

**T.C.**

**YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**Klinik Embriyoloji Programı**

**İNSAN GRANULOZA HÜCRE KİNETİĞİ, PROLİFERASYONU VE  
APOPTOZİSİN GERÇEK ZAMANLI VE KANTİTATİF OLARAK  
BELİRLENMESİNDE YENİ BİR İMPEDANS(İÇ DİRENÇ) BAZLI METOD:  
XCELLIGENCE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Feridun YAKAR**

Tez Danışmanı

**Prof.Dr.Bülent URMAN**

**Koç Üniversitesi Kadın hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

**İSTANBUL, Haziran 2014**

**T.C.**

**YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Klinik Embriyoloji programı**

**İNSAN GRANULOZA HÜCRE KİNETİĞİ, PROLİFERASYONU VE  
APOPTOZİSİN GERÇEK ZAMANLI VE KANTİTATİF OLARAK  
BELİRLENMESİNDE YENİ BİR İMPEDANS(İÇ DİRENÇ) BAZLI METOD:  
XCELLIGENCE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Feridun YAKAR**

Tez Danışmanı

**Prof.Dr.Bülent URMAN**

**Koç Üniversitesi Kadın hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı**

İSTANBUL, Haziran 2014

T.C.  
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 07/08/2014

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Tülay İrez

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı

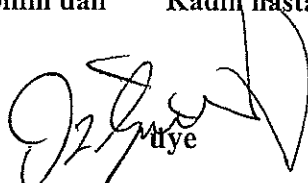
Danışman



Prof. Dr. Bülent Urman

Koç Üniversitesi

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı



Doç. Dr. Özgür ÖKTEM

Koç Üniversitesi

Kadın Hastalıkları ve Anabilim Dalı Başkanı

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Feridun YAKAR

## İTHAF

*Değerli anneme ve babama ithaf ediyorum...*

## TEŞEKKÜR

Tezimin her aŐamasında değerli bilgileriyle bana yol gosteren ve desteğini hiğbir zaman esirgemeyen sayın danışman hocam **Prof. Dr. Bülent URMAN'a**, lisansüstü eğitimim boyunca her türlü yardım ve manevi destekleri için **Prof. Dr. Tülay İREZ'e**, deneylerimin planlanması ve yürütülmesinde zamanını ve desteğini hiğbir zaman esirgemeyen Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi sayın **Doç. Dr. Özgür ÖKTEM'e**, deneylerimde ve deney sonuçlarımın istatistiksel analizinde her türlü yardım ve moral desteği için sayın **Dr. Engin TÜRKGELDİ'ye**, tüm çalışmam süresince her türlü yardım ve içten yaklaşımlarından dolayı **Emb. Başak BALABAN ve Emb. Aycan IŐIKLAR'a**, her türlü desteklerinden dolayı **Bio. Müge TAŐDEMİR'e** ve tüm bu süreçte manevi desteğini her daim hissettiren eŐim **Hatice YAKAR'a** içtenlikle teşekkür ederim.

## ABSTRACT

**Background:** The randomized clinical trials addressing whether or not GnRH agonists offer protection against ovarian damage induced by toxic chemotherapy regimens yielded conflicting results. Therefore we aimed in this study to determine if GnRH agonist leuprolide acetate protects human granulosa cells from apoptosis induced by chemotherapy.

**Methods:** Human immortalized (COV434) and luteal granulosa cells (LGC) expressing GnRH receptor were treated with TAC chemotherapy regimen (docetaxel, adriamycin and cyclophosphamide) at 0.6-1.2-2.5-5 ng/mL concentrations, which correspond to their lowest and peak blood levels. For each concentration of TAC regimen GnRH agonist leuprolide acetate was used at three different concentrations (12.5-25-50 ng/mL), which reflects blood and follicular fluid concentrations of the drug. Cell viability/proliferation was monitored real-time using xCelligence SP system and apoptosis with cleaved caspase-3 expression.

**Results:** The cells were treated at log phase with chemotherapy  $\pm$  GnRH agonist. As shown in Fig-1A, the cells exposed to TAC regimen exhibited first dose-dependent growth arrest and then underwent apoptosis as early as 5 hrs after administration of the drugs. The addition of GnRH agonist did not offer any protective effect against apoptosis as evidenced by comparable growth curves and apoptotic indices of the cells treated with and without GnRH agonist. Overall the mean apoptosis rates in TAC and TAC+GnRH groups were significantly higher than controls (74% and 84% vs. 4%,  $p < 0.001$ ; respectively)  
**Conclusion:** These results provide molecular evidence that GnRH agonists may not offer protection against ovarian damage induced by chemotherapy.

## ÖZET

**Amaç:** Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların ovaryen toksisitesinin gerçek zamanlı ve kantitatif olarak değerlendirilebilmesi, fertilitiyi koruma bakış açısı ile bakıldığında son derece önemlidir. xCelligence böyle bir amaca hizmet eden yeni bir teknolojidir. Bu yeni sistem, kültür tabağının tabanına yerleştirilmiş birbirine kenetlenmiş mikro-elektrodlarda elektriksel impedansı ölçerek hücre proliferasyonu, viabilitesi ve sitotoksosite hakkında gerçek zamanlı kantitatif veriler vermektedir. Bu metod sayesinde hücrelerin önceden herhangi bir işleme tabi tutulması veya işaretlenmesi gerekmemektedir. Bu projede xCelligence sisteminin kemoterapi ilaçlarının granuloza hücrelerine olan sitotoksitesini analiz etme yeteneğini belirlemeyi amaçladık.

**Yöntem ve Gereçler:** İmmortalize granuloza hücreleri (COV434) bu amaçla seçildi. Hücreler E-96 kuyucuklu hücre kültürü tabağına farklı yoğunluklarda ekildi (625-40,000 hücre kuyucuk). Hücreler log fazına ulaştıklarında TAC kemoterapi kombinasyonu 4 farklı dozda (0.625-1.25-2.5-5 ng/mL) verildi. Viable hücre sayısı normalize hücre indeksi (CI) olarak belirtildi. Metodun güvenilirliğini kıyaslamak için eş zamanlı immünofloresans metodu ile apoptosis bakıldı.

**Sonuçlar:** Farklı yoğunluklarda ekilen hücreler, ekilme yoğunluklarına ile uyumlu büyüme eğrileri çizdiler. Yüksek yoğunlukta ekilenler log ve plato fazlarına daha erken ulaştılar (Şekil 1A). Kemoterapi uygulanmasından sonra, 5 saat gibi kısa bir süreden itibaren doza bağlı olarak hücre indekslerinde azalma eğilimi gözlemlendi. Kültürün sonunda, kemoterapi gruplarındaki ortalama hücre indeksi, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. Kontrol hücrelerinin yalnızca %6'sı aktif caspase-3 için pozitif boyanma gösterirken, TAC gruplarında bu oran %50 idi ( $p < 0.001$ )

**Sonuç:** Sonuçlarımıza göre, xCelligence teknolojisi ile herhangi bir medikal ajan veya bileşenin gonadotoksitesini kolayca test edilebilir ve IC50 değerleri bulunabilir.



## İÇİNDEKİLER

BEYAN .....	i
İTHAF .....	ii
TEŞEKKÜRLER .....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÖZET.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
1 GİRİŞ .....	1
2 YÖNTEM VE GEREÇLER .....	3
2.1 Hücre Kültürü.....	3
2.2 Hücre Büyüme Kinetiği Ve Karakteristiklerinin Belirlenmesi .....	3
2.2.1 Immunofloresans Boyama .....	4
2.2.2 Kemoterapi Uygulaması.....	4
2.2.3 İstatistik Metod .....	4
3 SONUÇLAR.....	5
4 TARTIŞMA .....	10
5 KAYNAKLAR .....	13
EKLER.....	14
EK 1. Etik Kurul Onayı.....	15

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Farklı Yoğunluklarda Ekilen İnsan Granulosa Hücrelerinin Büyüme Eğrileri.....	5
Şekil 2. Kuyucuk Başına Düşen Hücre Sayıları Ve Log Fazına Girmeleri İçin Geçen Süre. ....	5
Şekil 3: Farklı Dozlarda Kemoterapi Uygulanması Öncesi Ve Sonrasında Hücrelerin Büyüme Eğrileri.....	6
Şekil-4.....	7
Şekil 5: Kemoterapi Uygulanan Gruplardaki Ortalama Hücre İndeksinin Kontrol Grubu Ile Karşılaştırılması.....	8
Şekil 6: Kontrol Hücrelerinin Ve Kemoterapi Uygulanan Hücrelerinin Aktif Caspase-3 İle Boyanmaları. ....	9

# 1 GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan ajanlar, özellikle çoğalma veya büyüme hızı yüksek olan hücreleri hedef almaktadırlar. Gonadlar, söz konusu ilaçların olumsuz etki gösterdiği organlar arasındadırlar. Geçmişte, gonadlardaki kalıcı hasarın ve fonksiyon kaybının sağkalıma olumsuz etkisi olmadığı için önemsenmediği bir gerçektir. Günümüzde ise hastanın sağkalımı kadar, hastalık sırasındaki ve sonrasındaki yaşam kalitesi de dikkate alınmaktadır. Bunun bir nedeni sağkalım oranlarının artması, bir diğeri de daha düşük yan etki ve toksisiteye sahip ajanların kullanıma girmesidir. Fertilitenin korunması, özellikle genç ve ailesini tamamlamamış hastalar açısından büyük önem taşımaktadır. Kansere ve tedavisine değişen bakışın sonucu olarak mevcut ve geliştirilmekte olan ajanların overlere olan toksisitelerinin doğru ve etkili olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

Folikül büyümesi ve onu düzenleyen faktörler hakkında mevcut bilimiz oldukça azdır. Hücre çoğalmasını inceleyen sistemlerin insan üremesi hakkında bilgi edinilmesine katkısı büyüktür. Hücre çoğalmasını inceleyen mevcut sistemler ya hücreleri fikse etmektedirler, ya da işaretleyici bir ajan kullanmaktadırlar. Bunlardan en çok kullanılanları MTT assay, PCNA, pHH3, BrdU, EdU'dur. Bu sistemler florometrik, kolorimetrik, immunofloresans veya immunohistokimyasal yöntemlerdir ve hiçbiri gerçek zamanlı ve sürekli veri akışı sağlayamamaktadır. Bu durum, istatistiksel ve biyolojik olarak anlamlı sonuçlara varmayı güçleştirmektedir.

İnsan granüloza hücrelerini, işaretlemeden veya fikse etmeden, in vitro olarak doğrudan inceleme yöntemleri üzerine çalışılmaktadır. Böyle bir yöntemin hücre büyümesi dinamikleri, sinyal yolları ve folikül büyümesi ile over fonksiyonu üzerine çok değerli bilgiler sunabileceği aşikardır. Aynı avantaj, ovaryen toksisitenin değerlendirilmesi için de geçerlidir. Ovaryen toksisitenin değerlendirilmesinde ideal olan, gerçek zamanlı ve kantitatif değerlendirilmedir. Bu sayede ajanların hücrelere etkileri an be an gözlemlenebilmektedir. Bunun yanında sonuçlar objektif ve standart olarak değerlendirilebilmektedir. Roche tarafından geliştirilen xCelligence real-time cytotoxicity assay (RCAT), böyle bir amaca hizmet eden yeni bir teknolojidir.

Xcelligence, gerçek zamanlı ve kantitatif olarak hücre çoğalması, viabilitesi, sitotoksisite, adezyon invazyon veya reseptör aktivitesini herhangi bir işaretleme yöntemine veya işleme gerek duymadan gösterebilmektedir. Xcelligence bugüne kadar çeşitli in vitro çalışmalarda kullanılmıştır. Özellikle kanser araştırmalarının ilgisini çeken bu sistemin etkinliğini, başarısını, ve kullanımını halen incelenmektedir.

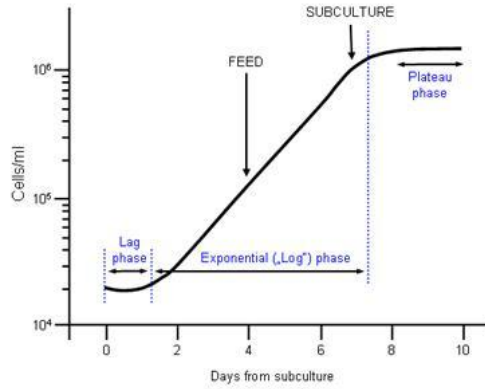
Bu tez çalışmasında, xCelligence sisteminin kemoterapi ilaçlarının granuloza hücrelerine olan sitotoksisitesini gerçek zamanlı ve kantitatif olarak analiz etme yeteneğini belirlemeyi amaçladık.

## 2 YÖNTEM VE GEREÇLER

### 2.1 Hücre Kültürü

İnsan ölümsüzleştirilmiş (immortalize) granuloza hücreleri (COV434) çalışma için seçildi. Bu hücreler ticari olarak mevcut olup (Sigma) proliferasyon yeteneklerinin yanında luteinize olmamaları sebebiyle böyle bir çalışma için en uygun hücre dizisidir. 10 cm lik kültür tabağında(kabında) DMEM-F12 +%10 FBS+antibiyotik ile kültüre edildi. Hücreler %50-70 konfluans (doğunluğa) ulaştıkları zaman %0.25 tripsin-EDTA ile tripsinize edildiler.

### 2.2 Hücre Büyüme Kinetiği Ve Karakteristiklerinin Belirlenmesi



Ardından hücreler 96 kuyucuklu E-96 hücre kültür tabağına(kabına) (Roche, Grenzach-Wyhlen, Almanya) farklı yoğunluklarda ekilip (625-40,000 hücre/kuyucuk) ve %5 karbondioksit, 37°C ortam sağlayan inkübatöre yerleştirildi. Söz konusu hücrelerin bağlanmaları ve çoğalmaları her 30. dakikada xCelligence SP sistemi ile sürekli olarak monitörize edilerek(izlenerek) lag-log ve plato fazları analiz edildi. Lag fazı, hücre kültüründe hücre büyümesinin çok az yada hiç olmadığı ilk safhadır. Latent faz veya gizli fazda. Log fazı ise hücre bölünmesinin hızlı olduğu evredir. Logaritmik faz veya eksponansiyel fazda denilebilir. Plato fazı, hücre bölünmesinin durduğu evredir stasyoner fazda denilebilir. E-96 hücre kültür tabağındaki her kuyucuğun dibine mikroelektronik sensörler yerleştirilmiştir. Bu sensörler, lokal iyonik çevredeki değişiklikleri algılar ve elektrod impedansındaki artışı ölçerler. Kuyucuklardaki hücresel değişiklikler (büyüme, çoğalma) impedanstaki değişikliğe yol açtığından, bu yöntemle hücresel aktivite hakkında bilgi edinildi. Elde edilen değerler hücre indeks değerleri (cell index values) (CI) olarak

belirtilirdi. Viable hücre sayısı normalize hücre indeksi olarak (CI) olarak belirtildi. Ajanların eklenmesinden önceki ve sonraki CI oranı değerlendirildi. CI kaydı ve normalizasyonu RTCA yazılımı ile sağlandı. Metodun güvenilirliğini kıyaslamak için eş zamanlı immünofloresans metodu ile apoptozis bakıldı.

### **2.2.1 Immünofloresans Boyama**

Immünofloresans metodu ile cleaved caspase-3 kullanarak apoptozisin belirlenmesi amacı ile kemoterapi verildikten 24 saat sonra hücrelerin bir kısmı %10 nötral formalin ile 20 dk fikse edildi. Ardından PBS ile 3 kez yıkanarak PBS-TBS%5 eşek serumu ve%5 keçi serumu+%10 bovine serum albumin ile 1 saat inkübe edilerek blocking yapıldı. Ardından primer cleaved caspase-3 antikoru (Abcam antimouse cleaved caspase-3 1:100 dilüsyon oranında) ile 1 gece inkübe edildi. Ardından PBS ve TBS-tween ile 3 er kez yıkadıktan sonra antimouse FITC sekonder antikoru ile 1:100 oranında 1 saat bekletildi. Bunu takiben Hoescht 33342 ile DNA boyanarak immünofloresan mikroskopisi yapılarak(floresan mikroskobu ile incelenerek) (Olympus IX71, Japan) apoptozis tespit edildi.

### **2.2.2 Kemoterapi Uygulaması**

Hücreler log fazına ulaştıklarında taxotere, adriamycin, ve cyclophosphamide (TAC) kemoterapi kombinasyonu 4 farklı dozda (0.625-1.25-2.5-5 ng/mL)uygulandı. Uygulanan ajanların COV434 hücrelerinin proliferasyonuna etkileri 200 saat boyunca, her 30. dakikada kaydedildi. Viable(canlı) hücre sayısı normalize hücre indeksi olarak (CI) olarak belirtildi. Metodun güvenilirliğini kıyaslamak için eş zamanlı immünofloresans metodu ile apoptozis bakıldı.

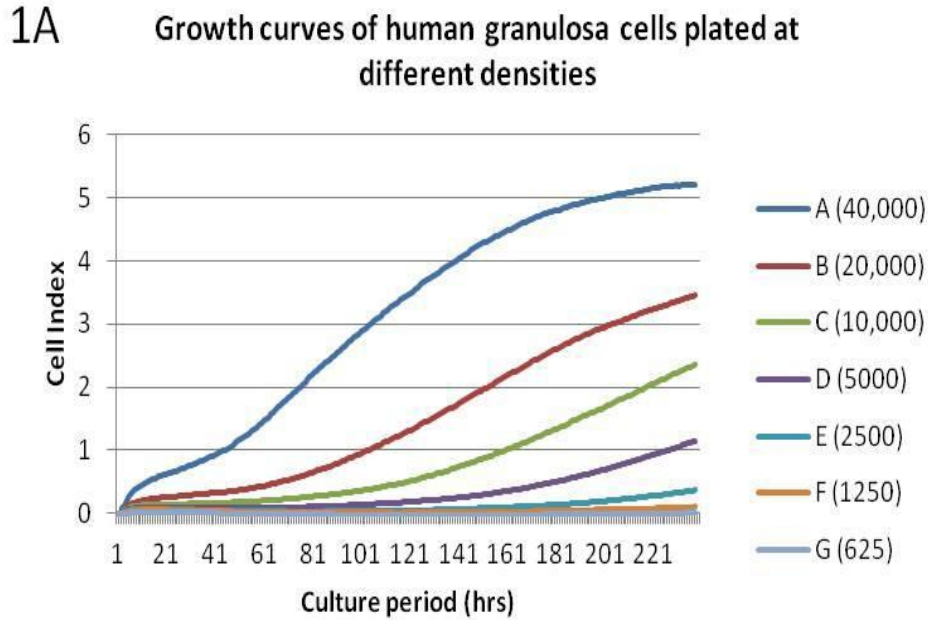
### **2.2.3 İstatistik Metod**

Her bir kuyucuktaki veriler eş zamanlı impedans(alternatif akım direnci) ölçümü ile sayısal veri aktarımı sağladığı için deney sonunda her bir kuyucuk ve/veya alt grup için ortalama CI değeri hücre proliferasyon indeksi olarak excel tablosuna aktarılabilir. Bu veriler daha sonra ANOVA ve Posthoc multiple comparison(çoklu karşılaştırma) testi yapıldı. ANOVA  $p < 0.05$  ise Posthoc Bonferoni testi uygulandı.  $P < 0.05$  anlamlı kabul edildi

### 3 SONUÇLAR

İlk olarak, hücreler farklı yoğunluklarda kuyucuklara ekilen hücrelerin lag, log ve plato fazları belirlendi (Şekil 1). Granulosa hücreleri, ekilme yoğunluklarına ile uyumlu büyüme eğrileri çizdiler. Yüksek yoğunlukta ekilenler log ve plato fazlarına daha erken ulaştılar. Kuyucuk başına düşen hücre sayıları ve log fazına girmeleri için geçen süre şekil 2’de gösterilmiştir.

**Şekil 1: Farklı Yoğunluklarda Ekilen İnsan Granulosa Hücrelerinin Büyüme Eğrileri.**



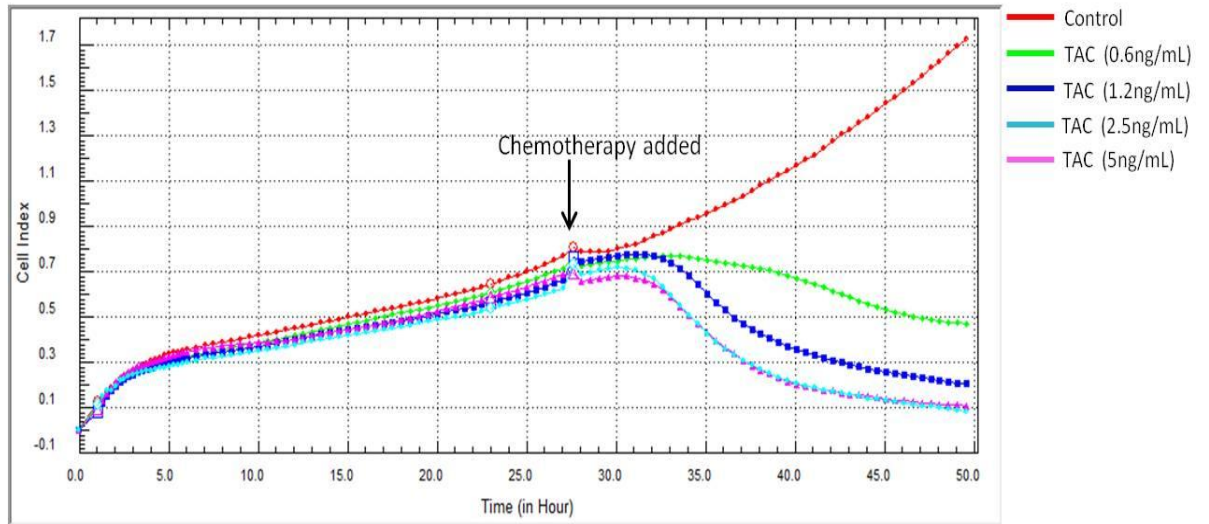
**Şekil 2. Kuyucuk Başına Düşen Hücre Sayıları Ve Log Fazına Girmeleri İçin Geçen Süre.**

Cell number per well	40x10 <sup>3</sup>	20x10 <sup>3</sup>	10x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>3</sup>	2500	1250	625
Time to enter log phase	16	34	51	85	Not reached at 200h	Not reached at 200h	Not reached at 200h
Mean Cell Index at 200h	3.12±1.7	1.5±1.1	0.78±0.6	0.32±0.3	0.096±0.08	0.03±0.01	0.01±0.001

Log fazına ulaşan hücrelere kemoterapi uygulandı. Uygulamadan sonra, 5 saat gibi kısa bir süreden itibaren doza bağlı olarak hücre proliferasyon

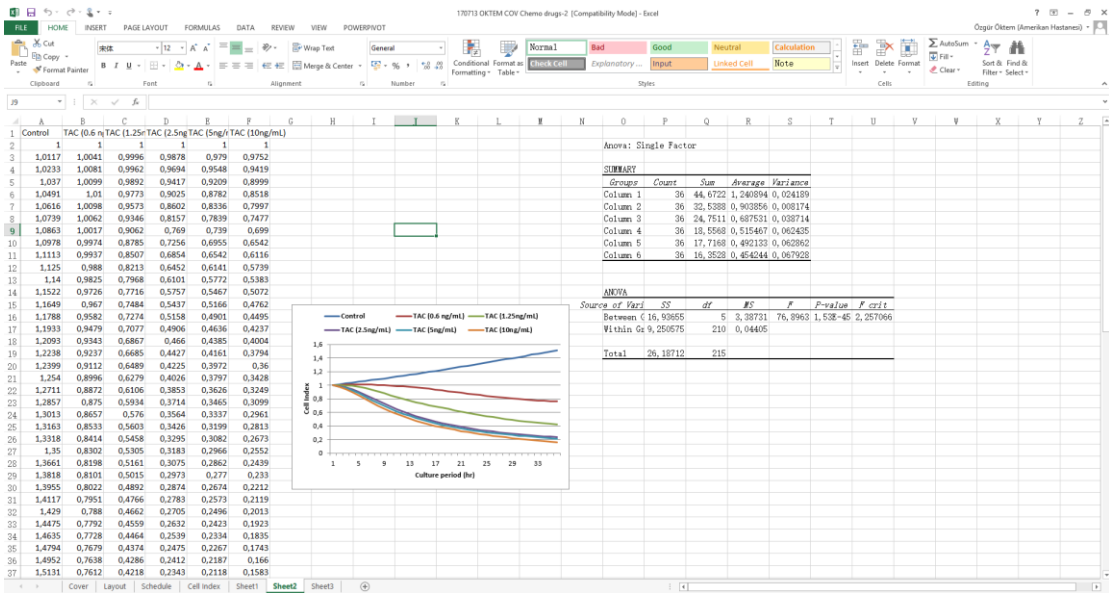
indekslerinde azalma eğilimi gözlemlendi (Şekil 3). Sürenin sonunda, kemoterapi gruplarındaki ortalama hücre proliferasyon indeksi, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu (Şekil 5). Kontrol hücrelerinin yalnızca %6'sı aktif caspase-3 için pozitif boyanma gösterirken, TAC gruplarında bu oran %50 idi ( $p < 0.001$ ) (Şekil 6)

**Şekil 3: Farklı Dozlarda Kemoterapi Uygulanması Öncesi Ve Sonrasında Hücrelerin büyüme eğrileri**



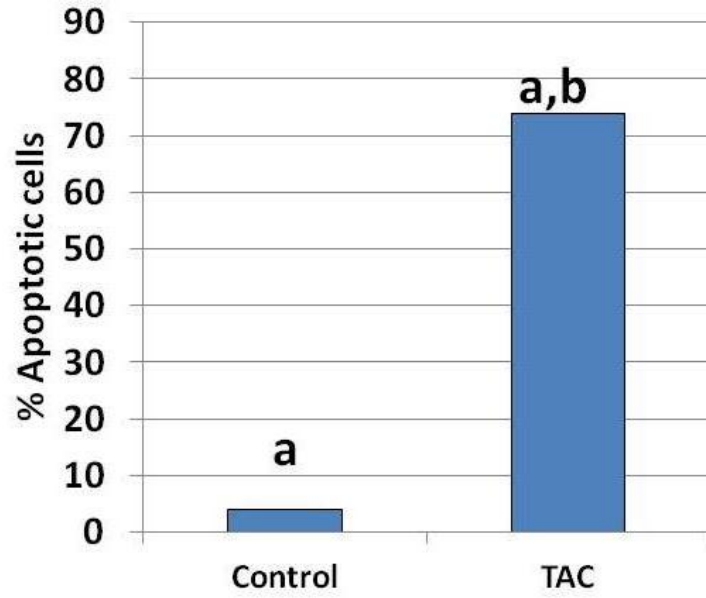
Her bir kuyucuktaki veriler eş zamanlı impedans ölçümü ile sayısal veri aktarımı sağladığı için deney sonunda her bir kuyucuk ve/veya alt grup için ortalama CI değeri hücre proliferasyon indeksi olarak excel tablosuna aktarılabilmektedir. Şekil 4' de görüleceği üzere bu veriler daha sonra ANOVA ve posthoc multiple comparison testi yapılmasına imkan vermektedir.





Şekil-4

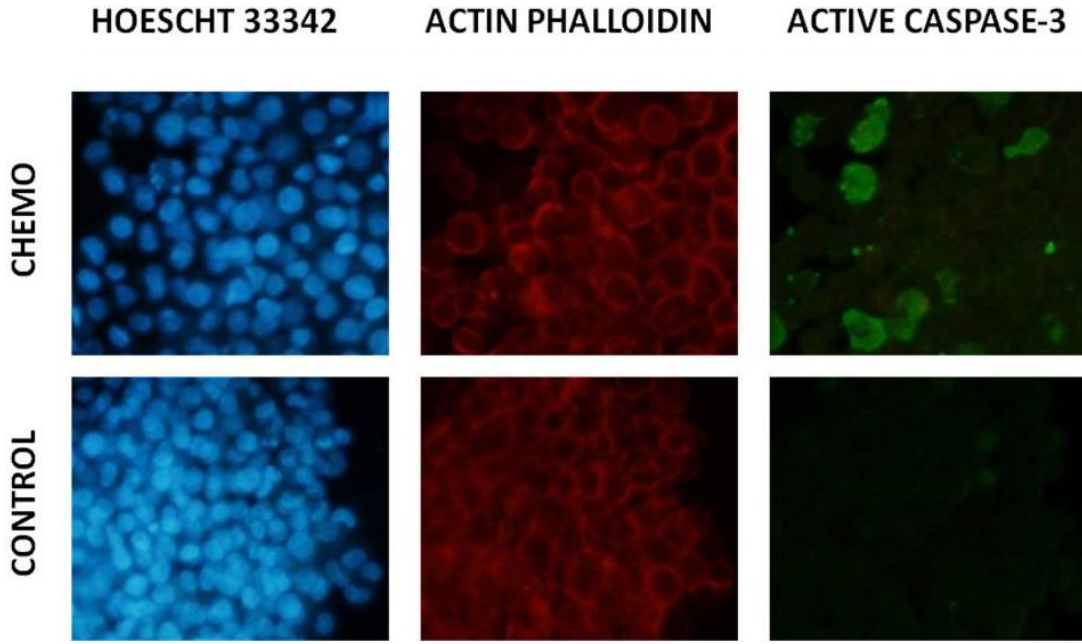
**Şekil 5: Kemoterapi Uygulanan Gruplardaki Ortalama Hücre İndeksinin Kontrol Grubu İle Karşılaştırılması**



**a:  $p < 0.05$**

**b:  $p > 0.05$**

**Şekil 6: Kontrol Hücrelerinin Ve Kemoterapi Uygulanan Hücrelerinin Aktif Caspase-3 İle Boyanmaları.**



## 4 TARTIŞMA

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların üreme organları üzerindeki ciddi etkileri uzun zamandır bilinmektedir. Son yıllarda fertilitte koruyucu tedavilerin ön plana çıkmasıyla, bu ilaçların gonadal hücreler üzerine olan sitotoksik etkilerine ilgi artmıştır. Overlerde bulunan foliküllerin gelişimi oldukça kompleks mekanizmalara bağlıdır. Günümüzde bu mekanizmaların ancak bir kısmı açıklığa kavuşturulabilmiştir. Dolayısıyla, sitotoksik ilaçların bu hücreler üzerine etkileri üzerine araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde insan granülosa hücrelerini incelemeye yarayan yöntemler, hücreleri işaretlemeyi veya fikse etmeyi gerektirmektedir. Florometrik, kolorimetrik, immunofloresans veya immunohistokimyasal bazlı bu yöntemlerden en popülerlerinden birinde tetrazolium tuzlarını(MTT veya XTT) kullanır. Kolorimetrik bazlı bu yöntemde, sitotoksik ilaçlara maruz bırakılan hücrelerin viabilitesinin ve proliferasyonunun değerlendirilmesine çalışılmaktadır (SOLAROGLU). Fakat bu yöntem, çevre şartlarından fazlasıyla etkilenmektedir. Asidik pH, azalmış glukoz konsantrasyonu, azalmış piridin nukleotidleri, ve azalmış glukoz gibi faktörler sonuçların doğruluğunu etkilemektedir (SOLAROGLU, **Johno H 2010, Vistica DT 1991**).

İdeal olan, bu hücrelerin in vitro ortamda herhangi bir ön işlemden geçirmeden, gerçek zamanlı ve kantitatif olarak incelenmeleridir. Bu imkanları sunan bir yöntem, sitotoksisite üzerine objektif ve değerli bilgiler verecektir. xCELLigence RCAT, bu yönde atılmış önemli bir adımdır. Fakat her yeni cihazda ve metodta olduğu gibi, xCELLigence'in hassasiyeti, doğruluğu, etkinliği, ve hangi şartlarda, hangi hücreleri değerlendirmede başarılı olduğu gibi konular yürütülecek çalışmalarla ortaya koyulmalıdır. Ancak bundan sonra geçerli bir yöntem olarak kabul görecektir.

Xcelligence, bazı hücre çoğalması (**Macdonald**), adezyonu (**Sansing HA**),fonksiyonu (**Moodley K, Keogh RJ**), ve sitotoksisite (**Masango, Peper**) araştırmalarında kullanılmış, ve bu çalışmalarda etkili ve başarılı bulunmuştur.

Granulosa hücreleri ve sitotoksisiteyi inceleyen herhangi bir çalışma, bilindiği kadarıyla henüz yapılmamıştır.

xCelligence RCAT, kültür tabağının tabanına yerleştirilmiş interdijite (birbirine kenetlenmiş) edilmiş mikro-elektrodlarda elektriksel impedansı(elektriksel direnci) ölçerek hücre çoğalması ve büyümesi gibi parametreler hakkında veri elde etmektedir. Düşük voltajlı alternatif akım (AC) uygulanarak mikroelektrodlar arasında akım sağlanmaktadır. Bu akım çevre hücrelerin varlığından etkilenmektedir. Mikroelektrodlar ile onların yakınında bulunan hücrelerin arasındaki etkileşim ile oluşan empedans(elektriksel direnç), kuyucuklardaki hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Bu sayede, her kuyucuktaki hücre miktarı hakkında sürekli bilgi edinilmesi mümkün olmaktadır. Kuyucuklardaki hücre sayısının xCelligence sürekli monitorizasyonu ile sitotoksisite (hücre ölümü), azalan çoğalma (hücre siklusunda arrest), hücre göçü ve çoğalması hakkında kantitatif veri elde edilmektedir.

Bu çalışmanın başlangıcında, xCelligence ile hücrelerin büyüme eğrileri ve fazları gerçek zamanlı olarak gözlenebilmiş ve kaydedilebilmiştir. Bu sayede araştırmacı, verileri geriye dönük olarak değil, eş zamanlı olarak takip edebilmiştir. Verilerin gerçek zamanlı olarak değerlendirilmesi deneye yapılacak müdahalelerin de ideal zamanda yapılmasına olanak tanımaktadır. Solaroglu ve arkadaşlarının (**Solaroglu**) belirttiği gibi, her hücrenin tipinin optimal yoğunlukta ve log büyüme fazında olması, sitotoksisite ve hücre çoğalması araştırmalarında yanlış pozitif ve negatif sonuçları önlemek için önem taşımaktadır. Örneğin bu çalışmada, yaklaşık olarak 28. saatte kuyucuklardaki hücreler log fazına girdiklerinde kemoterapötik ajanlar hücrelere uygulandı.

Kemoterapi ajanlarının uygulanmalarından sonra hücre proliferasyon indekslerinde azalma gözlemlendi. Bu azalmanın, uygulanan ajanın dozu ile korelasyon gösterdiği dikkati çekti. Deney sonunda, ilaç uygulanan hücrelerin yok olması konusu ajanların sitotoksisitesini gösterirken, kontrol grubundaki hücrelerin çoğalmayı sürdürmesi kullanılan hücrelerin ve xCelligence sisteminin doğruluğunu ispat etmiştir.

xCelligence'in eş zamanlı olması ve kantitatif veri sağlamanın bir avantajı da, hücrelerin hangi fazda ve ne kadar sürede söz konusu ajanlardan etkilendiklerini ortaya koyabilmesidir. Bu çalışmada, kemoterapötik ajanların uygulanmasından 5 saat sonra hücre proliferasyon indekslerinde azalma izlenmiştir.

Bu çalışmanın bulguları ışığında, xCelligence teknolojisi ile herhangi bir medikal ajanın veya bileşenin gonadotoksitesini kolayca test edip, IC50 değerlerini bulabilmektedir. Bu teknoloji kullanılarak herhangi bir ilacı over veya granuloza hücrelerindeki toksitesinin belirlenmesi yanında aynı zamanda granuloza hücre mitozu ve hücre siklusunu etkilediği düşünülen pek çok hücre içi sinyal yollarının inhibitörleri kullanılarak da değerli veriler elde edilebilir.

## 5 KAYNAKLAR

- Macdonald C, Unsworth CP, Graham ES. Enrichment of differentiated hNT neurons and subsequent analysis using flow-cytometry and xCELLigence sensing. *J Neurosci Methods*. 2014 Feb 13. pii: S0165-0270(14)00057-0. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.02.004. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24530700.
- Masango MG, Ferreira GC, Ellis CE, Elgorashi EE, Botha CJ. Cytotoxicity of diplodiatoxin, dipmatol and diplonine, metabolites synthesized by *Stenocarpella maydis*. *Toxicon*. 2014 Feb 12. pii: S0041-0101(14)00040-3. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.02.002. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24530231.
- Tan YF, Mundargi RC, Chen MH, Lessig J, Neu B, Venkatraman SS, Wong TT. Layer-by-Layer Nanoparticles as an Efficient siRNA Delivery Vehicle for SPARC Silencing. *Small*. 2014 Feb 8. doi: 10.1002/smll.201303201. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24510544.
- Peper JK, Schuster H, Löffler MW, Schmid-Horch B, Rammensee HG, Stevanović S. An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells. *J Immunol Methods*. 2014 Jan 29. pii: S0022-1759(14)00027-1. doi: 10.1016/j.jim.2014.01.012. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24486140.
- Roshan Moniri M, Young A, Reinheimer K, Rayat J, Dai LJ, Warnock GL. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*. 2014 Jan 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24443077.

## **EKLER**



## EK 1. Etik Kurul Onayı

Koç Üniversitesi Etik Kurulları | 1  
Rumelifeneri Yolu, Sarıyer, İstanbul  
Telefon: 0 (212) 338 10 39  
E-posta: chr@ku.edu.tr



Tarih: 18.06.2014

Karar No: 2014.085.IRB3.062

Sayın: Tülay İrez – Özgür Öktem

Koç Üniversitesi Etik Kurulu'na değerlendirilmek üzere başvuruda bulunduğunuz Türkçe başlıklı "**İnsan Granuloza Hücre kinetiği, proliferasyonu ve apoptozisin Real-time ve kandidatif olarak belirlenmesinde yeni bir impredans bazlı metod:XCELLIGENCE**" adlı projenizin başvuru dosyası ile ilgili belgeleri, Üniversitemiz "İnsan Araştırmaları Etik Kurulu" tarafından araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir.

Yapılan inceleme sonucunda çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.

Etik Kurul incelemesi ve onayı almadan bu çalışmada kullanılan prosedürler, formlar ya da protokollerde herhangi bir değişiklik yapamayacağınızı ve araştırmanızı gerçekleştireceğiniz kurumların yönetimlerinden de izin almanız gerekebileceğini hatırlatmak isterim. Çalışmanıza **19.06.2014** tarihinden itibaren başlayabilirsiniz. Bu izin **18.06.2015** tarihine geçerlidir.

Çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "İhsan Solaroğlu".

Dr. İhsan Solaroğlu  
KÜ Etik Kurullar Başkanı