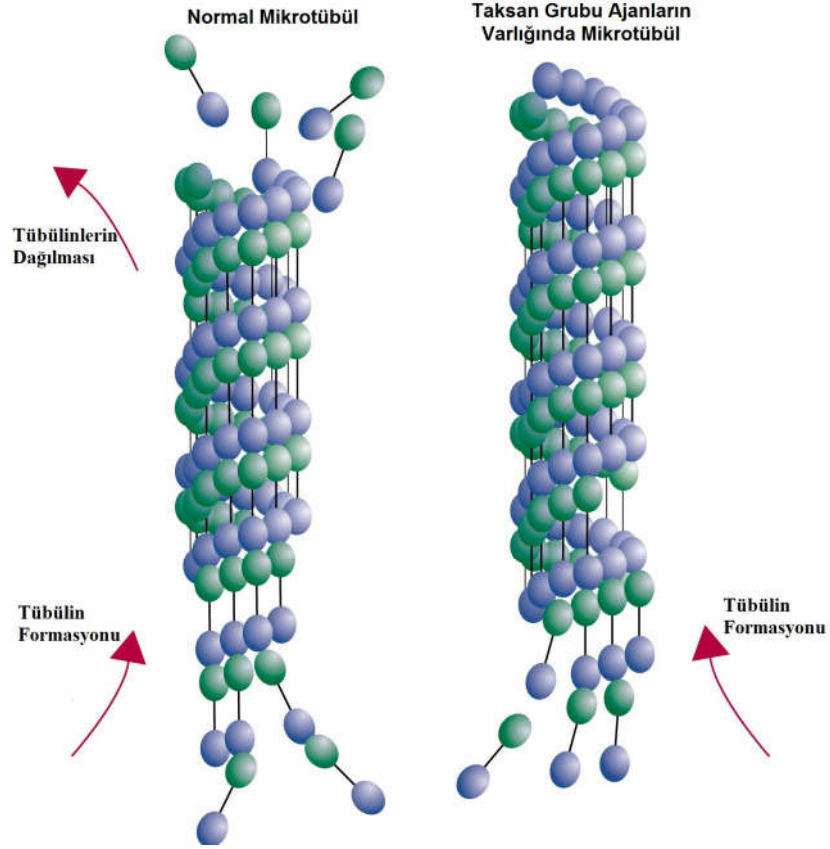


Şekil 2.7. Kabazitaksel'in (CTX $C_{45}H_{57}NO_{14}$) ve Dosetaksel'den (DTX, $C_{43}H_{53}NO_{14}$) önemli bir farkı DTX'te bulunan iki hidroksil grubunun metil grupları ile yer değiştirmesidir.

Dosetakselde (DTX) bulunan hidroksil gruplarından ikisi yerine CTX'in metil grupları içermesi, kanser hücrelerinin taksan grubu üyelerine karşı geliştirdikleri dirençte rol oynamaktadır (Şekil 2.7). CTX'deki bu metil grupları membran transport proteinlerinden biri olan P-gp (P-glikoprotein) afinitesinin diğer taksan grubu ilaçlara kıyasla daha az olmasını sağlar. Ayrıca, merkezi sinir sistemindeki önemli fiziksel bariyerlerden olan kan beyin bariyerinden de geçebilmesini kolaylaştırır [61].

CTX'in kanser hücrelerindeki moleküler etki mekanizması diğer taksan grubu ilaçlar gibi [Paklitaksel (PTX), DTX] mikrotübül organizasyonunu baskılama üzerinedir. 2B *in vitro* hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda taksan grubu ilaçların tübülünlerin β alt ünitesinde merkez heliks H7 ve M-loop arasına doğrudan bağlanarak hücre döngüsünü G2/M' de durdurduğu bildirilmiştir [56, 57, 62]. Düşük konsantrasyonlarda mitotik iğ ipliği oluşumunu engelleyerek mikrotübül dinamiklerini değiştirir. Yüksek konsantrasyonlarda ise mikrotübüllerin polimer formunda kümelenmesine ve stabil hale gelmesine neden olur (Şekil 2.8). p53 DNA hasarı ve iğ ipliği bozulmasından sorumlu kontrol noktaları G1/S ve G2/M'de önemli role sahiptir. Taksan grubu ilaçların p53 proteinini indükleyerek apoptozisi tetiklediği bildirilmiştir

[63, 64]. Yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin doğrudan nekroza gittiği de gösterilmiştir [65].



Şekil 2.8. Taksan grubu ajanlar tübülünlerin polimerizasyon ve depolimerizasyon dinamiğini bozarak polimerizasyonu stabil hale getirir [66].

2.7. Sitotoksisite ve Hücre Ölüm Tipleri

Fiziksel veya kimyasal bir ajanın belirli bir konsantrasyon aralığında hücrenin membran bütünlüğünü veya fonksiyonlarını geri dönüşümsüz olarak bozma işlemi sitotoksisite olarak adlandırılır. Bir ajanın sitotoksik etkisinin derecesini ölçümlemede canlılık ve zindelik (viability ve vitality) olmak üzere iki alt parametre kullanılır. Hücre canlılığı (cell viability) ölçümü hücre membran bütünlüğünün bozulup bozulmadığını temel alır. Hücre zindeliği (cell vitality) ölçümünde hücre membran bütünlüğünden ziyade mitokondriyel enzimlerin aktivite derecesi belirteç olarak kullanılır. Sitotoksik bir ajanın hücre membran bütünlüğünü bozup bozmadığı canlılık testi olan tripan mavisi

yöntemiyle test edilir [67]. Hücrenin zindeliğinin ajan tarafından etkilenip etkilenmediği ise mitokondriyel enzim aktivitesi ölçümü yoluyla (MTT, XTT, WST1, WST8 testleri) yapılır [68]. Ajanın sitotoksik etkisi 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) ve PI belirteçleri aracılığıyla hücre döngüsünün evrenmesi yoluyla da araştırılabilir [69]. Bu nedenle sitotoksiste sadece hücrelerin membran bütünlüğünü kaybettiği konsantrasyonu değil aynı zamanda zindeliğini (vitality) kaybettiği konsantrasyonları da içerir.

XTT [2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5carboxanilide], hücre canlılığı ve/veya sitotoksiste analizleri için yaygın bir şekilde kullanılan bir tetrazolyum tuzudur ve metabolik olarak aktif hücrelerin mitokondriyel enzimleri tarafından suda çözünebilir turuncu renkli formazan tuzuna çevrilir. Çok modlu plaka okuyucuda absorban ölçümü yapılarak vital hücre yüzdeleri elde edilir [68].

Sitotoksiste sonucu hücrede farklı tipte ölüm yolları tetiklenebilir. Programlanmış hücre ölüm tipleri, apoptozis, otofaji ve anoikis; programlanmamış hücre ölüm tipleri ise nekroz ve mitotik katastrof olarak sınıflandırılmaktadır.

Otofaji, hücrede nutrient yokluğunda, endoplazmik retikulum ve metabolik strese, anti-kanser ajanlara ve radyasyona maruziyette tetiklenen bir survival yolaktır. Hücre içi otofagozom oluşumuyla karakterizedir. Nükleus tam haldedir ve kromozom kondensasyonu görülmez. Otofajinin en yaygın kullanılan protein belirteçleri LC3A ve LC3B'dir [70, 71].

Anoikis, hücrenin ECM'den ya da diğer hücrelerden ayrılması sonucu apoptozisin tetiklenmesiyle gerçekleşen hücre ölümüdür [72].

Mitotik katastrof, mitozun tamamlanamaması sonucu tetiklenen hücre ölümüdür. Sentrozomların aşırı dublike olması ve mitozda çoklu iğ kutuplarıyla başlanması sonucu anormal kromozom ayrılmaları ve mikronukleasyon oluşumuyla karakterizedir. Bu ölüm tipinin apoptozisle bağlantılı olduğu çalışmalar bulunmasının yanında mitozda apoptozisin tetiklenemediği durumlarda da (p53-null hücrelerde ve apoptotik dirençte) devreye giren bir hücre ölüm çeşidi olduğu belirtilmektedir [73, 74].

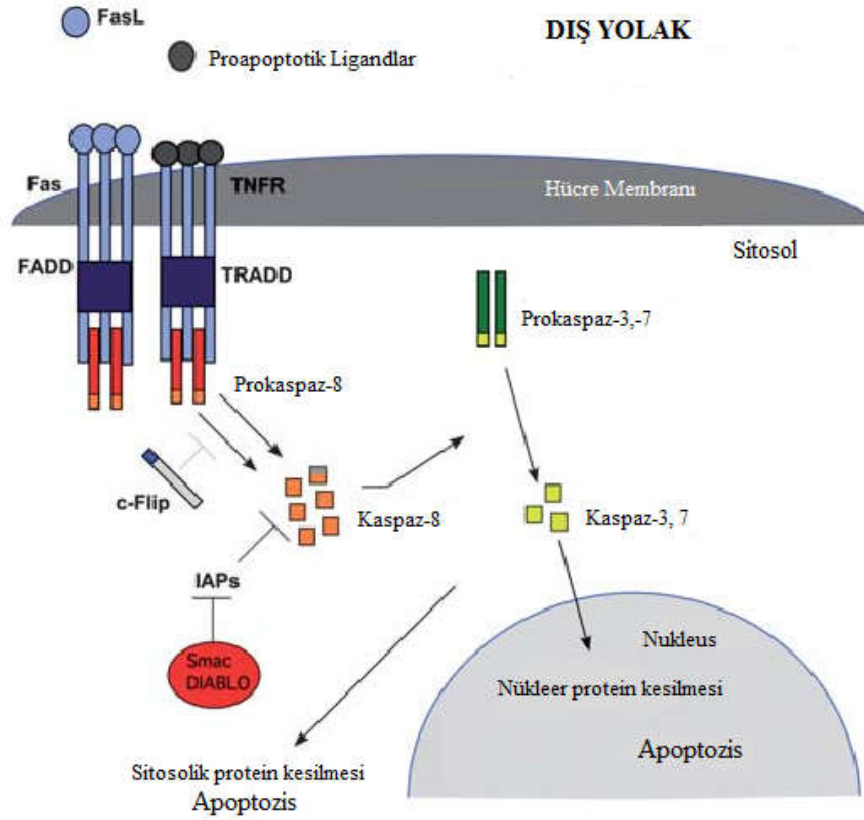
Taksan grubu ilaçlarla yapılan sitotoksosite çalışmaları sonucu hücrelerde en çok apoptozis ve nekrozun tetiklendiği gösterilmiştir [63, 64, 65].

2.7.1. Apoptozis

Programlanmış hücre ölüm tiplerinden biri olarak bilinen apoptozis, çok hücreli organizmalarda embriyonik gelişim, bağışıklık sistemi ve doku homeostazının korunması için gerekli fizyolojik bir olaydır. Apoptotik mekanizmalardaki bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar, ototimmunité ve kanser gibi çok sayıda patolojik durum ile ilişkilendirilmiştir.

Apoptotik bir hücrede morfolojik olarak plazma membranında kabarcık oluşumu, hücre büzüşmesi, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu görülür. Apoptozis, ölüm reseptörlerine bağlı dış yolak ve mitokondriye bağlı iç yolak olarak iki yoldan gerçekleşebilir. Her iki yolakta da apoptotik sinyaller hücre içi kaspazlar (Cystein – dependent aspartate - directed proteases, Caspase) aracılığıyla yönlendirilir. Kaspazlar apoptozis başlatıcı (kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10) ve efektör kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7) olarak iki gruba ayrılır.

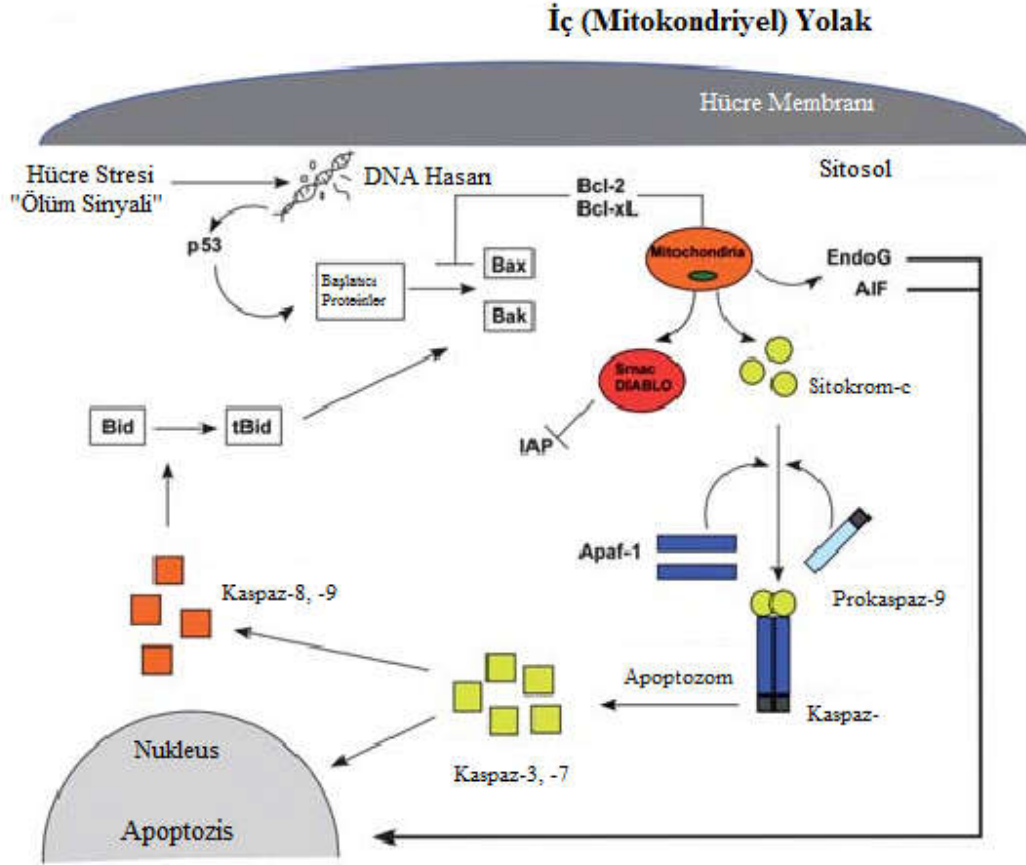
Dış yolak hücre membranında bulunan tümör nekrozis faktör (TNF) süperailisi üyeleri olan ölüm reseptörleri ve bunların ligandları ile tetiklenir. En iyi çalışılmış ölüm ligandları ve reseptörleri FasL/FasR ve TNF α /TNFR1'dir. Ligand reseptör etkileşiminden sonra pro-kaspaz 8 ya da pro-kaspaz 10 aktivasyonu ile apoptozis dış yolağı devam eder (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Dış yoldan tetiklenen apoptotik makineyi oluşturan moleküllerin akış diyagramı (Martinez ve ark.,2010'dan yeniden düzenlenmiştir) [75].

İç yolak, mitokondriyel iç membran potansiyelinin azalmasıyla başlar. Sitokrom-c ATP varlığında Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) ile kompleks oluşturur ve Apaf-1 pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom kompleksi oluşturulur. Apoptozom oluşumu takiben aktive olan kaspaz-9 sırasıyla kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eder. İç yolakta mitokondriyel olayları takip eden Bcl-2 ailesi üyeleri bulunur. Mitokondi membran geçirgenliğini değiştirerek pro-apoptotik ya da anti-apoptotik cevap oluştururlar (Şekil 2.10). Pro-apoptotik cevapta rol oynayan ve araştırmalarda en çok çalışılan Bcl-2 aile üyeleri Bax, Bak, Bfk, Bcl-Xs, Bid, Bad, Noxa, PUMA'dır. Anti-apoptotik cevapta rol oynayan ve araştırmalarda en çok çalışılan Bcl-2 aile üyeleri ise Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-W, Bcl-B, Mcl-1, Boo/Diva, Bfl-1/A1'dir Bu aile üyelerinin düzenlenmesi p53 aracılı gerçekleşir [72,

76, 77]. Taksan grubu ilaçların apoptozisi mitokondriyel yolaktan tetiklediği gösterilmiştir [78, 79].

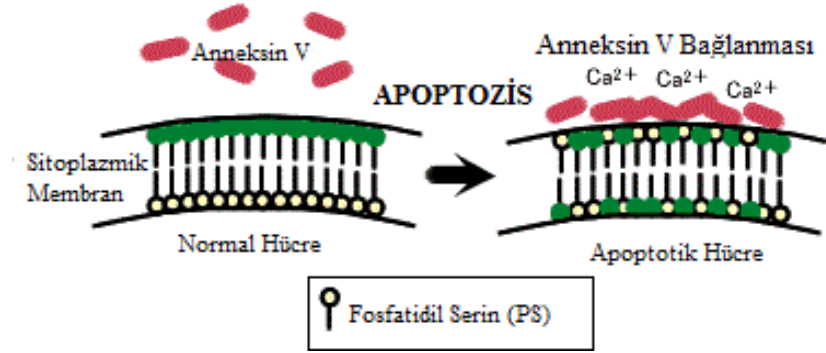


Şekil 2.10. İç (mitokondriyel) yolaktan tetiklenen apoptotik makineyi oluşturan moleküllerin akış diyagramı (Martinez ve ark.,2010'dan yeniden düzenlenmiştir) [75].

Apoptozis ölçümünde kullanılan birçok yöntem vardır. Bu yöntemler Anneksin V boyası ile işaretleme ve akım sitometrisiyle ölçüm yöntemi, etidyum bromid ile boyanarak floresan görüntüleme yapılan DNA ladder yöntemi, kaspaz 3 ve 7 aktivitesi ölçüm yöntemi, BrdU ile işaretleme yapılan TUNEL yöntemidir [75, 80].

2.7.1.1. Anneksin V

Anneksin V, nicel bakımdan bir popülasyonda aktif olarak apoptozise giden hücrelerin yüzdesini floresan tabanlı olarak belirlenmesinde kullanılır. Temel olarak ise apoptozisin erken evresinde hücrelerin membran asimetrisini kaybetme özelliğine dayanır. Ca^{+2} membran morfolojisinin değişiminde önemli rol oynar. Siklik nükleotidlerin (cAMP ve cGMP) uyarısıyla artan sitosolik Ca^{+2} apoptotik hücrelerde, membran fosfolipidi olan fosfatidilserin (PS) plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeye transloke olmasını sağlar [81]. PS'ye yüksek affiniteye sahip olan Anneksin V, kalsiyum bağımlı, fosfolipide bağlanabilen bir proteindir ve PS'ye maruz kalan apoptotik hücreleri tanımak için kullanılır (Şekil 2.11). Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin V bağlanması görülebildiği için ikinci bir boya gerekmektedir. Sadece apoptotik hücrelerin görünür hale gelebilmesi için de Anneksin V'le birlikte 7-AAD boyaması da yapılır. 7-AAD, çift zincirli DNA'ya yüksek afinite ile bağlanır. Bu boyaya alternatif olarak DNA'ya bağlanan PI'da kullanılabilir. Anneksin V kompleksinin hücre yüzeyindeki PS'ye bağlanma oranı akım sitometresi ile ölçülür. [69,82] Erken apoptoziste plazma membranı bütün haldedir ve 7-AAD boyanması görülmez, geç apoptoziste ise membran bütünlüğü bozulur ve 7-ADD boyanması görülür. PS translokasyonu ve Anneksin V'in bağlanması her iki apoptozis evresinde de vardır (Tablo 2.2) [80].



Şekil 2.11. Hücrelerin apoptozise gittiğinin bir göstergesi hücre membranının sitoplazmaya bakan kısmında yer alan Fosfatidil Serinin (PS) ekstrasellüler bölgeye göç etmesidir. Bu değişim apoptotik hücrelerde Anneksin V'in Ca^{2+} bağımlı olarak PS'ye bağlanmasıyla gözlenebilir [83].

Tablo 2.2. Apoptotik hücrelerin evrenlenmesinde Anneksin V ve 7-AAD belirteçleri.

Belirteçler	Anneksin V/7-AAD ile Ölçülen Parametreler			
	Canlı	Erken Apoptotik	Geç Apoptotik	Nekrotik Nükleer Debris
Anneksin V	-	+	+	-
7-AAD	-	-	+	+

2.7.2 Nekroz

Programlanmamış bir hücre ölüm tipi olan nekrozda hücre hacminde artış, organellerin şişmesi, plazma membranının parçalanması, lipid degradasyonu, sitosolde Ca^{+2} artışı görülür. Oligonükleozomal DNA fragmentasyonu oluşması nedeniyle jel elektroforezde ladder görüntüsü değil smear görüntüsü oluşur. Nekrozun düzenlenmesinde sitosolik Ca^{+2} artışı nedeniyle aktive olan kaspaz olmayan proteazların (kalpains, kathepsin vb.) ve reseptör etkileşimli serin/threonin protein kinaz 1'in (RIPK1) önemli rolü vardır. Ayrıca kaspaz inhibitörleri varlığında TNFR1, Fas, TRAIL-R ve Toll benzeri (TLR3, TLR4) reseptörler üzerinden nekrotik ölüm tetiklenir [72, 84].

Nekroz ölçümünde en çok kullanılan yöntemlerden biri DNA jel elektroforezdir. Görüntülemelemedeki smear görüntüsü hücrelerin nekrozla öldüğünü gösterir. Kaspaz3/7

ölçümü ile apoptozisin yanı sıra nekroz da ölçülebilir. Bu yöntem besiyerinde (süpernatantta) prokaspaz-3 ve prokaspaz-7 araştırılmasını temel alır. Hücrelerin apoptozise gitmeleri durumunda süpernatantta sadece kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin bölünmesiyle açığa çıkan p20 alt üniteleri ölçülür [84]. Bir diğer nekroz ölçüm yöntemi Laktatdehidrogenazdır (LDH). Hücre membranı parçalanmış nekrotik hücrelerin sitoplazmalarında bulunan LDH'nin hücre dışına çıkmasını esas alarak ölçüm yapılır [85].

2.8. Kabazitaksel ile Yapılmış Literatür Çalışmaları

CTX'in *in vitro* çalışmalarında dört hücre serisi üzerine [P388 (Lemfoblastik lösemi), HL60 (Promiyelositik lösemi), KB (Servikal adenokarsinoma), Calc18 (Meme karsinoma)] dört gün CTX uygulanarak sitotoksitenin uygulanan konsantrasyonlardan çok daha düşük olduğu (IC₅₀: 3-29 ng/mL) bildirilmiştir [86]. Aynı hücre hatları DTX dirençli hale getirilip DTX ve CTX ayrı olarak uygulandığında CTX'in antiproliferatif etkisinin daha yüksek olduğu (DTX IC₅₀ : 0.17–4.01 mmol/L; CTX IC₅₀: 0.013–0.414 mmol/L) bildirilmiştir [87].

CTX'in *mdr1* genini sentezleyen *in vitro* tümör modellerini baskıladığı gösterilmiştir [88].

Baş-boyun kanseri hücre hatlarında (HN30 ve HN12) yapılan bir çalışmada CTX'in antiproliferatif etkisi bildirilmiştir. Hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak her iki hücre serisinde de apoptozise yol açtığı belirlenmiştir [89].

CTX'in *in vivo* çalışmalarında farelerle yapılan insan tümör ksenograft çalışmalarında CTX'in antitümör aktivitesi çeşitli kolon (HCT116, HCT-8, HT-29), akciğer (NCI-H460, A549), böbrek (Caki-1), pankreas (MIA PaCa-2), baş-boyun (SR475) ve prostat (DU-145) tümör modellerinde gösterilmiştir [90]. Başka bir ksenograft çalışmasında insan glioblastoma hücrelerine (SF295, U251) 13.4 ve 20 mg/kg/enj dozlarında CTX uygulanarak anti-tümör etkisi gösterilmiştir. Aynı çalışmada CTX'in enjeksiyonundan 15 dakika sonra farelerin beyinde en yüksek konsantrasyona ulaştığı saptanmıştır. Fare, sıçan ve köpeklerde CTX'in kan beyin bariyerine etkisi çalışılmış ve beyin ilaca, 48 saatte tümörden 2.3 kat, plazmadan 3.7 kat daha fazla

maruz kaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada kolon adenokarsinoma fare modellerine (C51) 8-10 mg/kg CTX ve 2.8-3.5 mg/kg Sisplatin kombinasyonu uygulanmıştır. Toksik olmayan üç dozda sinerjistik antitümör aktivite saptanmıştır [91].

Faz I çalışmalarında, metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri olan 25 hastaya 3 haftalık 102 döngüde intravenöz olarak 10- 25 mg/m² aralığında 4 doz uygulanan bir çalışmada doz limitleyici toksisitenin nötropeni ve en yüksek tolere edilebilir dozun 25 mg/m² olduğu bildirilmiştir. Hastalarda görülen diğer toksik etkiler; ishal (%56), bulantı (%40) ve kusmadır (%16). CTX'in nörotoksisite olarak çok düşük bir orana sahip olduğu belirtilmiştir [92].

Faz II çalışmaları Taksan dirençli metastatik meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada CTX dozu 20 mg/m² 'dan 25 mg/m² 'a yükseltildiğinde ilk döngüde herhangi bir yan etki görülmemiştir. HER2 pozitif olan hastalar eğer trastuzumab tabanlı bir tedavi almışlar ise çalışmaya dahil edilmiştir. Bunun yanı sıra çalışma HER2 negatif hastalarla sınırlı kalmıştır [93].

Faz III çalışmaları metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri olan 378 hastada yapılan bir çalışmada dosetaksel tabanlı bir tedavi aldıktan sonra 25 mg/m² kabazitaksel her üç haftada bir intravenöz olarak uygulanmıştır. Hastaların hepsine günde iki kez 5 mg Prednison verilmiştir. Ortalama 12-15 ay sonunda mortalite riskinin %30 azaldığı bildirilmiştir [60].

2.9 Bu Tez Çalışmasında Araştırılan Hipotezler

- 1.** GBM hücre serilerinde gliomasfer oluşumu için asılı damla yönteminin uygunluğunun araştırılması ve optimizasyonu.
- 2.** 2B ve 3B GBM (T98G, U-87 MG) hücre kültürlerinde anti-tümöral Kabazitaksel'in sitotoksik etkilerinin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak karşılaştırılması.
- 3.** 2B ve 3B GBM (T98G, U-87 MG) hücre kültürlerinde Kabazitaksel'in hücre döngüsü evrelerinin yüzdeler dağılışı üzerine etkisinin olup olmadığının belirlenmesi.
- 4.** Apoptotik evreleme yöntemiyle Kabazitaksel'in sitotoksik etkisinin 2B ve 3B GBM (T98G, U-87 MG) hücre kültürlerinde farklılaşıp farklılaşmadığının test edilmesi.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Tez çalışmasında Kabazitaksel, GBM hücre hatları (T98G, U-87 MG), hücre kültürlerine ait besiyerleri (DMEM/F12, MEM), besiyeri hazırlanmasında kullanılan Fetal Sığır Serum (FBS), antibiyotikler (penisilin/streptomisin, partrisin, gentamisin), hücrelerin kültüre edilip çoğaltılmalarında steril flasklar, Trypsin/EDTA solüsyonu, steril 5ml ve 10ml hacimlere sahip pipetler, 10- 200- 1000 µL hacimlerde pipet uçları, hücrelerin santrifüj edilmesinde 1.5, 2, 15 ve 50 ml hacimli tüpler, hücre sayımında Tripan Mavisi boyası, hücre sayım lamı, hücre dondurulması için steril Cryo tüpler, sitotoksisite, apoptosis ve hücre döngüsü testlerinin yapılmasında 2B kültürler için düz (F) tabanlı, 3B formasyona geçmelerini sağlayan steril, 96 kuyucuklu asılı damla (Hanging Drop Plates) ve 96 kuyucuklu U-tabanlı plakalar, Hücre canlılığını ölçmek için XTT canlılık testi kiti, apoptozisi ölçümlemek için Muse® Annexin V & Dead Cell Kiti ve hücre döngüsü evrelerinin analizi için Muse™ Cell Cycle Kiti kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1 Hücre Hatlarının Temini, Çoğaltımı ve İdamesi

İnsan glioblastoma multiforme hücre hatları U-87 MG ve T98G, Tülay Aktaş Onkoloji Hastanesi Tıbbi Onkoloji Araştırma Laboratuvarı'nın Interlab Cell Line Collection (ICLC, Italy) ve American Type Culture Collection (ATCC, Wesel, Germany)'dan aldığı hücre hatları stoğundan temin edildi.

- -80 °C'de kriyo tüplerde saklanan hücreler önceden ultraviyole ile sterilize edilmiş laminar hava akımlı çalışma kabine (Class II, NuAire, USA) getirildi (Şekil 3.1)
- Kriyo tüpler 37°C su banyosunda herhangi bir sarsılma olmamasına dikkat edilerek bekletildi.
- Hücrelerin çözülmesi tamamlandıktan sonra kriyo tüplerin kapakları kontaminasyonu önlemek için %70'lik etil alkolle silindikten sonra açılarak hücreler 1

mL'lik pipetlerle, içerisinde 5 mL hazır besiyeri bulunan 15 mL'lik kapaklı ependorf tüplere aktarıldı.

- Aktarılan hücreler 1000 RPM'de, 25°C'de, 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra tüpteki sıvı kısım olan supernatant dökülerek hücrelerin dibine çökerek oluşturduğu pellet elde edildi.
- Üzerlerine 10 mL hazır besiyeri eklenip pipet tabancası yardımıyla 10 mL'lik pipetlerle pipetaj yapılarak hücrelerin besiyerinde homojen olarak dağılması sağlandı.
- Pipetaj işleminden sonra toplanan hücreler 75 cm²'lik kapakları filtreli olan hücre kültür flasklarına aktarıldı.
- Hücreler 37°C ve %5 CO₂'li nemli inkübatöre (Binder, Germany) kaldırıldı.
- Hücre hatlarının günlük bakımları yapılarak ve pasajlanarak çoğaltıldı. Ayrıca hücreler, canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta izlendi.
- U-87 MG stabil glutamin ve 2.2 g/L NaHCO₃ içerikli MEM besiyerinde, T98G stabil glutamin içerikli DMEM/F12 besiyerinde flasklarda (hücre kültürü kapları) çoğaltıldı. Her iki besiyerine %10 fetal sıgır serumu (FBS) %1 partrisin, % 1 penisilin-streptomisin, % 0.1 gentamisin eklendi.



Şekil 3.1. Hücre kültürünün yapıldığı steril kabin (laminar flow hood).

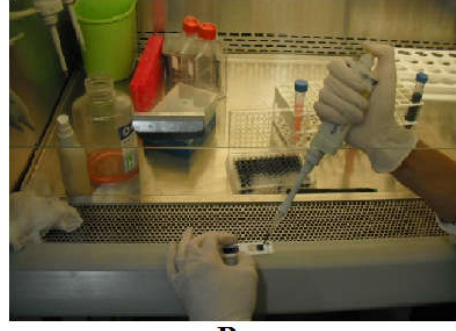
3.2.2. Canlı ve Ölü Hücrelerin Sayım Yöntemi

Hücre sayımı için membran bütünlüğüne göre canlı ve ölü hücrelerin ayrımının yapılmasını sağlayan tripan mavisi yöntemi uygulandı. Hücreler çalışılmak istenen sayıların hazırlanabilmesi için sayım işlemine tabii tutuldu.

- İnkübatörden çıkarılan hücreler morfolojik olarak bakılmak için inverted mikroskopta incelendi (Şekil 3.2 A).
- Morfolojileri düzgün olan hücrelere ait flaskların besiyeri döküldü.
- Tripsinizasyon işleminden önce flasklar tripsinin flaskta kalan hazır besiyeri ile etkileşimini azaltıp, enzimatik etkinliğinin artırılması için 4 mL Fosfat Buffer Salin (PBS) ile yıkandı.
- PBS döküldükten sonra her flaska 4 mL tripsin/EDTA (%0.05) eklenerek, hücrelerin tutundukları yüzeylerden ayrılabilmeleri için tekrar inkübatöre kaldırıldı.
- 2-4 dakika sonra inverted mikroskopta 10X büyütmede hücrelerin kalktıkları gözlenerek flasklar hücre kültürü kabine getirildi.
- Tripsinin enzimatik aktivitesini nötralize etmek için flasklara 4 mL hazır besiyeri ilave edildi.
- Pipetaj işlemi ile toplanan hücreler 15 mL'lik kapaklı ependorf tüplere alınarak 1000 RPM, 25°C'de, 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası supernatant atıldı. Pelletin üzerine 10 mL hazır besiyeri eklenerek pipetajla tüpte homojen olarak dağılmaları sağlandı.
- Hücre süspansiyonundan 50 µL ve tripan mavisi boyasından 50 µL (1:1 oranında) alınıp 96 kuyucuklu mikro plakanın bir kuyucuğuna aktarılıp karıştırıldı.
- Bu karışımdan 50 µL mikropipet ile çekilip hücre sayım cihazının (T3 Cellometer, Nexcelom, USA) lamına aktarıldı (Şekil 3.2 B).
- Hücre sayımı hücre sayım cihazında yapıldı (Şekil 3.2 C). Canlı hücreler tripan mavisi boyasını membranlarından geçirmeyerek parlak beyaz renkte görüntülendi. Ölü hücrelerde ise boya membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin içerisine girdiğinden hücreler koyu mavi renkte görüntülendi.



A



B



C

Şekil 3.2. A. Hücrelerin inverted mikroskopta görüntülenmesi. B. Tripan mavisi ile boyanmış hücre süspansiyon örneğinin hücre sayım lamına aktarılması. C. Hücre sayım cihazı.

3.2.3. Hücre Serilerinin İkilene Sürelerinin Hesaplanması

- T98G ve U-87 MG hücre hatlarının ikilenme sürelerinin hesaplanması için 5×10^5 hücre altı kuyucuklu plakalara 24, 48, 72, 96 saat ölçüm yapılacak şekilde üçer tekrarlı olarak ekildi.
- Her kuyucuğa 5 mL hazır besiyeri eklendi.
- Hücre ekiminden sonra kuyucuklardaki hücrelerin 24, 48, 72 ve 96 saat sonraki sayımları yapıldı.

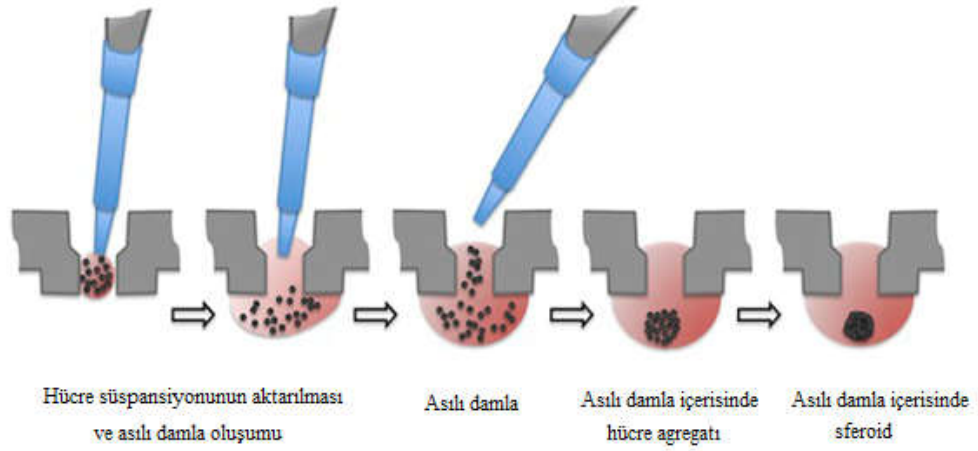
3.2.4. Kabazitaksel'in Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Kabazitaksel, Selleck Chemicals (Texas, USA) firmasından temin edildi ve %15'lik etanolde çözülerek 11,96 mM stok solüsyonu hazırlandı. 50 ve 100 µL'lik küçük hacimler (aliquatlar) halinde -80 °C'de saklandı. Her deney için yeni stok solüsyonu kullanıldı.

3.2.5. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürünün GBM Hücreleri İçin Optimizasyonu

T98G ve U-87 MG hücrelerinin asılı damla yöntemiyle kültüre edilerek istenilen zaman aralığında devamlılığını sağlamak için hücre sayısı, gerekli hacimdeki besiyeri ve hücrelerin başka bir plakaya aktarım şekli optimize edildi. Bunun için;

- 96 kuyucuklu asılı damla plakasının (Perfecta3D® 96-well hanging-drop plates, 3DBiomatrix, USA) yatay olarak her bir sırasına (toplam 12 kuyucuk) 10^4 , 5×10^3 , 3×10^3 , 10^3 , 5×10^2 hücre ekildi (Şekil 3.3).
- Besiyeri hacmi asılı damla yönteminde en yüksek hacim olan 50 µL olarak ayarlandı.
- Sferoidlerin oluşması için 72 saat inkübe edildi.
- Sferoidlerin başka bir plakaya aktarımı için santrifüjleme, kuyucuk üstünden hava verme ve yukarıdan çekme yöntemleri denendi.
- 24. 48. 72. ve 96. saatlerdeki canlılık/zindelik değerleri XTT testi (Roche, Germany) ile ölçüldü.



Şekil 3.3. Asılı damla plakasında üç boyutlu sferoid oluşum şeması [94].

3.2.6. İki Boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürlerine Kabazitaksel Uygulaması

- 2B hücre kültürleri için sayım işleminden sonra 96 kuyucuklu mikro plakaların her bir kuyucuğuna 100 μ L içerisinde 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
- Hücrelerin plakaya tutunmaları için 24 saat inkübe edildi.
- Hücrelerin sferoid oluşturmaları için 3B hücre kültürü yöntemlerinden biri olan asılı-damla yöntemi uygulandı.
- 96 kuyucuklu hazır asılı-damla plakaları kullanıldı.
- Yöntemin protokolü esas alınarak ortam neminin ayarlanması için plakanın altındaki tabla (tray) hazneleri 1'er mL, plakanın kendi hazneleri 2'şer mL PBS ile dolduruldu.

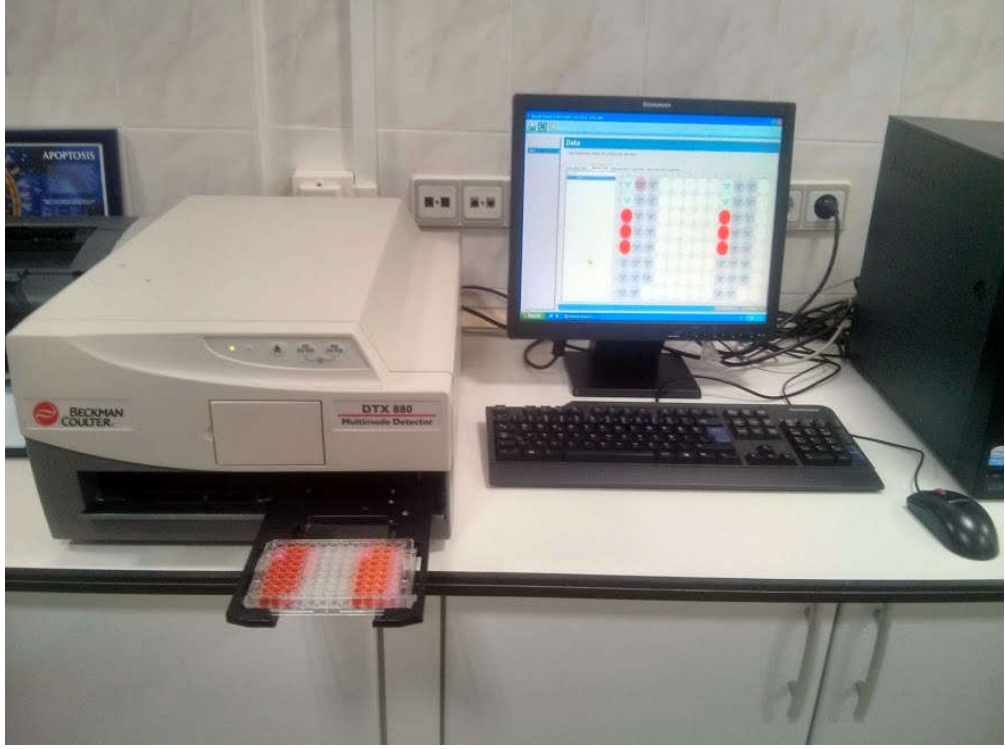
- Her kuyucuğa içerisinde 3×10^3 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonundan mikropipetör yardımıyla $45 \mu\text{L}$ alınarak asılı damlalar oluşturuldu.
- Plaka, kapağı kapatılıp hücre kültürü inkübatörüne kaldırıldı.
- Agregat oluşturmaya başlayan hücrelerin 72. saatin sonunda sferoid oluşturdıkları gözlemlendi.
- Bu sürelerin sonunda Kabazitaksel'in 24., 48., 72. ve 96. saatlerdeki hücre canlılığına etkilerinin ölçülmesi için her iki hücre kültürü ilacın artan konsantrasyonlarına (10^{-4} - 10^{-8} M) maruz bırakıldı.
- Her bir kuyucuk için hazırlanan ilaç konsantrasyonlarından 2B hücre kültürlerine $100 \mu\text{L}$, 3B hücre kültürüne ise $5 \mu\text{L}$ eklendi.

3.2.7. Sitotoksosite Yüzdelerinin Hesaplanması

U-87 MG ve T98G'nin 2B ve 3B hücre kültürlerinin belirli zaman aralıklarında (24-96 saat) farklı konsantrasyonlarda (10^{-4} - 10^{-8} M) Kabazitaksel uygulandıktan sonra XTT testi ile hücre canlılığı/zindeliği (viability/vitality) ölçüldü. XTT solüsyonu sodyum 3'-[1-(fenil-aminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis(4-metoksi-6-nitro) benzen sülfonik asit hidrat ile N-metil dibenzopirazin metil sülfat'ın 50:1 oranında karıştırılması ile hazırlandı.

- 3B hücre kültürleri U tabanlı 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Aktarım işlemi sırasında sferoidlerin dağılmamaları için U tabanlı plakaların kuyucuklarına $50 \mu\text{L}$ hazır besiyeri eklendikten sonra sferoidler asılı damla kuyucuğu üzerinden $100 \mu\text{L}$ hava verilerek aktarıldı.
- 2B ve 3B hücre kültürlerinin her bir kuyucuğuna $100 \mu\text{L}$ XTT solüsyonu eklendi.
- Plakalar 4 saat inkübe edildi.
- Dört saat sonunda her kuyucuğun absorbands değeri 450-490 nm referans dalga boyu aralığında çok modlu plaka okuyucuda (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, USA) ölçüldü (Şekil 3.4).
- % Sitotoksosite = $1 - \left[\frac{\text{İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması}}{\text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması}} \right] \times 100$ formülü ile hesaplandı. Absorbans değerlerinden yukarıdaki formül kullanılarak hesaplanan sitotoksosite

yüzdeleri CalcuSyn 2.1 (Biosoft, UK) yazılımına girilerek hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (50% Inhibition Concentration, IC₅₀) hesaplandı.

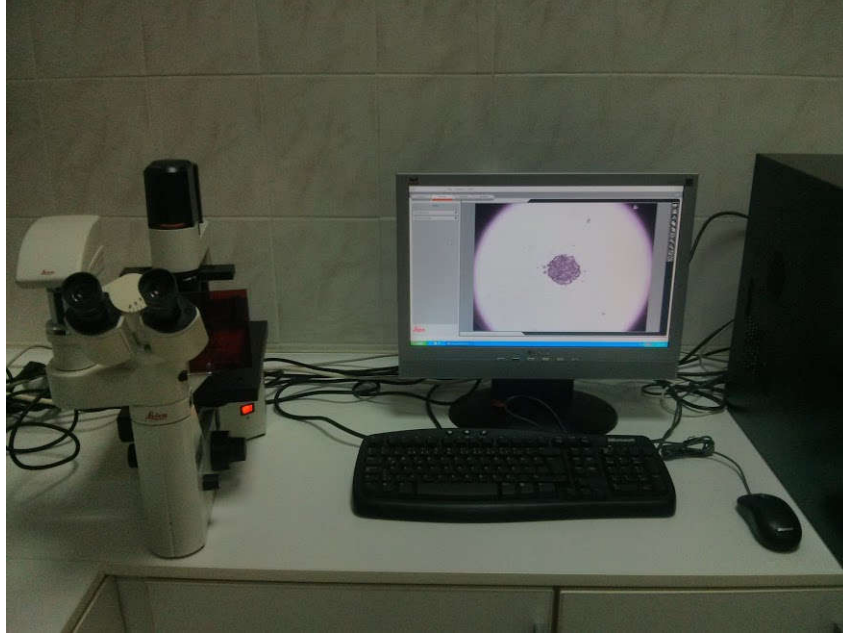


Şekil 3.4. XTT test sonuçlarının çok modlu plaka okuyucuda ölçümü.

3.2.8. Faz-Kontrast Mikroskopunda Kabazitaksel ile Muamele Edilmiş Hücrelerin Morfolojik İncelenmesi

Hücre canlılığı testiyle 2B ve 3B kültürlerde Kabazitaksel'in IC₅₀ konsantrasyonları görüntüleme yapılarak doğrulandı. Bunun için;

- 2B kültürler 6 kuyucuklu plakalara 5×10^5 , 3B kültürler asılı damla plakalarına 3×10^3 hücre olarak ekildi.
- 2B kültürler ekim yapıldıktan 24 saat sonra, sferoidler ekimden 72 saat sonra ilacın hücre serisine ve kültüre ait hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele edildi.
- IC₅₀'nin ölçüldüğü zaman sonunda faz kontrast mikroskopunda görüntüleme yapıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Faz kontrast mikroskobunda hücre ve sferoidlerin görüntülenmesi.

3.2.9. Hücre Döngüsü Evrelerinin Muse Hücre Analiz Cihazında Belirlenmesi

Hücre döngüsü evrelerinin belirlenmesi için Muse™ Hücre Analizi cihazına (Merckmillipore, Germany) (Şekil 3.6) ait Muse™ Cell Cycle Kit kullanıldı. Muse™ Cell Cycle Kiti, hücre döngüsünün G0/G1, S, veya G2/M evrelerindeki memeli hücre kültürlerinin yüzde oranlarını belirleme imkanı vermektedir. Kontrol hücrelerinin ve ilacın IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş hücrelerin evrenleme işlemi için;

- 2B hücre kültürlerinde 10⁶ hücre 6 kuyucuklu plakalara, 3B hücre kültürlerinde asılı damla yönteminde her kuyucukta 3x10³ hücre olacak şekilde toplam 576 (6 plaka) kuyucuğa ekim yapıldı.
- İlaçlı hücrelerin evrenlenmesi için hücreler ilacın daha önce hesaplanmış olan IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edildi.
- 2B kültürler tripsinizasyon işlemi ile toplanarak 1000 rpm'de 10 dakika 25 °C'de santrifüj edildi.
- 3B kültürlerde oluşan sferoidler 1000 µL'lik pipetlerle üstten çekilerek 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.

- Tüpler hücrelerin sferoid yapıdan ayrılıp tüpte homojen olarak dağılmalarını sağlamak için 2000 RPM'de 5 dakika 25 °C'de santrifüj edildi.
- Pellet PBS'te çözüldü ve 300xg'de 5 dakika 25 °C'de santrifüj edildi.
- Her iki hücre kültürüne ait tüplerdeki süpernatantlar döküldü.
- Kalan pelletler üzerine 1 mL PBS eklenerek pipetaj işlemiyle çözüldü.
- Hücreler tekrar 300 x g'de, 5 dakika 25 °C'de santrifüj edildi.
- Fiksasyon işlemi için tüpler içerisinde 50 µL PBS bırakılarak kalan süpernatant döküldü.
- Pelletler kalan PBS'le pipetajla iyice karıştırıldı.
- Hücreler, içerisinde 1 mL soğuk %70 etanol bulunan tüplere damlatılarak karıştırıldı.
- Boyama işlemi öncesi hücreler bir gece süresince -20 °C'de fiksasyona bırakıldı.
- Fiksasyon işleminden sonra her tüpteki hücreler 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine alındı ve 300 x g'de, 5 dakika 25 °C'de santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülerek pellet her 5×10^5 hücre için 250 µL PBS'te çözümlenerek tekrar 300 x g'de, 5 dakika 25 °C'de santrifüj edildi.
- Süpernatantlar dökülerek pelletler 200 µL Muse™ Cell Cycle solüsyonuyla çözüldü
- Tüpler karanlıkta, oda sıcaklığında, 30 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler Muse Hücre Analiz cihazında Muse™ Cell Cycle protokolüne uygun olarak analiz edildi.

3.2.10. Muse® Annexin V & Dead Cell kitiyle Canlı ve Ölü Hücrelerin Evrenmesi

Kabazitaksel'in GBM hücre hatları üzerinde elde edilen sitotoksikite sonuçları doğrultusunda hücrelerin apoptozis mi yoksa nekrozla mı öldükleri Annexin V yöntemi ile ölçüldü. Bunun için Muse® Annexin V & Dead Cell Kit (Merckmillipore, Germany) kullanıldı.

Kontrol hücrelerinin ve ilacın IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen hücrelerin apoptozis evrelerinin belirlenmesi için;

- 2B hücre kültürlerinde 5×10^5 hücre 6 kuyucuklu plakalara, 3B hücre kültürlerinde asılı damla yönteminde her kuyucukta 3×10^3 hücre olacak şekilde toplam 108 kuyucuğa ekim yapıldı.
- Her hücre kültürü, ilacın daha önce hesaplanmış olan IC_{50} konsantrasyonuyla muamele edildi.
- 2B kültürler tripsinizasyon işlemi ile toplanarak 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Pipetajla hücrelerin tüpte homojen olarak dağılması sağlandı.
- 3B kültürlerde oluşan sferoidler 1000 μ L'lik pipetlerle üstten çekilerek 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı.
 - Tüpler hücrelerin sferoid yapıdan ayrılıp tüpte homojen olarak dağılmalarını sağlamak için 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
 - Pellet PBS'te çözüldü tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Her iki hücre kültürüne ait tüplerdeki süpernatantlar döküldü ve üzerlerine % 1 FBS içeren 100 μ L besiyeri eklendi ve pipetajla hücre süspansiyonu oluşturuldu.
- Oda sıcaklığına getirilmiş olan Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonundan her tüpe 150 μ L eklenip yavaşça pipetaj yapıldı.
- Karanlıkta, oda sıcaklığında, 20 dakika inkübe edildi.
- Muse Hücre Analiz cihazında Muse® Annexin V & Dead Cell Kit protokolüne uygun olarak analizi yapıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Muse Hücre Analiz cihazı [95].

3.2.11. İstatistiksel Analiz

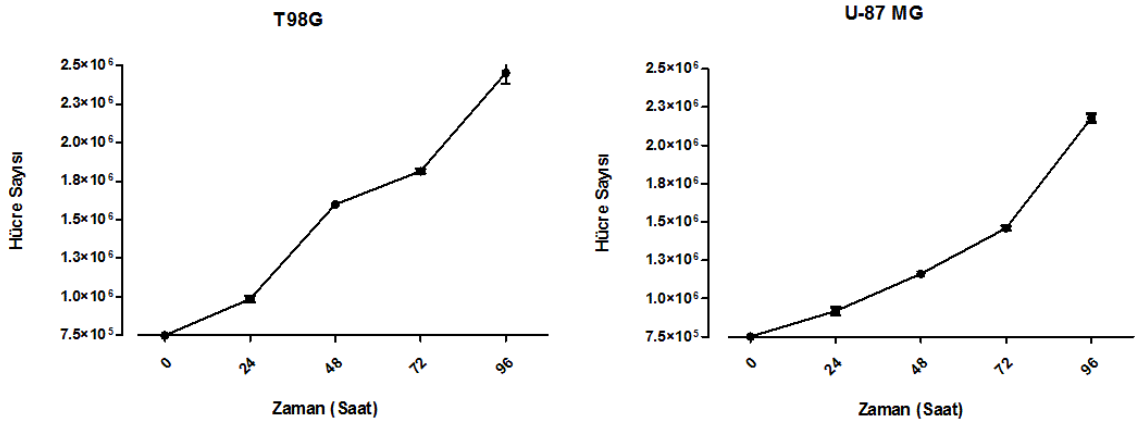
Kabazitaksel ilacının sitotoksik etkileri her deneyde 3B kültürler için 12, 2B kültürler için üç kuyucukta çalışıldı ve her deney üç kez tekrar edildi. Elde edilen absorbans değerleri çok modlu plaka okuyucu tarafından otomatik olarak ortalama absorbans ve \pm SD değerleri hesaplandı. Hesaplanan sitotoksik yüzdeler, her hücre serisi ve hücre kültürü yöntemlerine ait IC_{50} değerlerini saptamak için CalcuSyn 2.1 (Biosoft, UK) programına aktarıldı. Grafikler Graphpad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA) kullanılarak çizildi. Her iki hücre serisinde uygulanan konsantrasyonlar arasındaki sitotoksik etkilerin 2B ve 3B hücre kültürlerinde anlamlı olup olmadığı tek yönlü ANOVA ile araştırıldı, ardından Dunnett's t-testleri kullanıldı. T98G ve U-87 MG hücre serilerinin 2B ve 3B hücre kültürlerindeki IC_{50} değerlerinin karşılaştırılması NCSS 9.0 (NCSS LLC, USA) yazılımı kullanılarak 3D Surface Plot grafiğinde gösterildi. Apoptozis ve hücre döngüsü deneylerine ait veriler MuseSoft Analysis 1.4 yazılımında analiz edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Hücre Serilerinin İkilenme Sürelerinin Hesaplanması

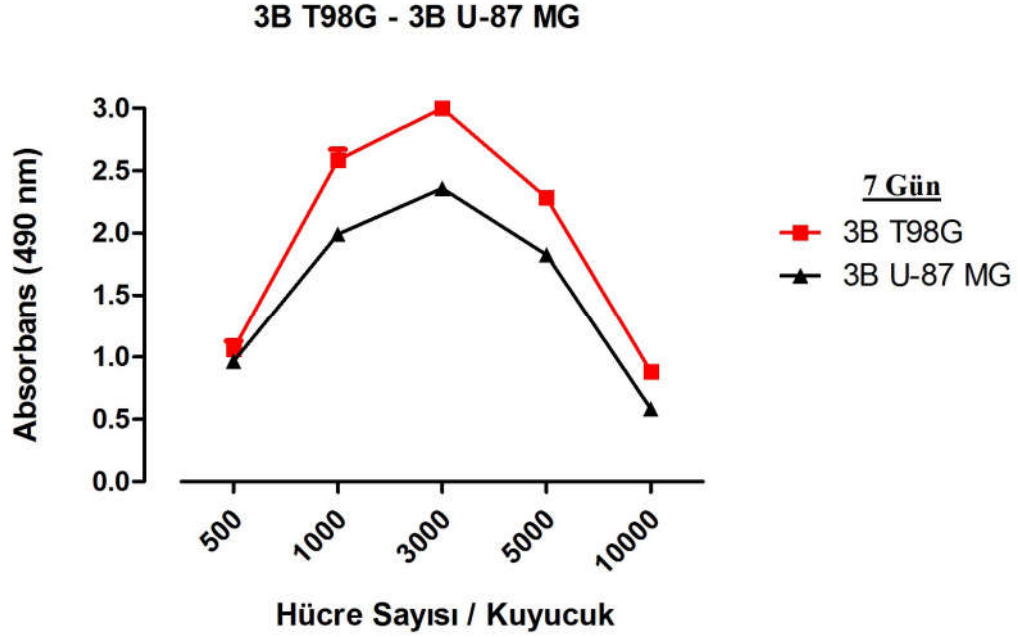
24, 48, 72, 96 saat sayımları yapılan hücrelerin ikilenme süreleri hesaplandı ve Şekil 4.1'de gösterildi. Buna göre T98G ve U-87 MG'nin ikilenme sürelerinin sırasıyla 48 ve 72 saat olduğu saptandı.



Şekil 4.1. GBM (T98G ve U-87 MG) hücre kültürlerinin çoğalma eğrileri.

4.1.2. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürünün GBM Hücreleri İçin Optimizasyonu

T98G ve U-87 MG hücrelerinin asılı damla yönteminde sferoid oluşturarak 50 μ L besiyerinde deney süresince (toplam 7 gün) devamlılığının sağlanması için en uygun hücre sayılarının $3 \times 10^3 - 10^3$ arasında olduğu hesaplandı. XTT testi için sferoidlerin U tabanlı plakaya aktarımı kuyucuklar üzerinden 100 μ L hava verilerek yapıldı. XTT testi sonucunda mikro plaka okuyucuda elde edilen absorbans değerlerinin en yüksek 3×10^3 hücrede görüldüğü belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. GBM (T98G ve U-87 MG) hücre serilerinin üç boyutlu (3B) kültürlerinde başlangıç canlı hücre sayılarının optimizasyon grafiği. Y eksenindeki absorbans değerleri XTT testinden elde edilmiş olup canlı hücre artışının göstergesidir [50 µl besiyeri içerisinde 7 gün (168 saat) boyunca deneylerin sürdürülmesi için gereken hücre sayısı optimizasyon grafiği].

4.1.3. İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) GBM Hücre Kültürlerinde Kabazitaksel'in Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

2B ve 3B insan GBM hücre kültürlerinde (T98G, U-87 MG) Kabazitaksel'in sitotoksik etkileri hem artan konsantrasyonlarda (10^{-8} - 10^{-4} M) hem de zamana (24, 48, 72, 96 saat) bağlı olarak çalışıldı.

4.1.3.1. İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) T98G Hücre Kültürlerinde Kabazitaksel'in Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

10^{-8} M CTX'le muamele edilen 2B T98G hücre kültürlerinde 24, 48 ve 72 saatte anlamlı sitotoksik etki saptanmazken ($p > 0.05$) 96 saatte anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.0001$). 3B T98G hücre kültürlerinde ise 24 ve 72 saatte anlamlı sitotoksik etki belirlenmedi ($p > 0.05$). 48 ve 96 saatlerde anlamlı sitotoksik etki belirlendi ($p <$

0.0001). 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ve 10^{-4} M CTX'le muamele edilen 2B ve 3B T98G hücre kültürlerinde 24, 48, 72 ve 96 saatte anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.0001$). Konsantrasyon ve zamana bağlı tüm % sitotoksosite değerleri Tablo 4.1 ve Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'de gösterildi. İlacın, hücelere uygulandığı konsantrasyon ve zaman aralığında IC_{50} değerlerinin 2B ve 3B kültürler için sırasıyla 48 ve 72 saat olarak hesaplandı. Calcusy 2.1 (Biosoft, UK) programında hesaplanan saat IC_{50} değerleri Tablo 4.2'de gösterildi. IC_{50} değerlerinin görüldüğü zamandaki sitotoksik etkinin 3D Surface Plot grafiği çizildi (Şekil 4.6).

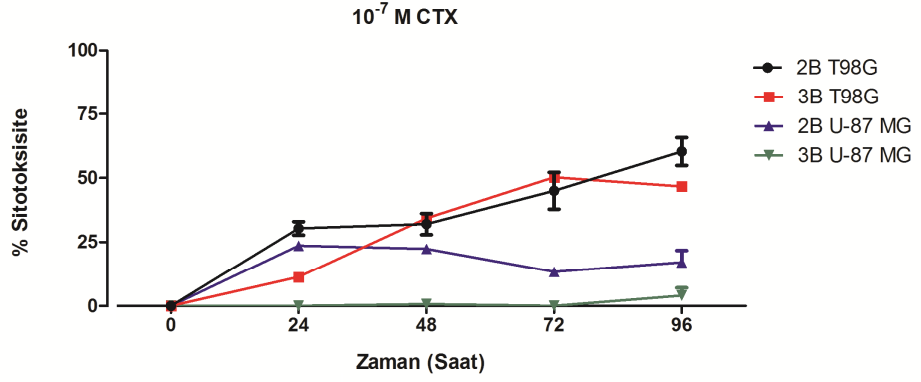
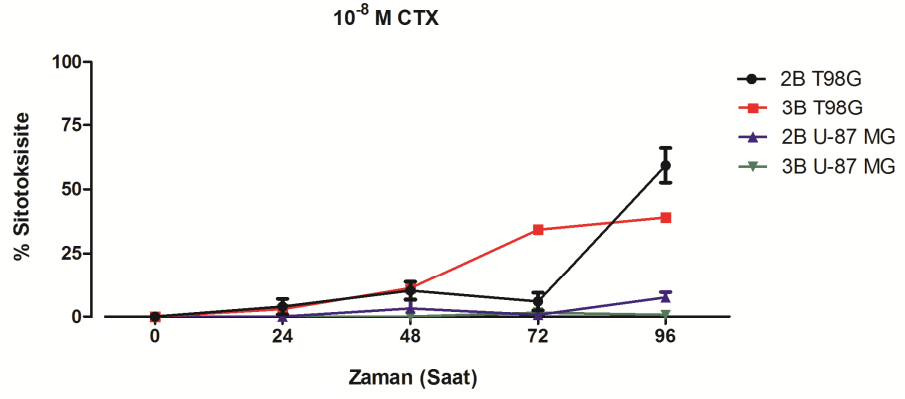
4.1.3.2. İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) U-87 MG Hücre Kültürlerinde Kabazitaksel'in Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

10^{-8} M CTX'le muamele edilen 2B ve 3B U-87 MG hücre kültürlerinde 24, 48, 72 ve 96 saatte anlamlı sitotoksik etki saptanmadı ($p > 0.05$). 10^{-7} M CTX'le muamele edilen 2B U-87 MG hücre kültürlerinde 24 saatte anlamlı sitotoksik etki saptanmazken 48, 72 ve 96 saatte anlamlı sitotoksik etki belirlendi ($p < 0.0001$). 10^{-7} M CTX'le muamele edilen 3B U-87 MG hücre kültürlerinde ise 24, 48, 72, 96 saatlerde anlamlı sitotoksik etki saptanmadı. 10^{-6} M CTX'le muamele edilen 2B U-87 MG hücre kültürlerinde 24 ve 96 saatte anlamlı sitotoksik etki belirlenmezken ($p > 0.05$) 48 ve 72 saatte anlamlı sitotoksik etki belirlendi ($p < 0.0001$). 10^{-6} M CTX'le muamele edilen 3B U-87 MG hücre kültürlerinde ise 24, 48, 72 ve 96 saatte anlamlı sitotoksik etki belirlenmedi ($p > 0.05$). 10^{-5} M CTX'le muamele edilen 2B U-87 MG hücre kültürlerinde 24, 72, 96 saatte anlamlı sitotoksik etki saptanırken ($p < 0.0001$), 48 saatte anlamlı sitotoksik etki belirlenmedi ($p > 0.05$). 10^{-5} M CTX'le muamele edilen 3B U-87 MG hücre kültürlerinde 24, 48 saatte anlamlı sitotoksik etki belirlenmedi ($p > 0.05$). 72 ve 96 saatte anlamlı sitotoksik etki belirlendi ($p < 0.0001$). 10^{-4} M CTX'le muamele edilen 2B ve 3B U-87 MG hücre kültürlerinde 24, 48, 72 ve 96 saatte anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.0001$). Konsantrasyon ve zamana bağlı tüm % sitotoksosite değerleri Tablo 4.1 ve Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'de gösterildi. İlacın, hücelere uygulandığı konsantrasyon ve zaman aralığında IC_{50} değerlerinin 2B ve 3B kültürler için sırasıyla 72 ve 96 saat olarak hesaplandı. Calcusy 2.1 (Biosoft, UK) programında hesaplanan saat

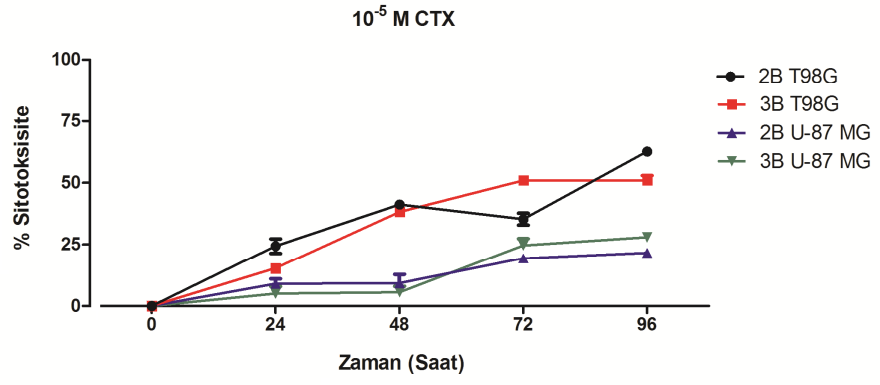
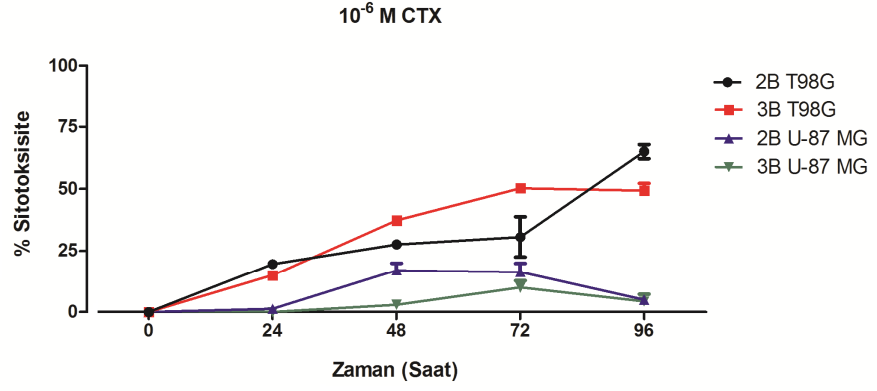
IC₅₀ değerleri Tablo 4.2’de gösterildi. IC₅₀ değerlerinin görüldüğü zamandaki sitotoksik etkinin 3D Surface Plot grafiği çizildi (Şekil 4.7).

Tablo 4.1. İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültürleri yapılan ve Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilen GBM (T98G ve U-87 MG) hücrelerinin % sitotoksiteleri (% S).

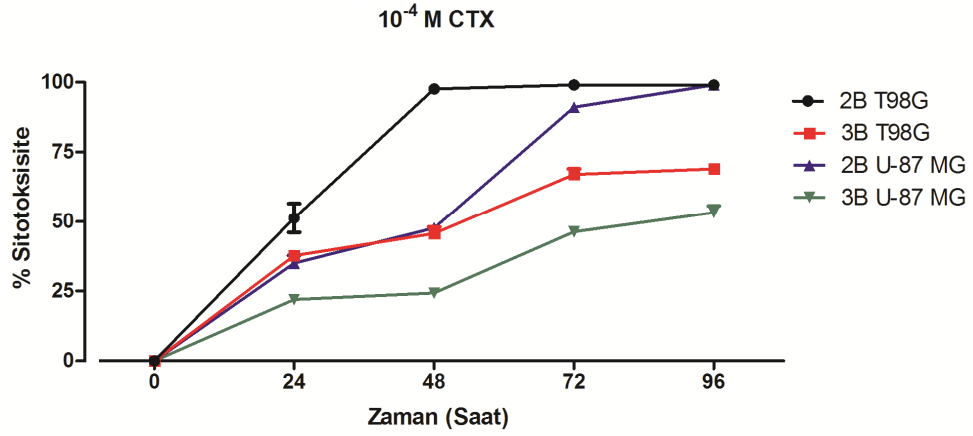
T98G Hücre Kültürü										
Konsantrasyon (CTX)	10⁻⁸ M		10⁻⁷ M		10⁻⁶ M		10⁻⁵ M		10⁻⁴ M	
Zaman (Saat)	2B % S	3B % S	2B % S	3B % S	2B % S	3B % S	2B % S	3B % S	2B % S	3B % S
24	4,00	3,00	27,00	11,33	19,67	15,00	24,33	15,33	48,00	37,67
48	13,67	11,33	32,00	34,33	25,67	37,33	41,33	38,33	97,67	45,67
72	6,000	23,33	45,00	50,33	30,67	50,33	39,00	51,00	99,00	67,00
96	59,33	39,00	60,33	46,67	65,00	49,33	62,67	51,00	99,00	69,00
U-87 MG Hücre Kültürü										
Konsantrasyon (CTX)	10⁻⁸ M		10⁻⁷ M		10⁻⁶ M		10⁻⁵ M		10⁻⁴ M	
Zaman (Saat)	2B % S	3B % S	2B % S	3B % S	2B % S	3B % S	2B % S	3B % S	2B % S	3B % S
24	0,00	1,00	23,67	1,00	1,33	1,00	9,00	5,00	35,00	25,50
48	3,33	1,00	18,33	1,00	17,00	3,00	9,333	5,56	47,67	39,50
72	0,6667	1,67	13,33	1,00	16,33	8,33	19,33	24,67	91,00	98,50
96	7,667	1,67	17,00	4,00	5,00	4,33	21,67	28,00	99,00	99,00



Şekil 4.3. İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde 10^{-8} ve 10^{-7} M Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilen T98G ve U-87 MG hücre serilerinin sitotoksisitelerinin karşılaştırılması.



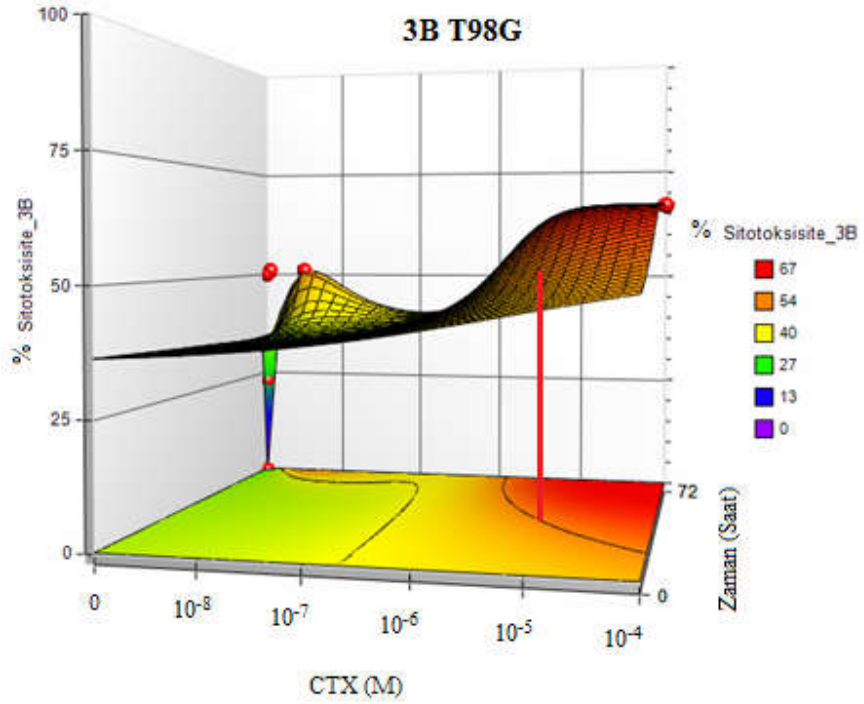
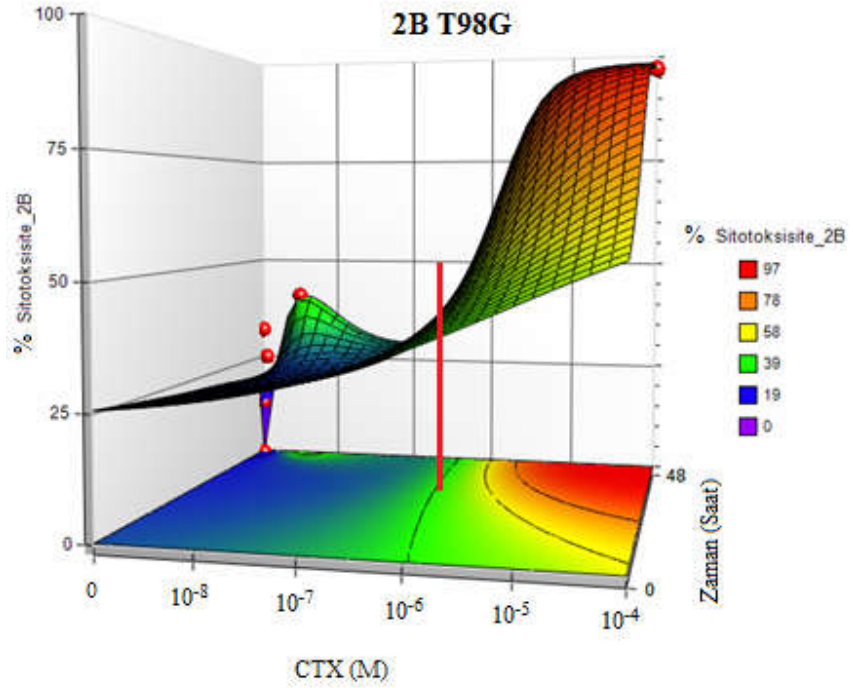
Şekil 4.4. İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde 10⁻⁶ ve 10⁻⁵ M Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilen T98G ve U-87 MG hücre serilerinin sitotoksisitelerinin karşılaştırılması.



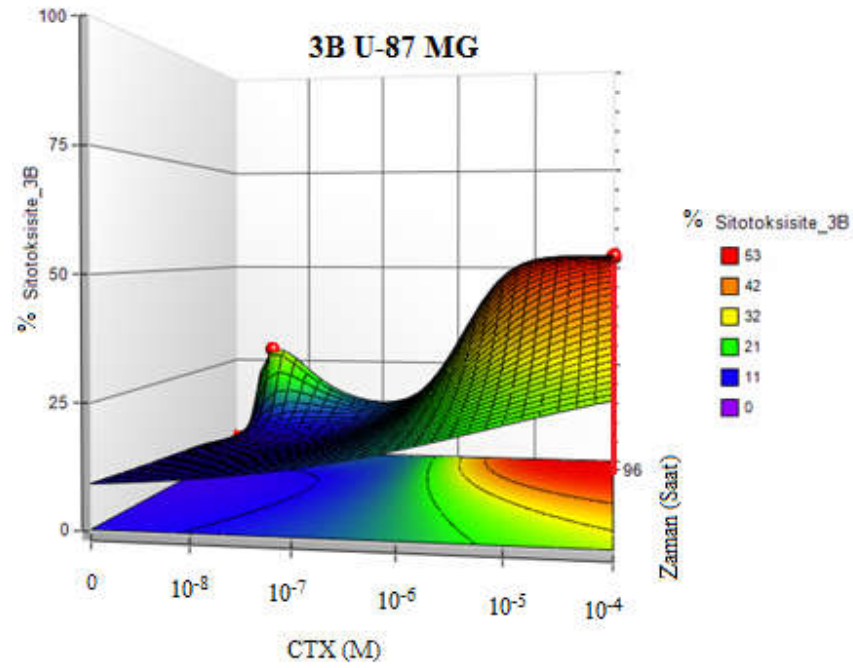
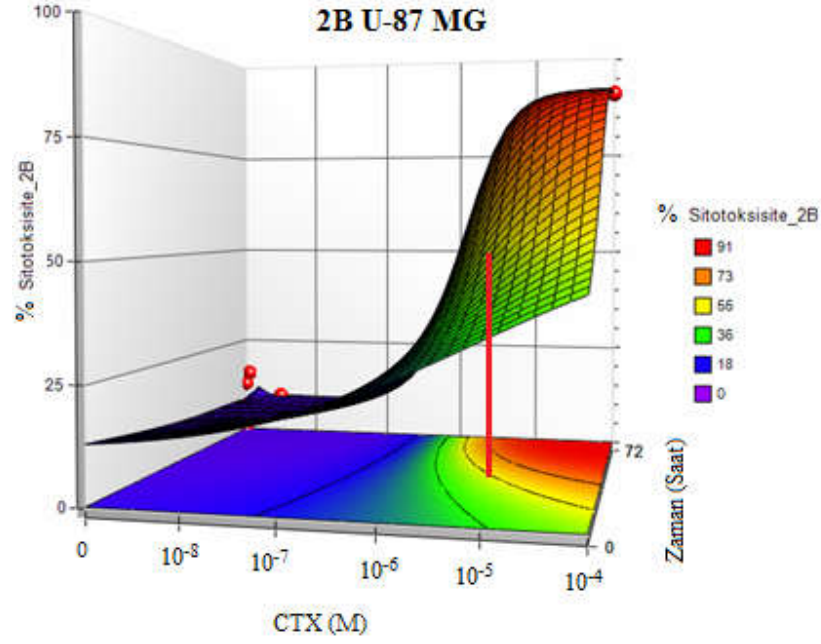
Şekil 4.5. İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde 10⁻⁴ M Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilen T98G ve U-87 MG hücre serilerinin sitotoksitelerinin karşılaştırılması.

Tablo 4.2. Kabazitaksel (CTX) ile muamele edilmiş iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) T98G ve U-87 MG hücre serilerinin IC₅₀ değerleri (± standart hata).

GBM Hücre Serisi	T98G		U-87 MG	
	2B (µM)	3B (µM)	2B (µM)	3B (µM)
Zaman (Saat)				
48	1 ± 0.7	-	-	-
72	-	13.98 ± 2.83	9.825 ± 3.47	-
96	-	-	-	92.4 ± 5.93



Şekil 4.6. Kabazitaksel'in (CTX) iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) T98G hücre kültürlerinde IC_{50} değerlerinin 3D Surface Plot grafiğiyle karşılaştırılması (IC_{50} bölgeleri dikey kırmızı çizgi ile işaretlenmiştir).



Şekil 4.7. Kabazitaksel'in (CTX) iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) U-87 MG hücre kültürlerinde IC_{50} değerlerinin 3D Surface Plot grafiğiyle karşılaştırılması (IC_{50} bölgeleri dikey kırmızı çizgi ile işaretlenmiştir).

4.1.4. İki Boyutlu (2B) Kùltürleri Yapılan T98G ve U-87 MG Hùcre Serilerinde 10^{-5} ve 10^{-4} M Kabazitaksel Uygulamasında Gùzlenen Etkinin Araştırılması

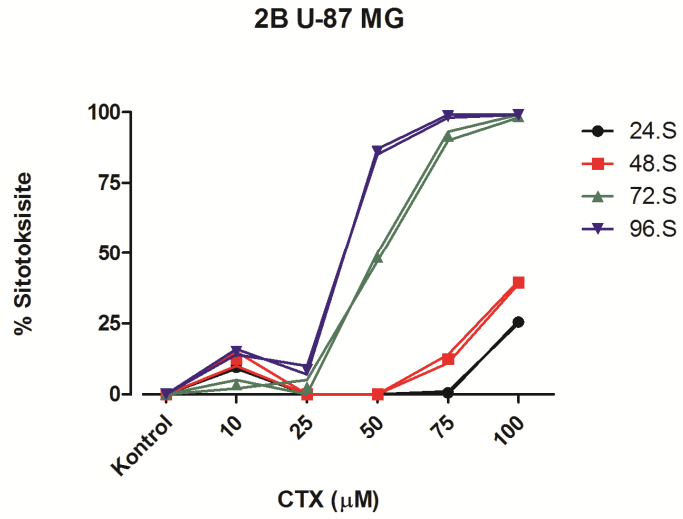
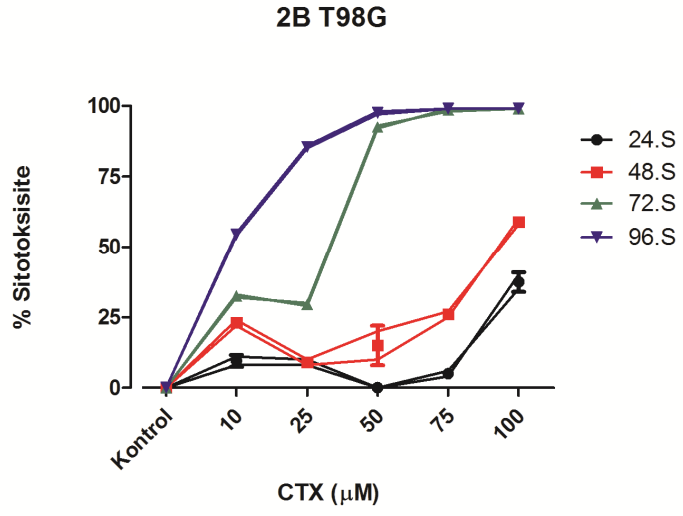
10^{-5} ve 10^{-4} M arasında gùzlenen etkinin ayrıntılı araştırılması amacıyla bu aralık her iki hùcre serisinde 10, 25, 50, 75, 100 μ M olarak genişletildi.

T98G hùcrelerinde 24. saatte 10 μ M - 75 μ M aralığındaki konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki saptanmadı ($p > 0.05$). 100 μ M'da kontrol hùcreleriyle karşılaştırıldığında anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.01$). 48. saatte 10 μ M - 50 μ M aralığında anlamlı sitotoksik etki saptanmadı ($p > 0.05$). 75 μ M ve 100 μ M'da anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.01$). 72. ve 96. saatte 10 μ M - 100 μ M aralığındaki tüm konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.01$). Konsantrasyon ve zamana bağlı tüm % sitotoksisite değerleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.8'de gùsterildi.

U-87 MG hùcrelerinde 24. saatte 25 μ M - 75 μ M aralığında anlamlı sitotoksik etki saptanmadı ($p > 0.05$). 10 μ M ve 100 μ M'da anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.01$). 48. saatte 25 μ M ve 50 μ M'da anlamlı sitotoksik etki saptanmadı ($p > 0.05$). 10 μ M, 75 μ M ve 100 μ M'da anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.01$). 72. saatte 10 μ M ve 25 μ M'da anlamlı sitotoksik etki saptanmadı ($p > 0.05$). 50 μ M, 75 μ M ve 100 μ M'da anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.01$). 96. saatte 10 μ M - 100 μ M aralığındaki tüm konsantrasyonlarda anlamlı sitotoksik etki saptandı ($p < 0.01$). Konsantrasyon ve zamana bağlı tüm % sitotoksisite değerleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.8'de gùsterildi.

Tablo 4.3. Kabazitaksel (CTX, 10 - 100 μ M) ile muamele edilen T98G ve U-87 MG hücre serilerinin iki boyutlu (2B) hücre kültürlerinde % sitotoksiteleri (% S).

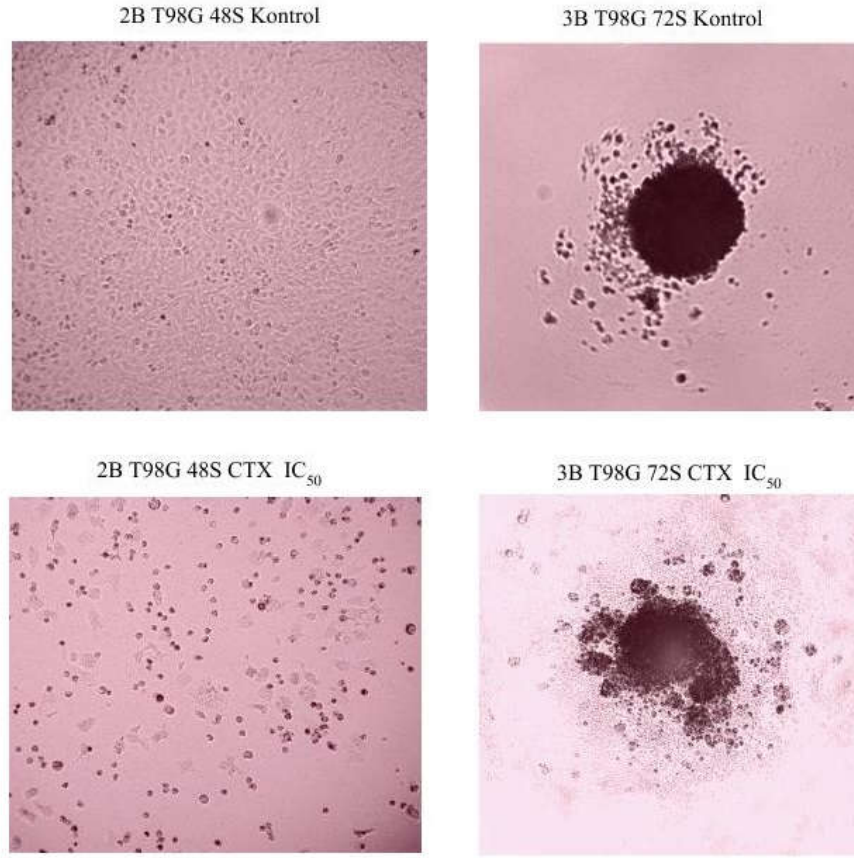
Konsantrasyon (CTX)	10 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M	
	T98G % S	U-87 MG % S	T98G % S	U-87 MG % S	T98G % S	U-87 MG % S	T98G % S	U-87 MG % S	T98G % S	U-87 MG % S
Zaman (Saat)										
24	9,500	9,500	9,000	0,00	0,00	0,00	5,000	0,50	37,50	25,50
48	23,00	12,50	9,500	0,00	15,00	0,00	26,00	10,50	59,00	39,50
72	32,50	3,500	29,50	2,500	92,50	48,50	98,50	91,50	99,00	98,50
96	54,50	15,00	85,50	8,500	97,50	86,00	99,00	98,50	99,00	99,00



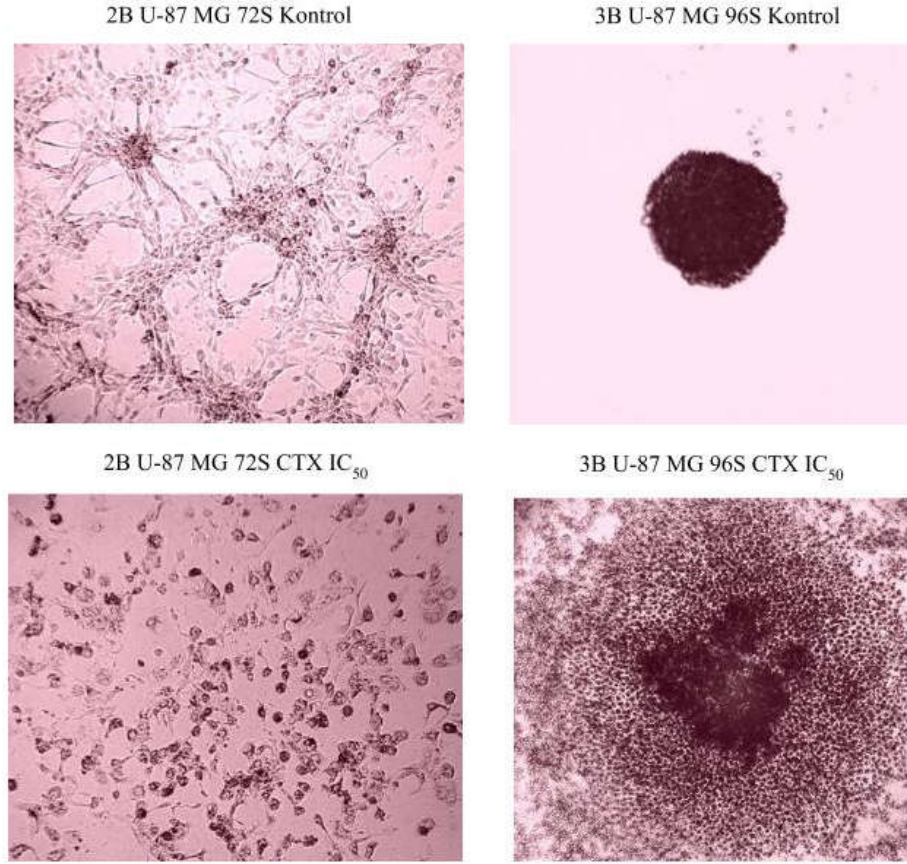
Şekil 4.8. T98G ve U-87 MG hücre serilerinin iki boyutlu (2B) kültürlerinde Kabazitaksel'in (CTX) 10-100 µM konsantrasyon aralığındaki sitotoksik etkisi.

4.1.5. İki Boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) Kùltürleri Yapılan T98G ve U-87 MG Hücre Serilerinde Kabazitaksel Aracılı Sitotoksisiteye Bağlı Değişikliklerin Faz-Kontrast Mikroskobunda Görüntülenmesi

Hücre hatları ve kùltürlerine ait CalcuSyn 2.1 (Biosoft, İngiltere) yazılımında hesaplanan IC_{50} değerlerinin işaret ettiği sitotoksisitenin bağımsız bir yöntemle doğrulanması için hücre ve sferoid morfolojisinde sitotoksisiteye bağlı değişiklikler faz kontrast mikroskobunda görüntüledi. Buna göre 2B hücrelerde kontrol hücrelerine göre IC_{50} konsantrasyonlarıyla muamele edilen hücrelerde azalma ve morfolojik farklılaşma görüldü. 3B hücrelerde kontrole göre IC_{50} konsantrasyonlarıyla muamele edilen sferoidlerde hücresel ayrılma gözlemlendi T98G hücre serisine ait sonuçlar Şekil 4.9'da , U-87 MG hücre serisine ait sonuçlar Şekil 4.10'da gösterildi.



Şekil 4.9. Kabazitaksel'in (CTX) IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) T98G hücre kültürlerinin morfolojik olarak karşılaştırılması [48 Saat (S) ve 72 Saat (S), Büyütme Oranı: 40X].



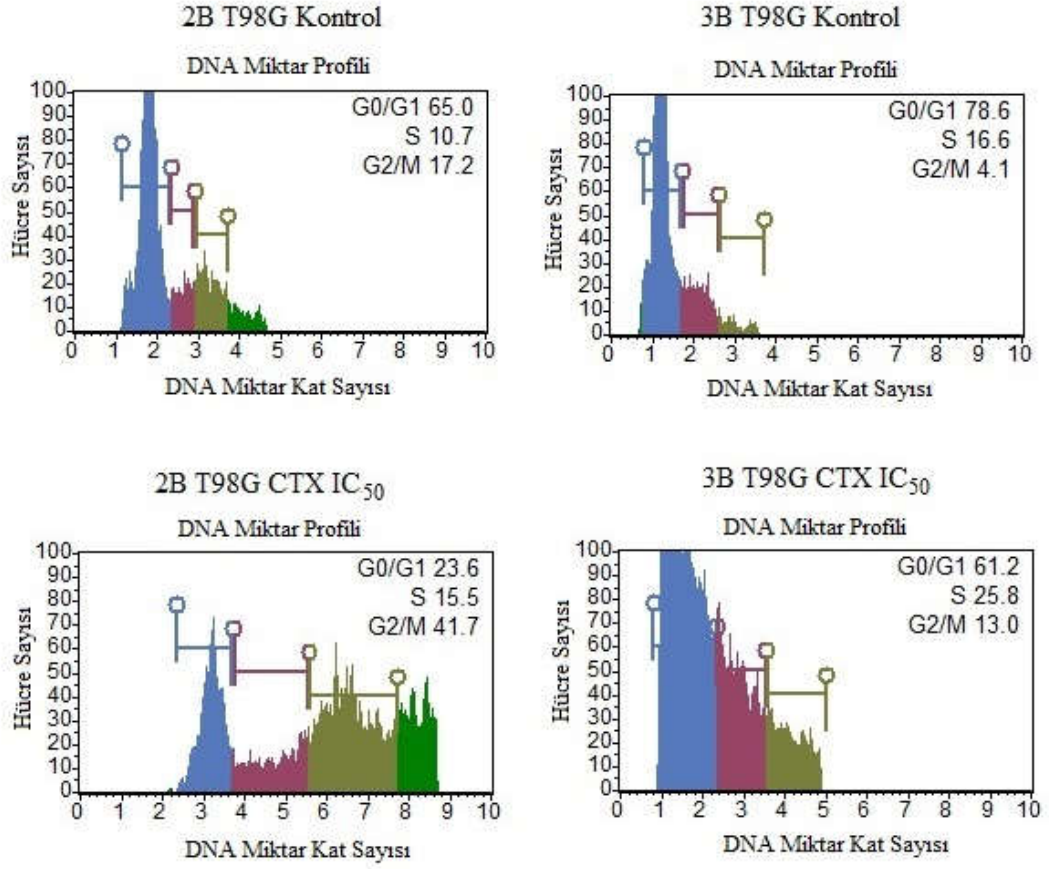
Şekil 4.10. Kabazitaksel'in (CTX) IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) U-87 MG hücre kültürlerinin morfolojik olarak karşılaştırılması [72 Saat (S) ve 96 Saat (S), Büyütme Oranı: 40X].

4.1.6. Kabazitaksel ile Muamele Edilmiş T98G ve U-87 MG Hücre Serilerinin İki Boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) Kültürlerinde Hücre Döngüsü Evrelerinin Karşılaştırılmalı Analizi

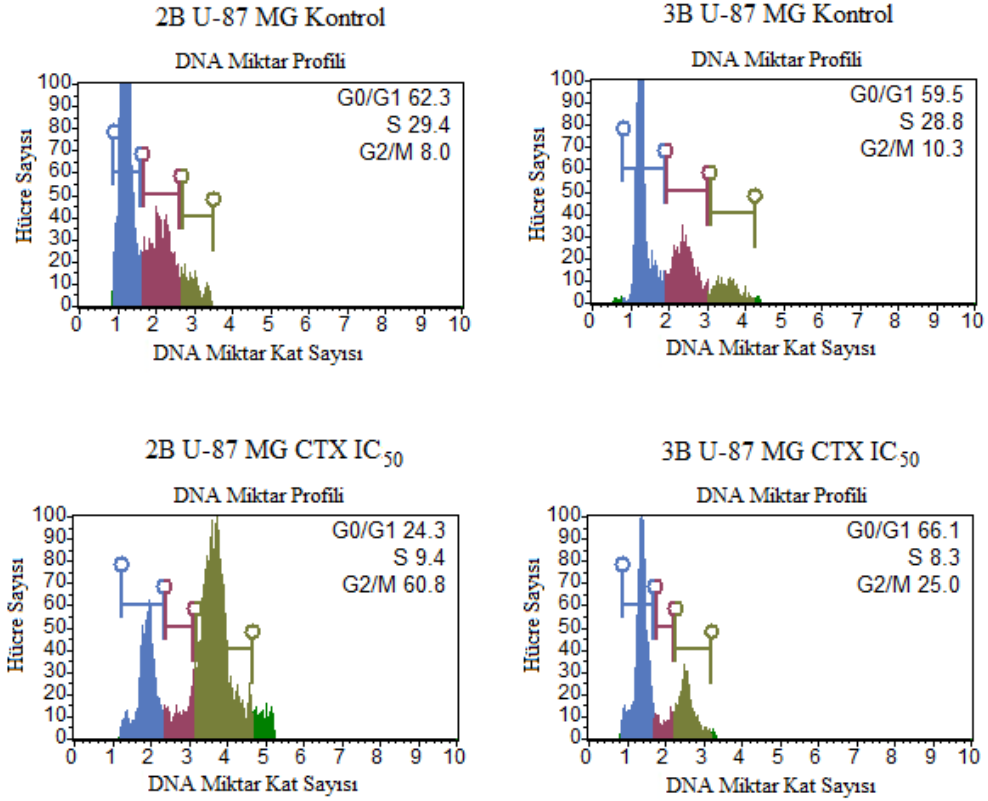
2B ve 3B GBM hücre kültürlerinin Muse Hücre Analiz cihazında Muse™ Cell Cycle Kit protokolüne uygun olarak analizleri yapıldı ve sonuçlar T98G hücre serisi için Şekil 4.11, U-87 MG hücre serisi için Şekil 4.12'de gösterildi. Kontrol hücreleri ve ilacın her hücre serisinde uygulandığı IC₅₀ konsantrasyonuna göre popülasyonun hücre döngüsü evrelerine göre yüzde dağılımı Tablo 4.4'de gösterildi.

Tablo 4.4. Kabazitaksel'in (CTX) IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre serilerinin hücre döngüsü evrelerine ait yüzdelerin karşılaştırılması.

GBM Hücre Hatları	T98G				U-87 MG			
	<i>Kontrol</i>		<i>CTX IC₅₀</i>		<i>Kontrol</i>		<i>CTX IC₅₀</i>	
	2B	3B	2B (1 μ M)	3B (13,98 μ M)	2B	3B	2B (9,825 μ M)	3B (92,4 μ M)
% G0/G1	65	78.6	23.6	61.2	62.3	59.5	24.3	66.1
% S	10.7	16.6	15.5	25.8	29.4	28.8	9.4	8.3
% G2	17.2	4.1	41.7	13	8	10.3	60.8	25



Şekil 4.11. Kabazitaksel'in (CTX) IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) T98G hücre kültürlerinde hücre döngüsü evrelerinin karşılaştırılmalı analizi [2B IC₅₀: 1 µM, 3B IC₅₀: 13.98 µM (Muse Hücre Analiz cihazından elde edilen veriler)].



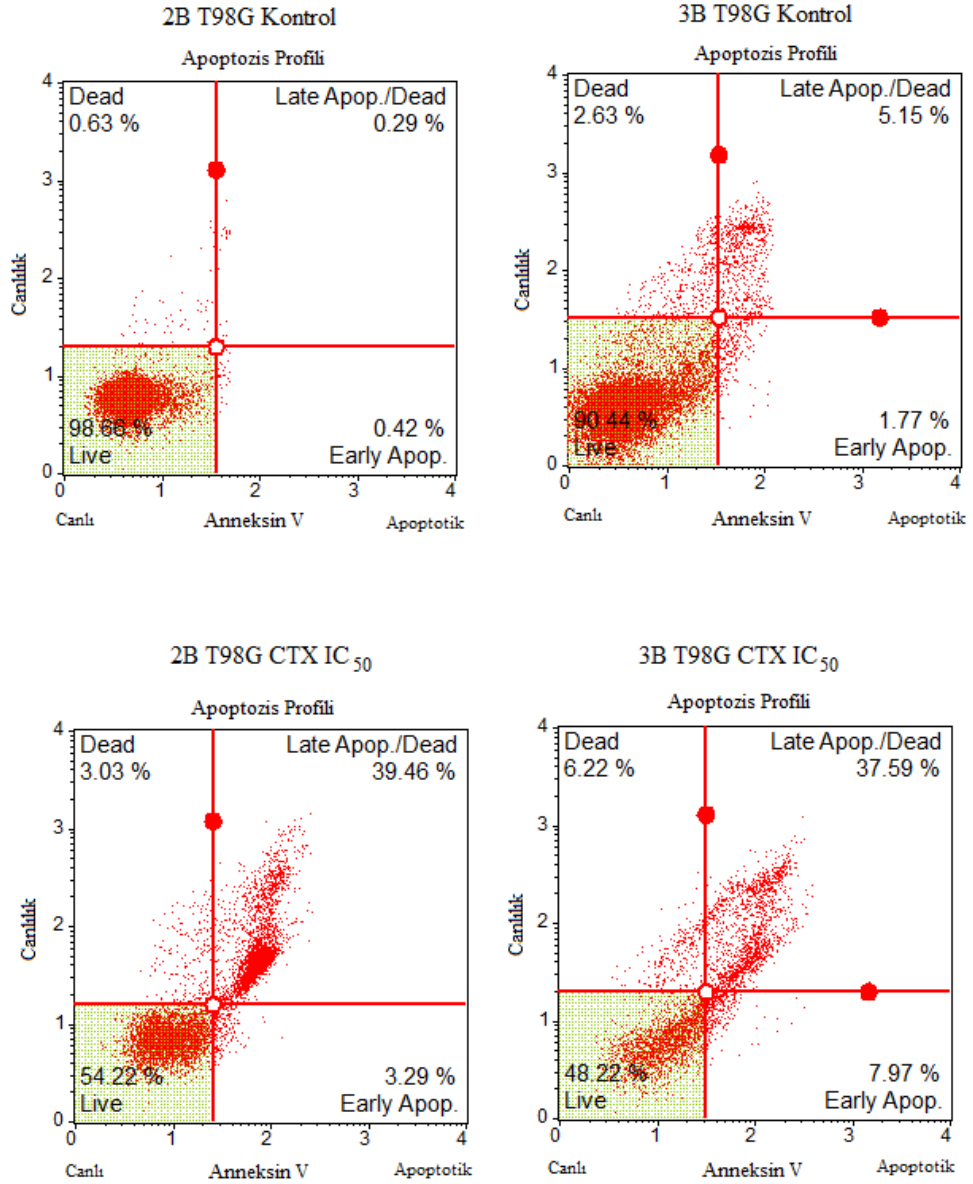
Şekil 4.12. Kabazitaksel'in (CTX) IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilen iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) U-87 MG hücre kültürlerinde hücre döngüsü evrelerinin karşılaştırılmalı analizi [2B IC₅₀: 9.825 µM, 3B IC₅₀: 92.4 µM (Muse Hücre Analiz cihazından elde edilen veriler)].

4.1.7. Kabazitaksel ile Muamele Edilmiş T98G ve U-87 MG Hücre Serilerinin İki boyutlu (2B) ve Üç Boyutlu (3B) Kültürlerinde Apoptozisin Karşılaştırılmalı Analizi

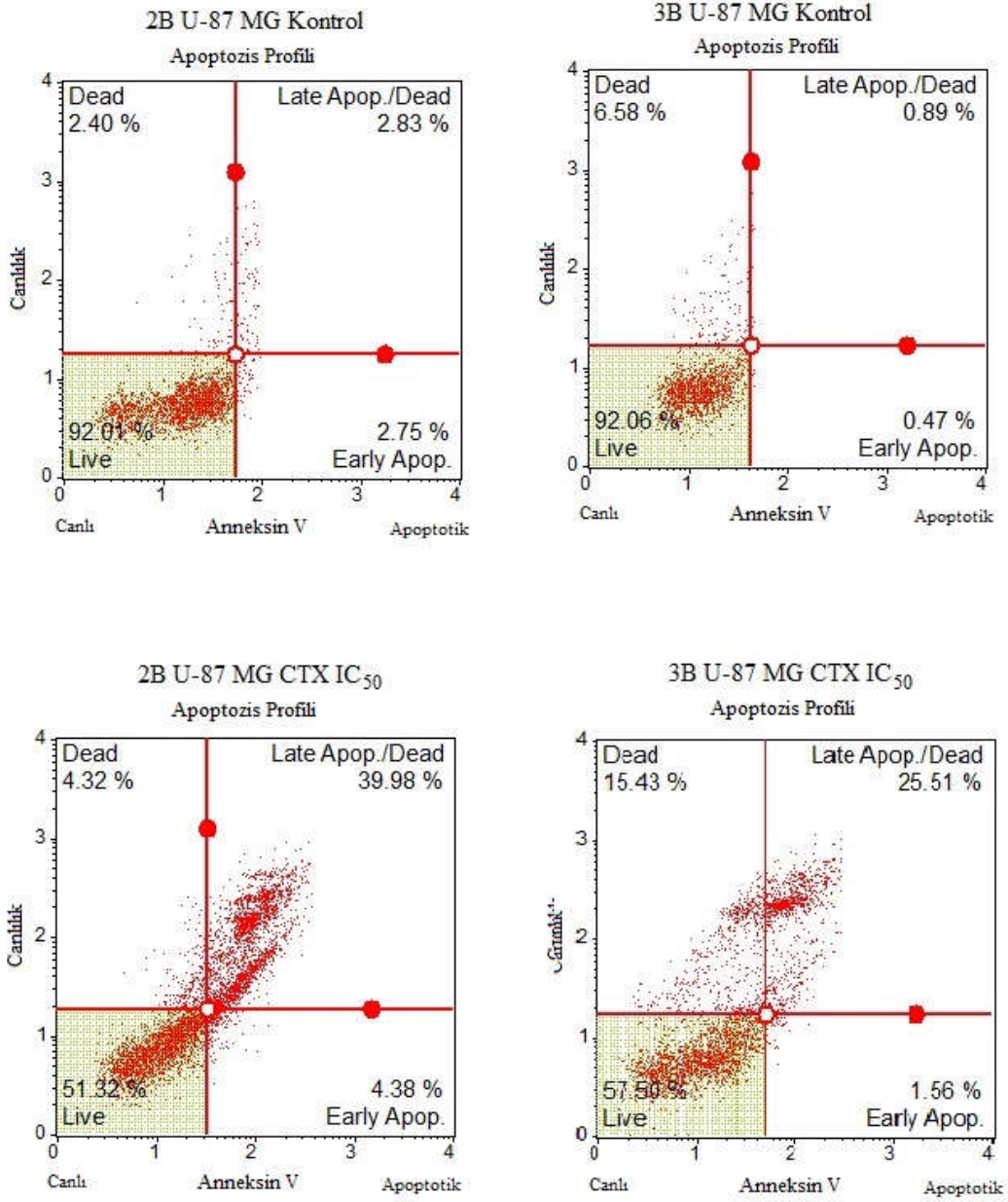
2B ve 3B GBM hücre kültürlerinin Muse Hücre Analiz cihazında Muse® Annexin V & Dead Cell Kit protokolüne uygun olarak analizleri yapıldı ve sonuçlar T98G hücre serisi için Şekil 4.13'de U-87 MG hücre serisi için Şekil 4.14'de gösterildi. Buna göre tüm kontrol gruplarında canlılık %90'nın üzerinde ölçüldü. İlacın her hücre serisinde uygulandığı IC₅₀ konsantrasyonuna göre hücrelerde görülen hücre ölümünün apoptozis aracılı gerçekleştiği saptandı. Buna göre hücrelerin canlılık, erken apoptozis, geç apoptozis ve ölü hücre yüzdeleri Tablo 4.5'de gösterildi.

Tablo 4.5. Kabazitaksel'in (CTX) IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kültürleri yapılan T98G ve U-87 MG hücre serilerinin canlılık ve apoptotik yüzdelerinin karşılaştırılması.

GBM Hücre Hatları	T98G				U-87 MG			
	Kontrol		CTX IC ₅₀		Kontrol		CTX IC ₅₀	
	2B	3B	2B (1 μM)	3B (13,98 μM)	2B	3B	2B (9.825 μM)	3B (92.4 μM)
% Canlı	98,66	90,44	54,22	48,22	92,01	92,06	51,32	57,50
% Erken Apoptotik	0,42	1,77	3,29	7,97	2,75	0,47	4,38	1,56
% Geç Apoptotik	0,29	5,15	39,46	37,59	2,83	0,89	39,98	25,51
% Ölü	0,63	2,63	3,03	6,22	2,40	6,58	4,32	15,43



Şekil 4.13. İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde Kabazitaksel'in (CTX) IC₅₀ konsantrasyonuyla (2B IC₅₀: 1 µM, 3B IC₅₀: 13.98 µM) muamele edilen T98G hücrelerinin apoptotik evrelerinin karşılaştırılması (Muse Hücre Analiz cihazından elde edilen veriler).



Şekil 4.14. İki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) hücre kültürlerinde Kabazitaksel'in (CTX) IC₅₀ konsantrasyonu ile (2B IC₅₀: 9.825 µM, 3B IC₅₀: 92.4 µM) muamele edilen U-87 MG hücrelerinin apoptotik evrelerinin karşılaştırılması (Muse Hücre Analiz cihazından elde edilen veriler).

4.2. Tartışma

In vitro çalışmalarda kullanılmak üzere üretilmiş ve özellikleri tanımlanmış çok sayıda insan GBM hücre serisi bulunmaktadır. Bunlar içerisinde en yaygın kullanılan GBM hücre serileri U-87 MG ve T98G'dir [41]. Hücre döngüsünün kontrolünde önemli rolü olan p53'ün T98G'de mutant, U-87 MG'de yabancıl tip olması ve farklı hücre serilerinde sitotoksik etkileri gösterilmiş olan CTX'in kullanılan GBM hücre serileri üzerindeki etkilerine ait herhangi bir verinin bulunamamış olması nedeniyle bu tez çalışmasında T98G ve U-87 MG hücre serileri kullanılmıştır [86, 87, 89].

Hücrelerin kültür ortamında üç boyutluluğu oluşturmasını sağlayan faktörler fiziksel, kimyasal ve topolojik faktörlerdir. *In vivo* çalışmalar yönünden deney hayvanlarıyla yapılan araştırmalarda insan tümörleri, hücre-ilaç cevapları, otoimmün hastalıklar ve kök hücre farklılaşması gibi özellikler hücre kültürlerinde olduğu kadar kontrollü çalışılmamaktadır. Hayvan deneylerinin sadece karmaşık değil aynı zamanda yüksek maliyetli olması ve uzun zaman alması nedeniyle de özellikle sitotoksikite araştırmalarında *in vitro* 3B kültürler kontrol edilebilirlik, maliyet, zaman ve kolay uygulanma açısından daha doğru bir seçim olmaktadır [6, 96]. Sitotoksikite çalışmaları için kullanılan en temel *in vitro* model 2B (monolayer) hücre kültürleri olduğundan bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Ancak 2B kültürde *in vivo*ya benzemeyen hücre polarizasyonu ve hücre-hücre etkileşimleri görülmesi, azalan reseptör sayısına bağlı sinyalizasyon kaybının elde edilecek verileri de farklılaştıracağı öngörüldüğü için bu özellikleri sağlayan 3B hücre kültürü modeli de kullanılmış ve iki *in vitro* modelden elde edilen veriler karşılaştırılmıştır.

Asılı damla yöntemi en eski ve en yaygın kullanılan 3B hücre kültürü yöntemlerinden biridir. Dışarıdan ECM molekülleri gibi her hangi bir substrat eklenmeden hücrelerin bir damla içerisinde çoğalmalarını sağlayan asılı damla yöntemi, sadece tek bir sferoidin çoğaltılıp besiyeri değişimine de olanak sağlaması yönüyle özellikle sitotoksikite çalışmalarında avantaj sağlamaktadır. Kullanılan GBM serilerinin sıkı ve sert bir sferoid formasyonu oluşturması ve bu formasyonu matrikse ihtiyaç duymadan oluşturmaları nedeniyle asılı damla yöntemi tercih edilmiştir. Ayrıca bu

yöntemde sferoid aktarımı ve görüntüleme de kısa sürede kolaylıkla yapılmaktadır [13, 14].

Muse Hücre Analiz cihazı canlılık, apoptozis, otofaji, hücre döngüsü ve immünoloji araştırmaları için kullanımı kolay ve kısa sürede sonuç veren bir cihazdır. Apoptozis ölçümü için en yaygın kullanılan Anneksin V ve 7-AAD boyaarı bu cihazın kendi kitinde tek bir solüsyon halinde bulunur ve böylece ayrı bir solüsyon karışımı hazırlamaya gerek duymadan hücre işaretlemesi gerçekleştirilir. Aynı zamanda hücre döngüsü kiti de PI ve RNase A'nın bulunduğu tek bir solüsyonu bulundurmaktadır [97, 98, 99, 100]. Cihaz analiz sonucu olan apoptozis ve hücre döngüsü evrelerinin yüzdelerini kısa sürede (yaklaşık 15-45 saniye) vermektedir. Cihazın kendine ait yazılımı sayesinde istatistiksel analiz de kolay ve kısa sürede yapılmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasının amaç ve hedefleri doğrultusunda Muse Hücre Analiz cihazı ve uygun testler kullanıldı.

3B hücre kültürü çalışmasının optimizasyonu için 96 kuyucuklu asılı damla plakalarında protokolde tanımlanan en yüksek besiyeri hacmi 50 µL (45 µL hücre süspansiyonu, 5 µL ilaç) olduğundan dolayı hacim de 50 µL olarak ayarlandı. 50 µL besiyeri yettiği halde 5×10^2 ve 10^3 hücrenin seçilmemesinin nedeni canlılık ölçümü için gereken XTT testi solüsyonunun mitokondriyel aktiviteyle oluşan renk değişiminin çok uzun süre alması (yaklaşık 24 saat) ve absorbans ölçüm katsayılarının da düşük olmasıdır. Ayrıca diğer bir neden tekrar deneylerinde yapılacak dilüsyon hatalarını en aza indirerek deney hassasiyetini artırmaktır. Ekilen 5×10^3 ve 10^4 hücreye toplam 168 saat (7 gün) boyunca 50 µL besiyerinin yetmediği ve hücrelerin bu nedenle 96-120 saat içerisinde öldüğü gözlemlendi. XTT testinde ölçülen absorbans değerlerinin daha düşük olmasının nedeni hücrelerin öldükleri için mitokondriyel aktivitenin de olmaması şeklinde yorumlandı. Hücrelerin sferoid oluşturana kadar (72 saat) 45 µL içerisinde, ilaçla muamelelerinden itibaren 50 µL olan hacimde 96 saat daha optimum koşulları sağlaması için çalışılacak hücre sayısı 3×10^3 olarak optimize edildi.

Taksan grubu ilaçlarla yapılan *in vitro* sitotoksosite çalışmalarında PTX, DTX ve CTX'in aynı mekanizma üzerinden çalıştıkları gösterilmiştir [57]. Ancak PTX ve DTX'le yapılan uzun süreli çalışmalarda kanser hücrelerinde ilaç direnci olduğu

bildirilmiştir [57, 101]. CTX'in P-gp (P-glikoprotein) afinitesinin diğer taksan grubu ilaçlara kıyasla daha az olması ve kan beyin bariyerinden geçebilmesi GBM tedavisine yönelik ileriki çalışmalar için önem taşımaktadır [61].

3B kültürlerde yapılan sitotoksikite çalışmalarında IC₅₀ değerlerinin çoğunlukla 2B kültürlerle göre daha yüksek olduğu görülmeye rağmen daha düşük çıktığı çalışmalar da bulunmaktadır. Her iki durumda da iki kültür modelinden elde edilen verilerin farklılaştığı görülmektedir [19, 21, 102]. İnsan kolon kanseri hücre serisi HCT-116'nın 2B ve 3B kültürlerinde PTX'in sitotoksik etkisinin hesaplandığı bir çalışmada 2B kültürlerdeki IC₅₀ değerinin 3B kültürlerden yaklaşık 12 kat daha az olduğu bildirilmiştir (2B IC₅₀: 1.74 nM, 3B IC₅₀: 12.48 nM) [103]. İnsan meme kanseri hücre serisi MCF-7'de PTX ile yapılan başka bir çalışmada 3B kültürlerin 2B kültürlerle göre PTX'e daha fazla direnç gösterdikleri bildirilmiştir [104]. Bu tez çalışmasında da 2B ve 3B kültür modelleri yapılan iki ayrı GBM (T98G, U-87 MG) hücre serilerinde CTX'e ait hesaplanan IC₅₀ değerlerinin de farklılaştığı görülmüştür. Hesaplanan 2B GBM kültürlerinin IC₅₀ değerlerinin 3B GBM kültürlerinden daha düşük olduğu saptanmıştır (T98G 2B: 1 µM, 3B: 13.98 µM; U-87 MG 2B: 9.825 µM, 3B: 92.4 µM).

Yapılan çalışmaların çoğunda taksan grubu ilaçlarla muamele edilen hücre serilerinin G2/M fazında duraksayarak apoptozise gittikleri gösterilmiştir. PTX'in lösemi (U937, K562) ve meme (MCF-7) kanseri hücre serilerindeki hücre döngüsüne etkileri araştırıldığında U937'nin G2/M aralığında apoptozise gittiği bildirilmiştir [56]. CTX'in HN30 ve HN12 baş-boyun kanseri hücre serilerinde G2/M geçişini durdurarak apoptozisi tetiklediği bildirilmiştir [89]. Bu tez çalışmasında CTX'in 2B kültürleri T98G'de % 41.7, U-87 MG'de % 60.8 oranında G2/M evresinde durdurduğu saptanmıştır. Ancak 3B kültürleri T98G'de % 61.2, U-87 MG'de % 66.1 oranında G0/G1 evresinde durdurduğu belirlenmiştir. Bu durum 3B sferoid kültürlerinin *in vivo* benzeri morfoloji oluşturdıkları için daha fazla reseptöre sahip olarak gen ekspresyonu ve düzenlenmesinin de hassasiyetinin 2B kültürlerle göre arttığı şeklinde yorumlandı. Böylece 3B kültürlerde hücre döngüsü daha erken bir evrede (G0/G1) durarak buradan apoptozisin tetiklendiği düşünülmektedir. Ayrıca hücre döngüsünün G2/M evresinden sonra DNA miktarının 4N ve üzerinde olduğu bir hücre popülasyonu saptanmıştır. Bu

durumun mitozun CTX aracılı durdurulmasıyla hücrelerde sitokinezin gerçekleşmemesi nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Kontrol hücrelerindeki benzer durum da hücrelerdeki genomik kararsızlık nedeniyle oluşan kromozomal anomalilerden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır.

Apoptotik evrelemede CTX'in 2B ve 3B kültürlerde çoğunlukla apoptozisi tetiklediği saptanmıştır [Erken apoptotik ve geç apoptotik evrelerinin toplam yüzdeleri: 42.75 (2B T98G), 45.56 (3B T98G), 44.36 (2B U-87MG), 27.07 (3B U-87 MG)]. 3B U-87 MG hücrelerinde % 27.07 oranında apoptozisin yanı sıra diğer kültürlerde ölçülenden daha yüksek oranda (% 15,43) nekrotik nükleer debris saptanmıştır [3.03 (2B T98G), 6.22 (3B T98G), 4.32 (2B U-87MG)]. 3B kültürlerde Muse Hücre Analiz cihazıyla yapılan apoptosis evreleme çalışmalarında sadece 7-AAD bağlanmasıyla belirlenen nükleer debrisin nekrotik hücreleri gösterdiğine yönelik öngörüler vardır [98, 105]. Yapılan 3B kültür (sferoid) çalışmalarında sferoidlerin *in vivoda* oluşan solid tümörlerdeki yapıya oldukça benzeyen en dışta çoğalan, ortada çoğalmayan ve en içte nekrotik hücrelerin toplandığı üç katmandan oluştuğu görülmüştür [106]. Bu nedenle ölü veya nükleer debris evresinde görülen hücre yüzdelerinin özellikle 3B kültürlerde (sferoidlerde) nekrotik hücreler olabileceği öngörülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

- 3B hücre kültürü yöntemleri içerisinde asılı damla yöntemi GBM hücre kültürleri için uygun olduğu saptanmıştır (3000 hücre, 50 μ L besiyerinde, sferoid oluşumundan sonra 96 saatlik deney süresi).
- 2B ve 3B kültürleri yapılan GBM hücre serilerinde (T98G, U-87 MG) CTX'in sitotoksik etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilerek iki kültüre ait sitotoksikite verilerinin anlamlı düzeyde farklılaştığı saptanmıştır (IC_{50} değerleri, T98G 2B: 1 μ M, 3B: 13.98 μ M; U-87 MG 2B: 9.825 μ M, 3B: 92.4 μ M).
- CTX'in GBM hücre serilerinde *in vitro* (2B ve 3B) hücre kültürleriyle hücre döngüsü karşılaştırılmalı olarak ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir [Hücre döngüsü evrelerine ait yüzdeler: 2B T98G için 23.6 (G0/G1), 15.5 (S), 41.7 (G2/M), 3B T98G için 61.2 (G0/G1), 25.8 (S), 13 (G2/M); 2B U-87MG 24.3 (G0/G1), 9.4 (S), 60.8 (G2/M), 3B U-87MG için, 66.1 (G0/G1), 8.3 (S), 25(G2/M)].
- CTX'in GBM hücre serilerinde *in vitro* (2B ve 3B) hücre kültürleriyle apoptozis evrelemesi yapılarak karşılaştırılmalı olarak ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir (Erken ve geç apoptotik evre yüzdeleri sırasıyla, T98G 2B: 3.29, 39.46 3B: 7.97, 37.59; U-87 MG 2B: 4.38, 39.98 3B: 1.56, 25.51).
- 2B monolayer kültürlerle elde edilen sitotoksik verilerin anlam ve geçerliliğini artırmak için 3B sferoid kültürler yapılmasına ihtiyaç olduğu bu çalışmada deneysel olarak gösterilmiştir.

Hücre kültürlerinin ilaç araştırmalarındaki önemi öncül veri elde edilmesidir. *In vitro* verilerin *in vivo*ya benzerliği sorgulanabilir olduğundan 3B hücre kültürlerinin *in vivo*ya benzerlik açısından ara bir çözüm olarak kullanılabilceği araştırmacılar tarafından kabul görmektedir. Bu çalışma gerek tasarımı gerekse 2B, 3B GBM kültürlerinde CTX'in hücre sel etkilerinin karşılaştırılması yönünden ülkemizde öncül çalışmalardan biridir.

In vitro 3B kültürlerde (gliomasferlerde), GBM tedavisinde kullanılabilcek antitümoral ajanların etki mekanizmalarını araştırırken, CD44 (hücre-hücre etkileşimlerinde ve hücre adezyonunda görevli antijen) ve hyaluronik asit'in (HA-hücre invazyonunda önemli) olası rolleri de incelenmeye değerdir. Ayrıca bu çalışmanın bulguları ışığında yapılacak *in vitro* sitotoksisite çalışmalarının, verilerin *in vivo*ya benzerliği ve maliyet-yarar açısından sadece 2B değer aynı zamanda 3B kültürler ile birlikte yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Pickover, C.A. Surfing Through Hyperspace. Ed: Kirk Jensen. Oxford University Press, New York, USA, 1999, 3-20.
2. Bissell, M.J., Bilder, D. Polarity determination in breast tissue: desmosomal adhesion, myoepithelial cells, and laminin 1. *Breast Cancer Research*. 2003, 5, 117-119.
3. Assémat, E., Bazellières E., Pallesi-Pocachard, E., Bivic, A.L., Massey-Harroche, D. Polarity complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, 1778, 614-630.
4. Chen, J., Zhang, M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Experimental Cell Research*. 2013, 319, 1357-1364.
5. <https://nanohub.org/site/resources/2012/07/14875/slides/005.02.jpg> (22.09.2015, 20.42)
6. Li, Z., Cui, Z. Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnology Advances*. 2014, 32, 243–254.
7. Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1997, 64, 295-312.
8. Tibbitt, M. W., Anseth, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3d cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009, 103(4), 655-663
9. Friedl, P., Brèocker, E. B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2000, 57(1), 41-64.
10. Schmeichel, K. L., Bissell, M. J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *Journal of Cell Science*. 2003, 116(12), 2377-2388.
11. Szot, C. S., Buchanan, C. F., Freeman, J.W., Rylander, M. N. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials*. 2011, 32 (31), 7905-7912.
12. Barralet, J. E., Wang, L., Lawson, M., Triffitt, J. T., Cooper, P. R., Shelton, R. M. Comparison of bone marrow cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2005, 16, 515-519.
13. Thoma, C. R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J. M., Krek, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, 69-70, 29-41.

14. Hsiao, C., Tomai, M., Glynn, J., Palecek, S. P. Effects of 3-D microwell culture on initial fate specification in human embryonic stem cells. *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 2014, 60(4), 1225-1235.
15. Xu, X., Farach-Carson, M. C., Jia, X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnology Advances*. 2014, 32, 1256-1268.
16. Ziolkowska, K., Stelmachowska, A., Kwapiszewski, R., Chudy, M., Dybko, A., Brzozka, Z. Long-term three-dimensional cell culture and anticancer drug activity evaluation in a microfluidic chip. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013, 40. 68–74.
17. Xu, Z., Gao, Y., Hao, Y., Li, E., Wang, Y., Zhang, J., Wang, W., Gao, Z., Wang, Q. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials*. 2013, 34, 4109-4117.
18. Bal-price, A., Hogberg, H. T. *In vitro toxicology systems*. Ed: Anna Bal-Price, Paul Jennings. Humana Press, New York, USA, 2014, 127.
19. Bonnier, F., Keating, M. E., Wróbel T. P., Majzner, K., Baranska, M., Garcia-Munoz, A., Blanco, A., Byrne, H. J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology In Vitro*. 2015, 29, 124-131.
20. Lee, D. W., Yi, S. H., Jeong, S. H., Ku, B., Kim, J., L, M. Y. Plastic pillar inserts for three-dimensional (3D) cell cultures in 96-well plates. *Sensors and Actuators B*. 2013, 177, 78–85.
21. Sambalea, F., Lavrentieva, A., Stahl, F., Blumea, C., Stiesch, M., Kasper, C., Bahnemann, D., Scheper, T. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *Journal of Biotechnology*. 2015, Article in Press.
22. Ramaiahgari, S. C., den Braver, M. W., Herpers, B., Terpstra, V., Commandeur, J. N., van de Water, B., Price, L. S. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver like properties for repeated dose high throughput toxicity studies. *Archives of Toxicology*. 2014, 88(5), 1083-1095.
23. You, M., Peng, G., Li, J., Ma, P., Wang, Z., Shu, W., Peng, S., Chen, G. Q. Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds coated with PHA granule binding protein PhaP fused with RGD peptide. *Biomaterials*. 2011, 32, 2305-2313.
24. Baharvand, H., Hashemi, S. M., Ashtiani, S. K., Farrokhi, A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *The International Journal of Developmental Biology*. 2006, 50, 645-652.
25. Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., Paul-Solomon F. D. 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal Of Cellular Physiology*. 2015, 230(1), 16-26.

- 26.** Sowa, M. B., Chrisler, W. B., Zens, K. D., Ashjian, E. J., Opresko, L. K. Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells. *Mutation Research*. 2010, 687, 78–83.
- 27.** Van Tellingen. O., Yetkin-Arik, B., de Gooijer, M. C., Wesseling, P., Wurdinger, T., de Vries, H. E. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resistance Updates*. 2015, 19, 1–12.
- 28.** Jhanwar-Uniyal, M., Labagnara, M., Friedman, M., Kwasnicki, A., Murali R. Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers*. 2015, 7, 538-555.
- 29.** Bozkurt, E., Atmaca, H., Uzunoğlu, S. Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci. *Genel Tıp Dergisi*. 2013, 23, 133-143.
- 30.** Parker, N. R., Khong, P., Parkinson, J. F., Howell, V. M, Wheeler, H. R. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Frontiers in Oncology*. 2015, 5(55), 1-9.
- 31.** Louis, D. N. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology. *Brain Pathology*. 1997, 7, 755-764.
- 32.** Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A. Jr., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008, 321(5897), 1807-1812.
- 33.** Bredel, M., Pollack, I. F., Hamilton, R. L., James, C. D. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clinical Cancer Research*. 1999, 5, 1786-1792.
- 34.** Pedron, S., Becka, E., Harley, B. A. C. Regulation of glioma cell phenotype in 3D matrices by hyaluronic acid. *Biomaterials*. 2013, 34, 7408-7417.
- 35.** Cooper, G. M., Hausman, R. E. *The cell: a molecular approach*. ASM Press, Washington D. C., USA, 2007, 650-655.
- 36.** Wiranowska, M., Rojiani, M. V. Extracellular matrix microenvironment in glioma progression. *Glioma - Exploring Its Biology and Practical Relevance*. Ed: Dr. Anirban Ghosh. InTech Press, Croatia, 2011, 257-284.
- 37.** Stein, G. H. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *Journal of Cell Physiology*. 1979, 99, 43-54.

- 38.** Park, C. M., Park, M. J., Kwak, H. J., Moon, S. I., Yoo, D. H., Lee, H. C., Park, I. C., Rhee, C. H., Hong, S.I. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. *International Journal Of Oncology*. 2006, 28, 119-125.
- 39.** Adachi, J., Ohbayashi, K., Suzuki, T., Sasaki, T. Cell cycle arrest and astrocytic differentiation resulting from PTEN expression in glioma cells. *Journal of Neurosurgery*. 1999, 91(5), 822-830.
- 40.** Streffer, J. R., Rimner, A., Rieger, J., Naumann, U., Rodemann, H. P., Weller, M. BCL-2 family proteins modulate radiosensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*. 2002, 56(1), 43-49.
- 41.** Clark, M. J., Homer, N., O'Connor, B. D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., Merriman, B., Nelson, S. F. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genetics*. 2010, 6(1).
- 42.** Cerrato, J. A., Yung, W. K. A., Liu T-J. Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53-induced apoptosis. *Neuro-Oncology*. 2001, 3(2), 113-122.
- 43.** Park, M. J., Kim, M. S., Park, I. C., Kang, H. S., Yoo, H., Park, S. H., Rhee, C. H., Hong, S. I., Lee, S. H. PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation. *Cancer Research*. 2002, 1;62(21), 6318-6322.
- 44.** Bojes, H. K., Suresh, P. K., Mills, E. M., Spitz, D. R., Sim, J. E., Kehrer, J. P. Bcl-2 and Bcl-xL in peroxide-resistant A549 and U87MG cells. *Toxicological Sciences*. 1998, 42(2), 109-116.
- 45.** Weller, M., Rieger, J., Grimm, C., Van Meir, E. G., De Tribolet, N., Krajewski, S., Reed, J. C., von Deimling, A., Dichgans, J. Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *International Journal of Cancer*. 1998, 18;79(6), 640-644.
- 46.** Karp, G. *Cell and molecular biology*. Wiley Press, New Jersey, USA. 2010, 561-576.
- 47.** Kollareddy, M., Dzubaka, P., Zhelevab, D., Hajdich, M. Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*. 2008, 152(1), 27-33.
- 48.** Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter P. *Molecular Biology Of The Cell*. Garland Science Press, New York, USA. 2008, 1060-1066.

49. Alexander, B. M., Pinnell, N., Wen, P. Y., D'Andrea, A. Targeting DNA repair and the cell cycle in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*. 2012, 107:463–477.
50. Lam, P. Y. P., di Tomaso, E., Ng, H.-K., Pang, J. C. S., Roussel, M. F., Hjelm, N. M. Expression of p19 INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. *British Journal of Neurosurgery*. 2000, 14(1), 28-32.
51. Rollbrocker, B., Waha, A., Louis, D. N., Wiestler, O. D., von Deimling, A. Amplification of the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) gene is associated with high cdk4 protein levels in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathologica*. 1996, 92(1)i 70-74.
52. Yamashita, Y., Kasugai, I., Sato, M., Tanuma, N., Sato, I., Nomura, M., Yamashita, K., Sonoda, Y., Kumabe, T., Tominaga T., Katakura, R., Shima H. CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. *Journal of Neuro-Oncology*. 2010, 100(1), 43-49.
53. Forte, S., Pagliuca, A., Maniscalchi, E. T., Gulino, R., Calabrese, G., Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Signore, M., Parenti, R., De Maria, R., Gulisano, M. Gene expression analysis of PTEN positive glioblastoma stem cells identifies DUB3 and Wee1 modulation in a cell differentiation model. *PLoS One*. 2013, 8(12), 1-6.
54. Cecchini, M. J., Amiri, M., Dick, F. A. Analysis of Cell Cycle Position in Mammalian Cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, 59.
55. <http://www.phnxflow.com/Introduction%20to%20Cell%20Cycle%20Analysis.pdf> (13.09.2015, 15.58).
56. Abal, M., Souto, A. A., Amat-Guerri, F., Acuña, A. U., Andreu, J. M., Barasoain, I. Centrosome and spindle pole microtubules are main targets of a fluorescent taxoid inducing cell death. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 2001, 49(1), 1-15.
57. Attard, G., Greystoke, A., Kaye, S., De Bono, J. Update on tubulin-binding agents. *Pathologie Biologie*. 2006, 54, 72–84.
58. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, Newyork, USA, 2013, 827-829.
59. <http://www.nature.com/scitable/content/types-of-microtubules-involved-in-mitosis-14752887> (13.09.2015,20:04).
60. Paller, C. J., Antonarakis, E. S. Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Design, Development and Therapy*. 2011, 10(5), 117-124.

- 61.** Kingston, D. G. I. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *Journal of Natural Products*. 2009, 72(3), 507–515.
- 62.** Jordan M. A., Toso, R. J., Thrower, D., Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993, 90, 9552-9556.
- 63.** Das, G. C., Holiday, D., Gallardo, R., Haas, C. Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Letters*. 2001,165, 147-153.
- 64.** Mita, A. C., Figlin, R., Mita, M. M. Cabazitaxel: more than a new taxane for metastatic castrate-resistant prostate cancer? *Clinical Cancer Research*. 2012, 18(24), 6574-6579.
- 65.** Liao P-C., Lieu, C-H. Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life Sciences*. 2005, 76, 1623-1639.
- 66.** http://www.thelancet.com/cms/attachment/2001023367/2003879723/gr1_lrg.jpg (23.09.2015, 13.20)
- 67.** <http://nexcelom.cn/Literature/image-cytometry-for-the-comparison-of-trypan-blue-and-fluorescence-based-cellular-viability.pdf> (13.10.2015, 17:39)
- 68.** Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. 2005, 11, 127-152.
- 69.** Zembruski, N.C.L., Stache, V., Haefeli, W. E., Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical Biochemistry*. 2012, 429, 79–81.
- 70.** Ding, Q., Bao, J., Zhao, W., Hu, Y., Lu, J., Chen, X. Natural autophagy regulators in cancer therapy: a review. *Phytochemistry Reviews*. 2015, 14(1),137-154.
- 71.** Chen, N., Karantza-Wadsworth, V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 1793, 1516–1523.
- 72.** Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. Classification of cell death. *Cell Death & Differentiation*. 2009, 16(1), 3–11.
- 73.** Fragkos, M., Beard, P. Mitotic catastrophe occurs in the absence of apoptosis in p53-null cells with a defective G1 checkpoint. *PLoS One*. 2011, 6(8), 1-12.

- 74.** Yoshino Y., Ishioka C. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta induces apoptosis and mitotic catastrophe by disrupting centrosome regulation in cancer cells. *Scientific Reports*. 2015, 5(13249), 1-14.
- 75.** Martinez, M. M., Reif, R. D., Pappas, D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*. 2010, 2, 996-1004.
- 76.** Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007, 35, 495-516.
- 77.** Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology*. 2005, 84, 627-639.
- 78.** Fulda, S., Debatin, K-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006, 25, 4798-4811.
- 79.** Kutuk, O., Letai, A. Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Research*. 2008, 68(19), 7985-7994.
- 80.** Archana, M., Bastian, Yogesh, T. L., Kumaraswamy, K. L. Various methods available for detection of apoptotic cells- a review. *Indian Journal of Cancer*. 2013, 50(3). 274-283.
- 81.** Dervaux, T., Porro, C., Kunzelmann, C., Freyssinet J. M., Martínez, M. C. Cyclic GMP modulates store-operated calcium entry inducing phosphatidylserine translocation at the surface of megakaryocytic cells. *Biochimie*. 2006, 88, 1175-1182.
- 82.** Wlodkovic, D., Telford, W., Skommer, J., Darzynkiewicz, Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods in Cell Biology*. 2011, 103, 55-98.
- 83.** <http://www.biocat.com/cell-biology/apoptosis/apoptosis-detection-phosphatidylserin-annexin-based> (20.09.2015, 16.00).
- 84.** Krysko, D. V., VandenBerghe, T., D'Herde, K., Vandenabeele, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008, 44, 205-221.
- 85.** Chan, F. K-M., Moriwaki, K., De Rosa M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase (LDH) activity. *Methods in Molecular Biology*. 2013, 979, 65-70.
- 86.** Pal, S. K., Lewis, B., Sartor, O. Management of docetaxel failures in metastatic castrate resistant prostate cancer. *Urologic Clinics of North America*. 2012, 39(4), 583-591.

- 87.** Vrignaud, P., Sémond, D., Lejeune, P., Bouchard, H., Calvet, L., Combeau, C., Riou, J. F., Commerçon, A., Lavelle, F., Bissery, M. C. Preclinical antitumor activity of cabazitaxel, a semisynthetic taxane active in taxane-resistant tumors. *Clinical Cancer Research*. 2013,19, 2973-2983.
- 88.** Cisternino, S., Bourasset, F., Archimbaud, Y., Sémond, D., Sanderink, G., Scherrmann, J. M. Nonlinear accumulation in the brain of the new taxoid TXD258 following saturation of P-glycoprotein at the blood–brain barrier in mice and rats. *British Journal of Pharmacology* 2003, 138, 1367-1375.
- 89.** Yoo, G. H., Kafri, Z., Ensley, J. F., Lonardo, F., Kim, H., Folbe, A. J., Won, J., Stevens, T., Lin, H. S. XRP6258-induced gene expression patterns in head and neck cancer carcinoma. *Laryngoscope*. 2010, 120(6), 1114-1119.
- 90.** Villanueva, C., Bazan, F., Kim, S., Demarchi, M., Chaigneau, L., Thiery-Vuillemin, A., Nguyen, T., Cals, L., Dobi, E., Pivot, X. *Drugs*. 2011, 71(10), 1251-1258.
- 91.** Sémond, D., Sidhu, S. S., Bissery, M. C., Vrignaud, P. Can taxanes provide benefit in patients with CNS tumors and in pediatric patients with tumors? An update on the preclinical development of cabazitaxel. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2013, 72(3), 515-528.
- 92.** Mita, A. C., Denis, L. J., Rowinsky, E. K., Debono, J. S., Goetz, A. D., Ochoa, L., Forouzes, B., Beeram, M., Patnaik, A., Molpus, K., Semiond, D., Besenval, M., Tolcher, A. W. Phase I and pharmacokinetic study of XRP6258 (RPR 116258A), a novel taxane, administered as a 1-hour infusion every 3 weeks in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2009, 15, 723-730.
- 93.** Pal, S. K., Twardowski, P., Sartor, O. Critical appraisal of cabazitaxel in the management of advanced prostate cancer. *Clinical Interventions in Aging*. 2010, 5, 395-402.
- 94.** <https://3dbiomatrix.com/features/> (01.10.2015, 23:04).
- 95.** https://www.emdmillipore.com/INTERSHOP/static/WFS/Merck-Site/Merck/en_US/Freestyle/BI-Bioscience/Cell-Analysis/Muse/product-muse-cell-analyzer.jpg (30.09.2015, 14.50)
- 96.** Sung, K. E., Beebe, D. J. Microfluidic 3D models of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014, 79-80, 68-78.
- 97.** Saleh, A. M., El-Abadelah, M. M., Aziz, M. A., Taha, M. O., Nasr, A., Rizvi, S. A. Antiproliferative activity of the isoindigo 5'-Br in HL-60 cells is mediated by apoptosis, dysregulation of mitochondrial functions and arresting cell cycle at G0/G1 phase. *Cancer Letters*. 2015, 361, 251-261.
- 98.** Hornung, A., Poettler, M., Friedrich, R. P., Zaloga, J., Unterweger, H., Lyer, S., Nowak, J., Odenbach, S., Alexiou, C., Janko, C. Treatment efficiency of free and

nanoparticle-loaded mitoxantrone for magnetic drug targeting in multicellular tumor spheroids. *Molecules*. 2015, 20, 18016-18030.

99. Taddei, M. L., Giannoni, E., Morandi, A., Ippolito, L., Ramazzotti, M., Callari, M., Gandellini, P., Chiarugi, P. Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Communication and Signaling*. 2014, 12:24, 1-12.

100. Aboud, O. A., Wettersten, H. I., Weiss, R. H. Inhibition of PPAR α induces cell cycle arrest and apoptosis, and synergizes with glycolysis inhibition in kidney cancer cells. *PLoS One*. 2013, 8(8), 1-9.

101. Katsetos, C. D., Pavel Dráber, P., Kavallaris, M. Targeting III-tubulin in glioblastoma multiforme: from cell biology and histopathology to cancer therapeutics. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2011, 11, 719-728.

102. Lee, D. W., Yi, S. H., Jeong, S. H., Ku, B., Kim, J, L, M. Y. Plastic pillar inserts for three-dimensional (3D) cell cultures in 96-well plates. *Sensors and Actuators B*. 2013, 177, 78-85.

103. Rimann M, Laternser S, Gvozdenovic A, Muff R, Fuchs B, Kelm JM, Graf-Hausner U. An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. *Journal of Biotechnology*. 2014, 189, 129-135.

104. Hakanson, M., Textor, M., Charnley, M. Engineered 3D environments to elucidate the effect of environmental parameters on drug response in cancer. *Integrative Biology*. 2011, 3, 31-38.

105. Prajapati, S. K., Shrivastava, S., Bihade, U., Gupta, A. K., Naidu, V. G. M., Banerjee, U. C., Babu, B. N. Synthesis and biological evaluation of novel Δ^2 -isoxazoline fused cyclopentane derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. *Medicinal Chemistry Communication*. 2015, 6, 839-845.

106. Kim, J. B., Stein, R., O'Hare, M. J. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer – a review. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004, 85, 281-291.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Özge ÖZER

Doğum Yeri, Yılı: Antakya, 1989

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

E-posta: ozerozgeozer@gmail.com

Eğitim Durumu

- **Yüksek Lisans** Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AD, Moleküler Biyoloji Programı, 2013-
- **Lisans** Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2008-2013
- **Lise** Balıkesir Fatma Emin Kutvar Anadolu Lisesi, 2003-2007

Projeler

- **Yüksek Lisans Tez Projesi.** İki ve Üç Boyutlu Glioblastoma Multiforme Hücre Kültürlerinde (U-87 MG, T98G) Kabazitaksel'in Hücresel Etkilerinin Karşılaştırılmalı Analizi. Danışman: Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU. Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Ş. Burçak KARACA. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2015-TIP-037 (Araştırmacı) (TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı ile desteklenmiştir)*
- **Araştırma Projesi.** İnsan Sisplatin Dirençli Yumurtalık Kanseri Hücre Hattında (SKOV-3) Sisplatin/Kabazitaksel Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Ve Hücre Ölümü Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2015-TIP-039. (Araştırmacı).*

- **Araştırma Projesi.** Thioridazine/Docetaxel Kombinasyonunun Meme Kanseri Kök Hücre ve Meme Kanseri Hücre Kültürlerindeki Sitotoksik, Apoptotik ve Epitelyal Mezenkimal Geçiş Olaylarındaki Etkilerinin Araştırılması. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2013-TIP-089. (Araştırmacı).*
- **Araştırma Projesi (Lisans Bitirme Tezi).** Biyolojik Saatin Genetik Boyutu. Danışman: Prof. Dr. Selim UZUNOĞLU, 2012.

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

- **Özge Özer**, Selim Uzunoğlu. İki ve üç boyutlu glioblastoma hücre kültürlerinde kabazitaksel'in hücresel etkilerinin karşılaştırılmalı analizi. *XIV. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2015, Ölüdeniz, Fethiye.*
- Ezgi Ersöz, **Özge Özer**, Osman Burak Can, Selim Uzunoğlu, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. Monolayer ve gliomasfer insan glioblastoma multiforme kültürlerinde tiyoridazin'in sitotoksik etkisinin karşılaştırılması. *XIV. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2015, Ölüdeniz, Fethiye.*
- Atike Pinar, **Özge Özer**, Burçak Karaca, Emir Bozkurt, Ruchan Uslu. Cytotoxic effects of cabazitaxel on human gliomaspheres and monolayer glioma cells: A comparative study between 2D and 3D cell cultures. *2015 ASCO Annual Meeting 30 Mayıs – 2 Haziran 2015 Chicago, Illinois, USA.*
- Sürmeli Z, Bozkurt E, **Özer O**, Atmaca H, Kisim A, Uzunoglu S, Uslu R, Karaca B. Enhancement of docetaxel efficacy by zoledronic acid pretreatment in docetaxel-resistant prostate cancer cells (PC-3/R and DU-145/R). *2014 ASCO Annual Meeting 30 Mayıs - 3 Haziran 2014 Chicago, Illinois, USA.*
- Zeki Sürmeli, Atike Pınar, Emir Bozkurt, Harika Atmaca, **Özge Özer**, Selim Uzunoğlu, Ulus Ali Şanlı, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. Sinerjistik Docetaksel/Octreotid Kombinasyonunun Prostat Kanseri Hücrelerinde DNA Metiltransferaz ve Histon Deasetilaz Aktiviteleri Üzerindeki Etkileri. *5. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi 19-23 Mart 2014 Antalya.*
- **Özge Özer**, Emir Bozkurt, Harika Atmaca, Aslı Kısım, Selim Uzunoğlu, Rüçhan Uslu, Burçak Karaca. AT-101'in HUVEC hücre kültürlerinde hücre göçüne etkileri bakımından çeşitli ajanlarla karşılaştırılması. *XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27-30 Ekim 2013 Kuşadası, Aydın.*