



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**Kanser Kök Hücrelerinde Deaminonöraminik Asit Monoklonal
Antikorunun Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi**

Yüksek Lisans Tezi

Selen GENÇSOY

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Kanser Kök Hücrelerinde Deaminonöraminik Asit Monoklonal
Antikorumun Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi**

Selen GENÇSOY

Danışman
Prof.Dr. Gülperi ÖKTEM

Kök Hücre Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı


İzmir
2019

Tez Deęerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

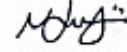
Başkan : Prof.Dr. Gülperi ÖKTEM
(Danışman)



Üye : Prof.Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM



Üye : Dr. Öğ. Üyesi Nur SELVİ GÜNEL



Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih: 27.05.2019.....

Önsöz

Yüksek lisans sürecimin başladığı günden bu yana, kanser ve kanser kök hücrelerine olan ilgimi ve bu alanda çalışmaktan keyif aldığımı fark eden değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. Gülperi Öktem ile uzun, yorucu ancak bir o kadar da yeni bilgilerin ışığında heyecan ve heves dolu bir yola başladık. Günümüzde en sık rastlanan ve ölüm sebeplerinin başında gelen kanser, birçok araştırmacının olduğu gibi bizim de odak noktamız oldu. Bir moleküler biyolog olarak hücrenin mekanizmasındaki düzen ve sisteme olan hayranlığım, kanser hücrelerini araştırmakla arttı. Bunun üzerine bu hücrelerin en temeli olan tüm hücre ve dokuları oluşturan kök hücrelere merak duymaya başladım. Bu yolda değerli danışmanım ve laboratuvar ekibimiz ile derin araştırmalar yapmak, yeni bilgiler öğrenmek yüksek lisansın bana en büyük katkısıdır. Bu tez süresi boyunca çağımızın hastalığı olan kanser için yapılan çalışmalara, yeni tedavi yöntemi ile katkıda bulunabilmiş olmak beni onore ve motive etmiştir.

İzmir, 06.05.2019

Selen Gençsoy

Özet

Kanser Kök Hücrelerinde Deaminonöraminik Asit Monoklonal Antikorumun Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Kanser, ölümlü sonuçlanan hastalıkların başında gelmektedir. Bu sebeple kanser tedavisi çalışmaları oldukça artmıştır. Kanser hücrelerinin yok edilmesi kadar kanser kök hücrelerin de hedeflenmesi kanserin sonraki yıllarda tekrarlamasının önüne geçilmesi açısından önemlidir. Kemoterapi ve radyoterapi gibi klasik kanser tedavileri yerine, hedefe spesifik olan monoklonal antikolar ile tedavi oldukça önem kazanmıştır. Monoklonal antikor tedavilerinin kanser hücresi üzerinde var olan temel etki mekanizmaları; komplemana bağlı sitotoksosite (KBS), antikora bağlı hücrel sitotoksosite (ABHS), anjiyogenez ve hücre çoğalmasını uyaran sinyal yollarındaki inhibisyonudur. Deaminonöraminik asit, sialik asit ailesinin bir türüdür. Deaminonöraminik asit kanser ve kanser kök hücrelerinde normal hücrelerden daha fazla bulunmaktadır. Bu sebeple deaminonöraminik asit monoklonal antikorunu hedefe yönelik tedavilerde yeni ve umut vadeden bir moleküldür. Bu çalışmada deaminonöraminik asit monoklonal antikorunun, meme kanseri ve kanser kök hücresine spesifik bağlanması ve hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir.

Kullanılan yöntemde; MCF7 meme kanseri hücresi ile MCF10A meme epitelyum hücreleri kültür ortamında üretilmiştir. MCF7 hücrelerinden Floresan Aktif Hücre Ayırma (FACS) yöntemi ile kanser kök hücreleri toplanmıştır. Elde edilen tüm hücre hatları ile antikorun farklı konsantrasyonlardaki sitotoksitesini incelenmiş ve bunun için WST1 analizi yapılmıştır. Ardından komplemana bağlı sitotoksosite ve apoptoz deneyleri yapılarak antikorun etkinliği değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak; monoklonal antikorun 1/1000 konsantrasyonunun en etkili doz olduğu saptanmıştır. Antikorun epitelyum hücrelerine var olan zararı önemsenmeyecek kadar azdır. Ayrıca, kanser ve kanser kök hücresine spesifik bağlanarak bu hücreler üzerinde apoptotik etkisinin ve komplement sistem ile sitotoksik etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: kanser kök hücresi, monoklonal antikor, deaminonöraminik asit, komplemana bağlı sitotoksosite (KBS)

Abstract

Investigation of Cytotoxic Effects of Deaminoneuraminic Acid Monoclonal Antibody in Cancer Stem Cells

Aim: Cancer is the leading cause of death in recent years. Breast cancer is the most common type of cancer in women across Turkey and the world. Therefore, cancer treatment studies have increased considerably. Targeting cancer stem cells is as important as destruction of cancer cells for preventing recurrence of cancer in subsequent years. Instead of conventional cancer treatments such as chemotherapy and radiotherapy, treatment with target-specific monoclonal antibodies has gained considerable importance. The main mechanisms of effect of monoclonal antibody treatments on cancer cells are complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), angiogenesis and inhibition of signaling pathways that stimulate cell proliferation. Deaminoneuraminic acid is a member type of the sialic acid family. Deaminoneuraminic acid is found much more in cancer and cancer stem cells more than normal cells. For this reason, the deaminoneuraminic acid monoclonal antibody is a novel and promising molecule in targeted therapies. In this study, specific binding of deaminoneuraminic acid monoclonal antibody to cancer and cancer stem cells and cytotoxic effect on cells were investigated.

In the method; MCF7 breast cancer cell and MCF10A breast epithelial cells were produced in culture medium. Cancer stem cells were collected from the MCF7 cells by the Fluorescent Active Cell Separation (FACS) method. All cell lines and cytotoxicity of the antibody at different concentrations were examined and WST1 analysis was performed. Subsequently, complement-dependent cytotoxicity and apoptosis tests were performed to evaluate the efficacy of the antibody.

As a result; The 1/1000 concentration of the monoclonal antibody was found to be the most effective dose. The damage of the antibody to the epithelium cells is not significant. In addition, it has been determined that apoptotic effect on these cells and cytotoxic effect with complement system are specific for cancer and cancer stem cells.

Key words: cancer stem cell, monoclonal antibody, deaminoneuraminic acid, complement-dependent cytotoxicity (CDC)

İçindekiler

Özet	iii
İçindekiler	v
Tablolar Listesi.....	vii
Şekiller Listesi.....	viii
Grafikler Dizini	ix
Kısaltmalar Listesi	x
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler	4
2.1. Kök Hücre Nedir?	4
2.2. Kök Hücre Çeşitleri.....	5
2.2.1. Embriyonik Kök Hücre	5
2.2.2. Embriyo Dışı Fetüs Kök Hücre.....	6
2.2.3. Yetişkin Kök Hücre.....	6
2.3. Kanser Kök Hücresi	7
2.4. Kanser ve Sialik Asit.....	7
2.4.1. Meme Kanseri Kök Hücresi.....	7
2.4.2. Sialik Asit.....	8
2.4.3. Deaminonöraminik Asit.....	8
2.5. Monoklonal antikor tedavisi.....	10
3. Gereç ve Yöntem.....	11
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	11
3.2. Hücre Hatlarının Üretilmesi	13
3.3. Floresan Aktif Hücre Ayırma (FACS) Yöntemiyle CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması.....	15
3.4. WST1 Analizi İle Monoklonal Antikorun Sitotoksitesinin Belirlenmesi. 16	

3.5.	Kompleman Bağımlı Sitotoksosite.....	19
3.6.	Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü	22
4.	Bulgular.....	24
4.1.	Floresan Aktif Hücre Ayırma (FACS) Yöntemiyle CD44 ⁺ /CD24 ⁻ Kanser Kök Hücrelerinin Elde Edilmesi	24
4.2.	WST1 Yöntemi Monoklonal Antikörün Sitotoksosite Analizi	25
4.3.	Komplemana Bağımlı Sitotoksosite Analizi	26
4.4.	Apoptoz Analizi	29
5.	Tartışma.....	33
6.	Sonuç ve Öneriler.....	37
7.	Kaynakçalar.....	41
	Teşekkürler.....	49
	Özgeçmiş.....	50

Tablolar Listesi

Tablo 2.1. Kökenlerine,farklanma etkilerine veya farklanma yönlerine göre kök hücre türleri (Alp Can Kök Hücre Tanımları,2008).....	5
Tablo 3.1. Kimyasal maddeler listesi.....	11
Tablo 3.2. Kullanılan cihazların listesi.	12



Şekiller Listesi

Şekil 2.1. <i>In vitro</i> fertilizasyon sonrası artık tüplerden hazırlanan blastositlerden iç hücre kitlesinin (inner cell mass) ayrılması ve <i>in vitro</i> şartlarda embriyonik kök hücre kültürlerinin oluşturulması.	6
Şekil 2.2. KDN'nin oluşum mekanizması.	9
Şekil 3.1. MCF10A hücre hattının genel özellikleri ve mikroskopik görüntüsü.	13
Şekil 3.2. MCF7 hücre hattının genel özellikleri ve mikroskopik görüntüsü.	14
Şekil 3.3. FACS cihazında yüzey belirteçleri ile işaretlenen hücrelerin ayrılması. ...	15
Şekil 3.4. 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum tuzunun mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile formazan kristallerine dönüşmesi. 17	17
Şekil 3.5. WST1 analiz şeması.	18
Şekil 3.6. Kompleman sistemin 3 temel yolağı.	20
Şekil 3.7. Etki faktörlerinin kompleman sistemde seçtikleri yollar.	20
Şekil 3.8. Hücrenin canlı, apoptotik veya nekrotik olmasına göre PS'lerin hücre membranındaki konumu.	22
3.9. Apoptoz deneyi şeması	23
Şekil 4.1. FACS analizinin grafik verileri.	24
Şekil 4.2. FACS analizinin sayısal verileri.	24
Şekil 4.3. Komplemana bağımlı sitotoksosite deneyinin floresan mikroskopunda görüntülenmesi.	27
Şekil 4.4. Komplemana bağımlı sitotoksosite deneyinin pozitif ve negatif kontrollerinin floresan mikroskopunda görüntülenmesi.	28
Şekil 4.5. MCF10A hücre hattı kontrol grubunun ve monoklonal antikorlu grubunun apoptoz analizi.	30
Şekil 4.6. MCF 7 hücre hattı kontrol grubunun ve monoklonal antikorlu grubunun apoptoz analizi.	31
Şekil 4.7. MCF 7 KK hücre hattı kontrol grubunun ve monoklonal antikorlu grubunun apoptoz analizi.	32

Grafikler Dizini

Grafik 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki antikorun MCF10A,MCF7 ve MCF7 KKH üzerine etkisi.	25
Grafik 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki antikorun kompleman ile hücreler üzerindeki etkis	26
Grafik 4.3. Antikorun 1/1000 oranındaki konsantrasyonunun apoptotik etkisi.....	29



Kısaltmalar Listesi

ABHS	: Antikora Bağlı Hücresel Sitotoksisite
ALDH-1	: Aldehit Dehidrogenaz-1
AO/EB	: Akridin Oranj Etidyum Bromür
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
FACS	: Floresan Aktif Hücre Ayırma
KBS	: Komplemana Bağlı Sitotoksisite
KDN	: 2-keto-3-deoksi-D-glisero-D-galakto-nononik asit
KKH	: Kanser Kök Hücresi
mAb	: Monoklonal Antikor
PEP	: Fosfoenolpiruvatın
PS	: Fosfotidilserin
Sia	: Sialik Asit
TF	: Transkripsiyon Faktörü
YKH	: Yetişkin Kök Hücre

1. Giriş

Kök hücre, pluripotensi (köklülük) özelliği olan, kendini yenileyebilen ve vücudun ihtiyacına göre farklı hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir (Weissman, Anderson, & Gage, 2001). Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak ayrılmaktadır. Totipotent; vücudumuzun bütün doku ve hücrelerine dönüşebilme, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Totipotent kök hücreler zigot ve morula olarak tanımlanmıştır. Pluripotent; 3 germ tabakasından oluşan ve bütün hücreleri oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler (EKH) pluripotenttir. Multipotent; pluripotent hücrelere göre sınırlı sayıda ve birbirine yakın hücre gruplarına dönüşebilen hücrelerdir. Unipotent; tek bir hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir (Kalra & Tomar, n.d.).

Kök hücreler, embriyonik kök hücre, embriyo dışı (fetüs) kök hücreleri ve yetişkin (somatik) kök hücre olarak ayrılmaktadır. EKH'ler yüksek kendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler ve tüm fetal dokulara, yetişkin kök hücrelerine farklılaşabilmektedirler. Embriyo dışı dokular olan plasenta, amniyon zarı ve göbek kordonunda bulunan hücreler embriyo dışı veya fetüs kök hücreleridir. Bu hücreler son yıllarda tıpta tedavi amaçlı kullanımı oldukça artmış önemli hücrelerdir (Alp Can, 2014). Yetişkin kök hücreler (YKH) farklılaşma özellikleri sınırlı olan ve matür hücrelere farklılaşabilen, multipotent yapıda hücrelerdir (Alp Can, 2014), (Kumar & Singh, 2006).

Son yıllarda çeşitli dokularda meydana gelen tümörlerin hücresel kaynağına bakıldığında kök hücreye benzer hücre toplulukları tespit edilmiştir ve bu hücrelere kanser kök hücresi (KKH) adı verilmiştir. KKH'lerin, progenitör ve/veya normal kök hücrelerin genetik mutasyonu sonucu meydana gelen hücre topluluğu olduğu öne sürülmektedir (Hu & Fu, 2012). KKH, tıpkı normal kök hücreler gibi asimetric bölünme ile kendini yenileyebilen ve farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir (Tabarestani & Ghafouri-fard, 2012). KKH'ler kanserin nüks etmesinin sebebi olarak bilinen hücrelerdir ve klinik tedavide hayati önem taşımaktadır. Çünkü KKH'ler, kanser hücrelerine kıyasla tedaviye daha dirençli hücrelerdir (Valent et al., 2012).

Kanser, hücrelerin DNA zincirinde ve sinyal yollarında meydana gelen hasar sonucu hücrelerde aşırı proliferasyon ve fenotipik değişiklikler ile kendini gösteren bir hastalıktır. Kanser, dünya çapında ikinci sırada yer alan ölüm nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre 2018 yılında 9,6 milyon kişinin ölüm nedeninin kanser olduğu tahmin edilmektedir. Akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanserleri erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda ise meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (Elsevier Research Intelligence, 2016), (Kaplan & Ph, 2013).

Meme kanseri, temel olarak süt bezlerinde veya lobüllerinin iç katmanlarında oluşan bir kanser türüdür. Meme kanserinin primer risk faktörleri; yaş, yüksek hormon seviyeleri, ırk, beslenme eksiklikleridir (Mr, Sharifi J, Mr, & Paknahad A, 2015). Her yıl 2,1 milyon kadın meme kanserine yakalanmaktadır. 2018'de 627.000 kadının meme kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir. Meme kanseri gelişmiş ülkelerdeki kadınlarda daha fazla görülmekle birlikte, küresel olarak hemen hemen her bölgede oranlar artmaktadır.

Kanser tedavisinde kanser hücreleri kadar kanser kök hücrelerinin tedavisi de büyük önem taşımaktadır. Kanser kök hücreleri radyoterapi ve kemoterapiye oldukça dirençli hücrelerdir ve G₀ fazında sessiz bekleyebilir, uygun niş ortamları ve uyarıları ile birlikte tekrar tümör oluşumuna sebebiyet verebilmektedir. Kanser tedavisi gören olgunun yıllar sonra tekrar kansere yakalanmasının temel sebeplerinden biri KKH'dir (Valent et al., 2012), (Hu & Fu, 2012).

Hücrelerin glikozilasyon yapılarındaki değişiklikler, kanser dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkilidir. Kanser hücresinin metastazında ve invazyonunda anormal glikolizasyon rol oynamaktadır. Sialik asitler (Sia) dokuz karbonlu şekerlerdir. Sialik asitler hayvan hücrelerinin yüzeyinde glikolipit ve glikoproteinlerin terminal şekeridir. Sia'ların yüksek miktarda ifadesi kanserle ilişkilidir (Varki & Varki, 2007).

Deamino nöraminik asit, sialik asit ailesinin bir türüdür. N-asetilnöraminik asit-Neu5Ac içinde yer alan C5 pozisyonunda aseto-amid grubu yerine hidroksil grubu eklenmesi ile oluşmaktadır. Deaminonöraminik asit, insan dahil pek çok canlı türünde bulunmaktadır. Hayvan hücrelerinde deaminonöraminik asit, düşük seviyelerde ifade edilmektedir. Ancak çeşitli kanser tiplerinde deaminonöraminik asit düzeyi artış göstermiştir. Bu sebeple tümör-gelişimsel antijen özelliği göstermektedir

(Nakata, Close, Colley, Matsuda, & Kitajima, 2000). Araştırma grubumuzun yaptığı çalışmalarda deaminonöraminik asit normal hücrelerde düşük miktarda ifade edilirken, kanser ve kanser kök hücrelerinde deaminonöraminik asit ifadesinin artış gösterdiği belirlenmiştir.

Kanser tedavisinde sıklıkla kemoterapi ve radyoterapi gibi klasik yöntemler kullanılmaktadır. Tedavide en büyük problemlerden biri de yıkıcı yan etkilerdir (Kaplan & Ph, 2013). Bu sebeple kanser hücresine spesifik tedavi yöntemlerinin araştırılması önem kazanmıştır. Günümüzde monoklonal antikorlar, hedefe yönelik tedavi araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Monoklonal antikorlar (mAb), immunize edilmiş bir hayvanın tek bir B hücresinin hücre kültürü ortamında çoğaltılmasıyla elde edilen antikorlardır. Monoklonal antikorlar, Köhler ve Milstein tarafından geliştirilen hibridoma teknolojisi sayesinde üretilmiştir (dos Santos et al., 2013), (Mahmuda et al., 2017).

Monoklonal antikorların spesifik antijenlere bağlanarak kanser hücrelerine karşı etki göstermesi temel olarak üç mekanizmayla ortaya konmaktadır. Kanser hücresinin membran antijenine bağlanan antikorlar, komplemana bağlı sitotoksisiteyi (KBS), antikora bağlı hücrel sitotoksisiteyi (ABHS), kanser hücrelerinin çoğalmasını ve anjiyogenezini indükleyen sinyal yollarındaki faktörleri inhibe ederek etkinlik göstermektedir (Weiner, 2007).

Tezde kullanılan hücre grupları MCF10A epitelyum hücresi kontrol grubu hücresidir. MCF7 kanser hücresi ve MCF7 Kanser Kök Hücresi (KKH) esas hedeflenen ve üretilmiş olan monoklonal antikorun (mAb) spesifik bağlanma göstermesi istenilen hücrelerdir. Deaminonöraminik asit monoklonal antikoru kanser hücrelerinin ve kanser kök hücrelerinin yüzeyinde artış göstermiş olan antijenlerine spesifik bağlanarak etkin bir ölüm oranı elde edileceği ve epitelyum hücrelere minimum zarar vereceği düşünülmektedir. Böylece yeni ve önemli bir mAb üretildiği kanıtlanmış olacaktır.

Tezin amacı; ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülen hastalık olan kanser için ve özellikle kadınlarda en sık görülen meme kanseri için yeni bir tedavi stratejisi geliştirmektir. Kanser ve kanser kök hücrelerinde artış gösteren deaminonöraminik asite özgü üretilmiş olan monoklonal antikorun spesifik bağlandığını kanıtlamak ve uygun doz aralığının tespitinin sitotoksik analizler ile test etmektir.

2. Genel Bilgiler

2.1. Kök Hücre Nedir?

Kök hücre, pluripotensi (köklülük) özelliği olan, kendini yenileyebilen ve vücudun ihtiyacına göre farklı hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir (Weissman et al., 2001). Pluripotensi, her üç germ tabakası ve çeşitlerine farklılaşabilme yeteneğidir. Pluripotensi yani köklülük, kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliktir. Kendini yenileme, kök hücrelerin yaşam boyu sayılarını korumak için çoğalmalarıdır. Kök hücreler belirli bir uyarın olmadığı sürece kendilerini sürekli yenilemezler. Örneğin, hematopoetik kök hücreler radyasyona maruz kaldıklarında kendini yenilerken normal koşullarda sessiz durumdadırlar. Kendini yenileme ve pluripotensinin gerçekleşmesinde transkripsiyon faktörler (TF) rol almaktadır. Oct4, Sox2 ve Nanog farklılaşmayı indükleyen en bilinen transkripsiyon faktörleridir. Bunların aktive olması kadar baskılanması da bir o kadar önemlidir. Bu iki özellik birbiri ile zıt çalışan ancak dengeli olması gereken kavramlardır. Farklılaşma, hücrelerin olgunlaşması ve/veya doku onarımında kök hücrelerin çoğalarak ihtiyaç duyulan hücre grubuna farklılaşmasıdır. Farklılaşma kararlanma ile başlamaktadır. Kararlanma, hücrenin bir yönde farklılaşma kararıdır ve geri dönüşümsüzdür (Alp Can, 2014).

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak ayrılmaktadır. Totipotent; vücudumuzun bütün doku ve hücrelerine dönüşebilme, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Totipotent kök hücreler zigot ve morula olarak tanımlanmıştır. Pluripotent; 3 germ tabakasından oluşan ve bütün hücreleri oluşturabilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler (EKH) pluripotenttir. Multipotent; pluripotent hücrelere göre sınırlı sayıda ve birbirine yakın hücre gruplarına dönüşebilen hücrelerdir. Unipotent; tek bir hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir (Kalra & Tomar, n.d.).

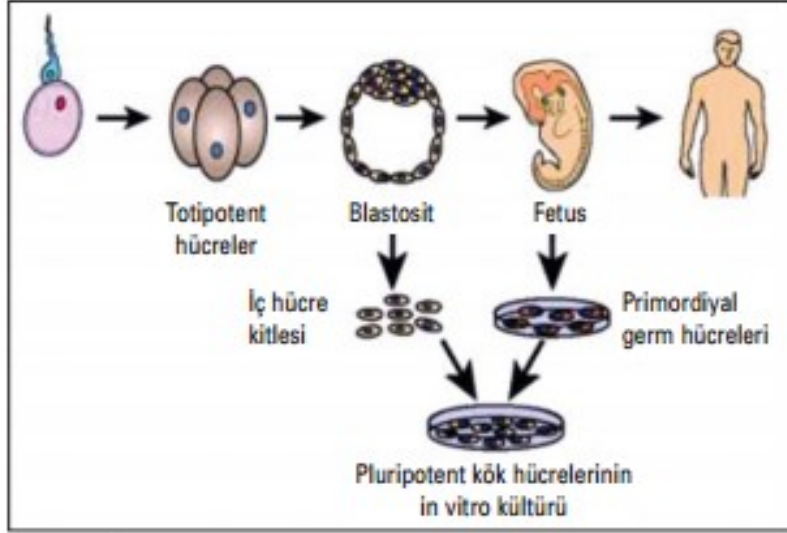
Tablo 2.1. Kökenlerine, farklanma etkilerine veya farklanma yönlerine göre kök hücre türleri (Alp Can Kök Hücre Tanımları,2008).

	Hücre Tipi	Farklanma Etkinliği	Farklanma Yönü
EKH	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyo ve embriyo dışı tabakalar
EKH	Blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm, ektoderm hücreleri
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri, ilkel cinsiyet hücreleri, amniyoblastlar
EKH	Ektoderm, endoderm ve mezoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
YKH	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Hücrenin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi

2.2. Kök Hücre Çeşitleri

2.2.1. Embriyonik Kök Hücre

Embriyonik kök hücreler 4-5 günlük blastosiste ait iç hücre kitlesinden meydana gelmektedir. Organlarındaki tüm hücrelere dönüşebilme (pluripotent) yetenekleri vardır. Embriyonik kök hücre, zigot ve morula aşamasında totipotent, blastosist aşamasında pluripotent özelliktedir. Embriyoid cisimcikler adı verilen hücreler embriyonik kök hücreden elde edilmektedir ve bunlar ektoderm, endoderm ve mezoderm tabakalarından kökenlenen hücrelere farklılaşabilirler. Özetle, EKH'ler yüksek kendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler ve tüm fetal dokulara, yetişkin kök hücrelerine farklılaşabilmektedirler (Trounson, 2006).



Şekil 2.1. *In vitro* fertilizasyon sonrası artık tüplerden hazırlanan blastositlerden iç hücre kitlesinin (inner cell mass) ayrılması ve in vitro şartlarda embriyonik kök hücre kültürlerinin oluşturulması.

2.2.2. Embriyo Dışı Fetüs Kök Hücre

Embriyo dışı dokular olan plasenta, amniyon zarı ve göbek kordonunda bulunan hücreler embriyo dışı veya fetüs kök hücreleridir. Bu hücreler son yıllarda tıpta tedavi amaçlı kullanımı oldukça artmış önemli hücrelerdir. Fetüse zarar vermeden gebelik süresince veya doğum sırasında kolaylıkla ve etik problemler olmaksızın elde edilebilmektedirler. Bu hücreler yüzey işaretleyicileri bakımından embriyo ve yetişkin kök hücre özellikleri taşımaktadır (Alp Can, 2014).

2.2.3. Yetişkin Kök Hücre

Yetişkin kök hücreler (YKH) farklılaşma özellikleri sınırlı olan ve matür hücrelere farklılaşabilen, multipotent yapıda hücrelerdir. Yetişkin kök hücrelerin en önemli görevi buldukları dokuyu korumak ve onarmaktır. YKH türleri; hematopoetik kök hücre, mezenkimal kök hücre, nöral kök hücre, bağırsak kök hücresi, endotel kök

hücreleridir. 1960'lı yıllarda ilk kez kemik iliği ile yetişkin kök hücreler keşfedilmiştir. Bu hücreler hematopoetik hücreler olup vücutta tüm kan hücrelerini meydana getirebilen kök hücrelerdir (Kumar & Singh, 2006).

2.3. Kanser Kök Hücreleri

Son yıllarda çeşitli dokularda meydana gelen tümörlerin hücresel kaynağına bakıldığında kök hücreye benzer hücre toplulukları tespit edilmiştir ve bu hücrelere kanser kök hücreleri (KKH) adı verilmiştir. KKH, tıpkı normal kök hücreler gibi kendini yenileyebilen ve farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir. Ayrıca, klasik kanser tedavilerine (kemoterapi ve radyoterapi gibi) ve apoptoza dirençli olması, tümör oluşturabilmesi ve metastaza sebep olması bir diğer önemli özellikleridir (Alp Can, 2014).

Kanser kök hücrelerinin uygun niş ortamında yeniden tümör oluşturmasından ve KKH'nin yok edilmesinin oldukça zor olmasından dolayı radyoterapi ve kemoterapi sonrası tümörün yeniden nüksettiği hipotezleri oldukça fazladır. Mackillop 1983 yılında ilk kez KKH'nin var olduğunu öne sürmüştür (Yang & Chang, 2008). Örneğin, meme kanserinde klasik tedavilerden sonra yeniden tümör ve metastaz oluşumu görülebilir çünkü KKH sessiz halde uygun koşulları ve uyarıcıları beklemektedir. Bu sebeple güncel çalışmalarda tümör hücrelerinin tedavisi kadar kanser kök hücreleri tedavisi de önem taşımaktadır.

KKH'leri belirlemek için özel yüzey belirteçleri kullanılır, akım sitometri ve manyetik hücre ayırma teknikleri ile KKH'ler elde edilebilmektedir.

2.4. Kanser ve Sialik Asit

2.4.1. Meme Kanseri Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri tümör dokusunun içinde bulunan ve kanseri başlatan hücrelere verilen addır. Progenitör veya normal kök hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu kanser kök hücreleri meydana gelmektedir. Kanser kök hücreleri kemoterapi ve radyoterapiye karşı dirençli hücrelerdir (Iliopoulos, Hirsch, Wang, & Struhl, 2011).

Meme tümörü içindeki hücrelerin bir alt popülasyonunu, kanser kök hücreler oluşturmaktadır. Meme kanser kök hücresi ilk olarak 2003 yılında izole edilmiştir. İzolasyon için CD44, CD24 ve aldehit dehidrogenaz-1 (ALDH-1) yüzey belirteçleri kullanılmıştır. Bu çalışma ile meme kanserinin malignitesinin artmasının ve tedavi sonrası yeniden nüks etmesinin sebebinin kanser kök hücresi olduğu tespit edilmiştir (B. Wang et al., 2018) (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003).

2.4.2. Sialik Asit

Sialik asitler (Sia) dokuz karbonlu şekerlerdir. Sialik asitler hayvan hücrelerinin yüzeyinde glikolipit ve glikoproteinlerin terminal şekeridir ve yüzeyin negatif yüklü olmasını sağlarlar. İnsanlarda en sık bulunan sialik asit N-asetil nöraminik asit (Neu5Ac)'dir (Inoue, Kitajima, Sato, & Go, 2011). Sialik asitler birçok önemli biyolojik rollere sahiptir.

Sialilasyon, hücre adezyonu, sinyal tanıma ve protein stabilitesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarda rol oynamaktadır. Anormal sialilasyon sonucu, proliferasyonda artış, metastazda artış, ilaca direnç gibi malign tümör fenotipi özellikleri görülmektedir (Wei et al., 2016) .

Sialik asitler, glikan zincirlerinin ucuna eklenir ve glikokaliksini önemli bir bileşimini oluştururlar. Hücrenin yüzeyinde bulunan sialik asitler, hücre-hücre etkileşiminde, hücre sinyalizasyonunda ve hücrenin immün sistem ile etkileşiminde rol almaktadır (Meesmann et al., 2010).

2.4.3. Deaminonöraminik Asit

2-keto-3-deoksi-D-glisero-D-galakto-nononik asit (KDN) bir deamino nöraminik asit'tir ve sialik asit ailesinin bir türüdür. Neu5Ac içinde yer alan C5 pozisyonunda aseto-amid grubu yerine hidroksil grubu eklenmesi ile oluşmaktadır. Deaminonöraminik asit, insan dahil pek çok canlı türünde bulunmaktadır. Hayvan

hücrelerinde deaminonöraminik asit, düşük seviyelerde ifade edilmektedir. Deaminonöraminik asidi ilk olarak Inoue ve ark. gökkuşuğu alabalığı yumurtasından izole etmişlerdir (Inoue, Kitajima, & Inoue, 2002).

Deaminonöraminik asit, tıpkı diğer sialik asitler gibi hücrelerin yüzeyinde bulunan glikokonjugatlarda bulunmaktadır. Hayvan hücrelerinde deaminonöraminik asit, serbest şeker olarak oluşmaktadır. Bunun yanı sıra konjuge veya CMP-KDN şeklinde de bulunmaktadır (Testis et al., 1999).

Deaminonöraminik asit, Manno-6-fosfat ve fosfoenolpiruvatın (PEP) kondenzasyonu yolu ile oluşmaktadır (Şekil 2.2) (Inoue, Poongodi, Suresh, Chang, & Inoue, 2006).

KDN' nin oluşum mekanizması	
1. Reaksiyon Fosforilasyon	$\text{Man} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Man-6-P} + \text{ADP}$
2. Reaksiyon	$\text{Man-6-P} + \text{PEP} \longrightarrow \text{KDN-9-P} + \text{Pi}$
3. Reaksiyon Defosforilasyon	$\text{KDN-9-P} \longrightarrow \text{KDN} + \text{Pi}$

Şekil 2.2. KDN'nin oluşum mekanizması.

Hassas analizler ile yapılan çalışmalarda deaminonöraminik asidin insan dahil tüm memeli hücrelerinde bulunan bir sialik asit olduğu kanıtlanmıştır. Fetal kord kırmızı kan hücrelerinde, erişkin kırmızı kan hücrelerine kıyasla daha yüksek seviyede ifade edilmektedir. Aynı zamanda normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde de yüksek seviyede ifade edildiği görülmüştür (Inoue et al., 2006).

2.5. Monoklonal antikor tedavisi

Monoklonal antikorlar (mAb), başta kanser olmak üzere birçok hastalık tedavisi için kullanılmaktadır. Antikorlar sabit bölgesi (Fc) ve antijen bağlayan bölgelerinin (Fab) bulunduğu hafif ve ağır zincirden oluşmaktadır (Luo et al., 2017).

Monoklonal antikorlar, biyomedikal ve klinik uygulamalarda oldukça önem kazanmıştır. Doku örneklerinde proteinlerin işleyişini izlemek ve/veya tespitini yapabilmek, çeşitli biyolojik yolların aktivasyonunu veya inhibisyonunu sağlamak, antijenleri saflaştırmak gibi çeşitli çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Dolayısıyla teşhis ve tedavi için oldukça önem taşımaktadırlar (Stern, Flanagan, & Gildersleeve, 2016).

Mab, 1975 yılında Kohler ve Milstein tarafından geliştirilmiş hibridoma teknolojisi ile kanser tedavilerinde terapötik bir ajan olarak üretilmiştir. Bu teknoloji, immünize edilmiş bir hayvanın tek bir B hücrelerinin hücre kültürü ortamında çoğaltılmasıyla elde edilen antikorlardır (Mahmuda et al., 2017).

Patojenler veya anormal hücreler vücutta antikorlar tarafından fark edilir ve etiketlenirler. Bu etiketleme ile immün sistem bileşenleri aktifleşir ve antikor tarafından işaretlenen hücrelere saldırarak bu hücreleri yok ederler. Terapötik amaçlı geliştirilen antikorlar yüksek spesifite özelliği göstermektedir (Article, 2013).

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen ilk mAb'lar; 1997'de lenfoma için rituximab, 1998'de meme kanseri için trastuzumab'dır (Strome, Sausville, & Mann, 2007).

3. Gereç ve Yöntem

Bu çalışma kapsamında yapılan deneyler Ege Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Bölümünde, Ege Üniveristesi AREL’de ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Doku Tipi Laboratuvarı bünyesinde gerçekleştirildi.

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler listesi.

Kimyasal	Üretici Firma	Kullanım Amacı
CD44-APC (CD44 Antibody)	Miltenyi (130-102-563)	CD44+/CD24-/low meme kanser kök hücrelerin izolasyonu
CD24-PE (CD24 Antibody)	Miltenyi (130-102-732)	CD44+/CD24-/low meme kanser kök hücrelerin izolasyonu
WST1 kit	Roche (11-644-807-001)	Mab’ın sitotoksik etkisinin belirlenmesi
Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit	Millipore (MCH100105)	Apoptotik hücre ölçümü
RPMI-1640 medyum	Gibco (11879020)	Hücrelerin üretimi
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biowest (S1810)	Besi ortamına eklenen besleyici madde
Penisilin/Streptomisin	Thermo Scientific (SV30010)	Besi ortamına eklenen antibiyotik
Amfoterisin B	Sigma, A2942	Besi ortamına eklenen anti-fungal
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Biovision (2113-500)	Tampon çözelti
Trypsin-EDTA	Lonza (BE12-167F)	Kültüre edilen hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için kullanılan kimyasal
L-Glutamine	Thermo Scientific (SH3003401)	Besi ortamına eklenen (RPMI-1640’a) amino asit
Etanol	Merck	Dezenfeksiyon
Insulin, Human Recombinant	Merck	MCF 10A hücre hattının besi ortamında (DMEM yüksek glukoz) kullanılmaktadır.

hEGF	Merck - E9644	MCF 10A hücre hattının besi ortamında (DMEM yüksek glukoz) kullanılmaktadır.
Hidrokortizon	Merck – H0888	MCF 10A hücre hattının besi ortamında (DMEM yüksek glukoz) kullanılmaktadır.
Gentamisin	Thermofisher Scientific – 15750060	Besi ortamına eklenen antibiyotik
DMEM yüksek glukoz	Serox	MCF10A hücre hattının besi ortamı
Tavşan Kompleman	Onelambda - CAB-1D	Kompleman deneyinde kullanılan serum
HLA	Onelambda	Kompleman deneyinde kullanılan pozitif kontrol
AO/EB	Onelambda	Kompleman deneyinde hücrelerin boyanmasında kullanılan kimyasal
Mineral yağ	Onelambda	Kompleman deneyinde hücrelerin ortamı olarak kullanılan yağ

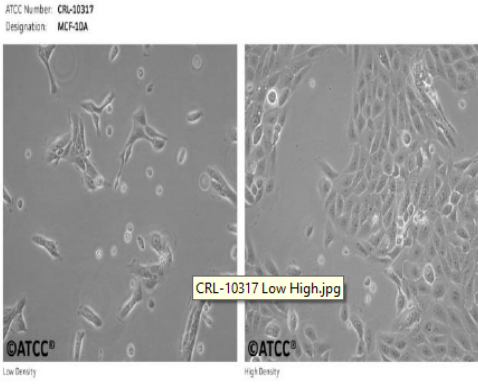
Tablo 3.2. Kullanılan cihazların listesi.

Cihaz	Marka	Kullanım Amacı
Class II Biohazard Safety Laminar Kabin	ESCO	Hücre Kültürü ile ilgili işlemlerin Yapılması
CO2 İnkübatör	Eppendorf/New Brunswick Scientific-Galaxy 170R	Hücrelerin inkübasyonu
Flowcytometry	FACS Aria/BD	KKH izolasyonu ve matürasyon belirteçlerinin incelenmesi
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge (5804R)	Hücrelerin toplanması, lizat eldesi
Su Banyosu	Nüve-BM 402	Lizat eldesi
Ultra low Temperature Freezer (- 80 °C)	New Brunswick-U410 Premium	Hücrelerin dondurulması- örneklerin saklanması-lizatın saklanması
Hassas Terazi	Precisa, Switzerland	Kimyasal maddelerinin

		tartılması
Arthur™ Novel fluorescence cell counter	NanoEntek	Apoptoz deneyi ölçümlerinde kullanılmıştır.
İnverted Mikroskop	Olympus-CKX41	Hücre kültür işlemlerinde hücrelerin morfolojilerinin incelenmesi
Floresan Mikroskop	Olympus BX 50, Japan	İmmünfloresan boyama görüntülenmesi
pH metre	Hanna, USA	Deney solüsyonlarını pH ölçümü
Spektrofotometre	Thermo Electron Corporation – Multiskan Spectrum	Wst1 deneyinin ölçümünde kullanılmıştır.

3.2. Hücre Hatlarının Üretilmesi

Çalışmada insan normal meme hücre hattı olan MCF10A, insan meme kanser hücre hattı MCF-7 ve kanser hücrelerinden elde edilen MCF-7 kanser kök hücresi (MCF-7 KKH) kullanılmıştır.

Adı:	MCF10A	
Organizma:	İnsan	
Doku:	Meme	
Hücre Tipi:	Epitelyum	
Kültür Özelliği:	Aderent	
Onkogen:	Yok	

Şekil 3.1. MCF10A hücre hattının genel özellikleri ve mikroskopik görüntüsü.

Adı:	MCF7	
Organizma:	İnsan	
Doku:	Meme bezi, meme, metastatik bölgeden elde edilir	
Hücre Tipi:	Epitelyum	
Kültür Özelliği:	Aderent	
Onkogen:	Hücreler WNT-7B onkogenini eksprese eder.	

Şekil 3.2. MCF7 hücre hattının genel özellikleri ve mikroskopik görüntüsü.

MCF10A hücre hattı DMEM yüksek glikoz (Serox, SRX0106-500) besi ortamında üretilmiştir. DMEM yüksek glikoz besi ortamına %5 Fetal Sığır serumu (Gibco, 10270106), 20ng/ml Epidermal Büyüme Faktörü (Merck – E9644), 5 mg/ml Hidrokortizon (Sigma, H-0888), 10µg/ml İnsulin (Sigma, 1-1882), %1 Penisilin/ Streptomisin (Thermo Scientific, SV30010) eklenmiştir.

MCF-7 hücre hattı L-glutamin içeren RPMI-1640 (Gibco-11879020), besi ortamında üretilmiştir. RPMI-1640 besi ortamına %10 Fetal Sığır Serumu, %1 Penisilin/Streptomisin, %1 Amfoterisin B (Gibco, 15290-018) eklenmiştir.

MCF-7 S+ hücre hattı L- glutamin içeren RPMI-1640 besi ortamında üretilmiştir. RPMI-1640 besi ortamına %1 Fetal Sığır Serumu, %1 Penisilin/Streptomisin, %0,2 Gentamisin (Thermofisher Scientific- 15750060) eklenmiştir.

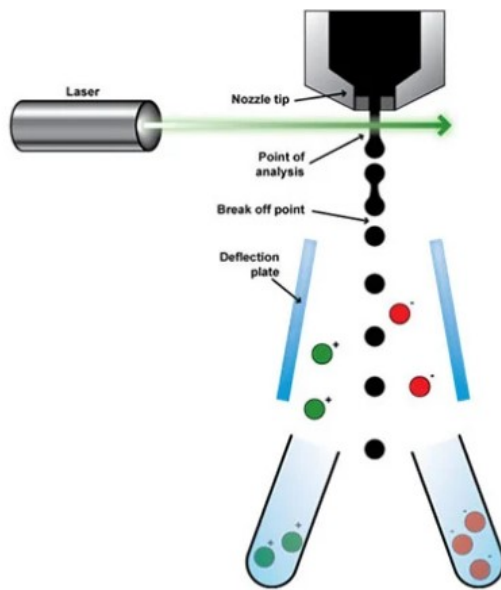
Hücreler 25cm² steril flaslara ekilerek 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücreler her gün inverted mikroskopta incelenmiştir. Flaslarda hücre yoğunluğu %80 ve üzerine ulaştığında pasajlama işlemi yapılarak hücreler deneyler için sürdürülmüştür ve stok oluşturmak için dondurma işlemleri

yapılmıştır. Tüm bu işlemler Laminar hava akımlı kabinde steril koşullarda yapılmıştır. Hücrelerin stokları -80°C’de saklanmıştır.

3.3. Floresan Aktif Hücre Ayırma (FACS) Yöntemiyle CD44⁺/CD24⁻ Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması

MCF-7 kanser kök hücresinin izolasyonunda floresan aktif hücre ayırma yöntemi (FACS) kullanılmıştır. FACS, belli bir hızda akan sıvıda bulunan hücrenin granüllülüğünü (Side Scatter), büyüklüğünü (Forward Scatter) ve hücrenin antijenine spesifik bağlanan antikorun floresan ışımalarını ölçmektedir.

Süspansiyon halindeki hücre, lazer ışığı bulunan bölmeden geçmektedir. Hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller fiziksel özelliklerini belirtmekte ve bu veriler toplanarak elektronik ortamda analiz edilmektedir. Böylece hücrenin büyüklüğü, immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli ve canlılığı hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca floresan işaretli belirteçlerle işaretlenen hücrelerin ayırmasını yapmaktadır (Fulawka, Donizy, & Halon, 2014).



Şekil 3.3. FACS cihazında yüzey belirteçleri ile işaretlenen hücrelerin ayrılması.

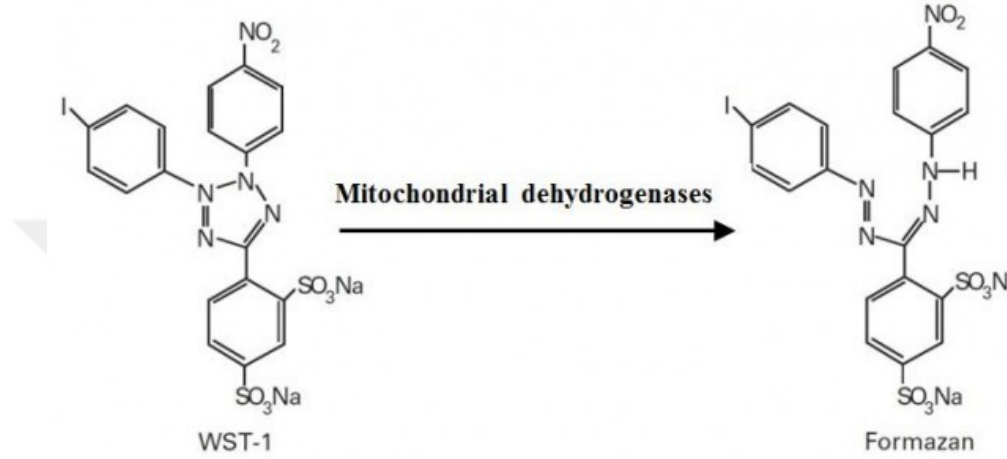
MCF-7, 75 cm²'lik steril flasklarda, %80 ve üzeri yoğunluğa ulaştıktan sonra hücreler tripsin-EDTA (Lonza- BE12167F) ile muamele edilerek yaklaşık 5 dakika inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletilmiştir ve hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Tripsin-EDTA'nın hücreler üzerindeki aktivitesini durdurmak için tripsin-EDTA'nın 2 katı hacminde fetal sığır serumu içeren besi ortamı (RPMI-1640) eklenmiştir. Ardından hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak pellet 5 ml steril ve soğuk 1x PBS (Biovision 113500) ile resüspanse edilmiştir. Süspansiyondan 10 µl örnek alınarak tripan mavisi ile sayım yapılmıştır. PBS'li hücre süspansiyonu tekrar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Tekrar süpernatant atılmıştır ve pelletin üzerine 100µl PBS, 10'ar µl CD44-FITC (Miltenyi-130102563) ve CD24-PE (Miltenyi 130102732) belirteçleri eklenmiştir. Karanlık ortamda +4 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından süspansiyonun üzerine PBS eklenmiştir ve santrifüj edilerek hücre pelleti toplanmıştır. Süpernatant atılarak yeni PBS pellete eklenmiştir ve resüspanse edilmiştir. Filtre kapaklı polistren tüpe süspansiyon filtreden geçilerek eklenmiştir. Daha sonra hücreler Ege Üniversitesi AREL'de bulunan floresanla aktive hücre ayırma cihazı kullanılarak (FACS Aria II; BD Pharmingen) kanser kök hücreleri toplanmıştır (Greve, Kelsch, Spaniol, Eich, & Go, 2012).

Elde edilen kanser kök hücreleri 25cm² steril flasklara ekilmiştir ve 37°C'de %5CO₂ inkübatörde çoğaltılmıştır.

3.4. WST1 Analizi İle Monoklonal Antikorum Sitotoksitesinin Belirlenmesi

WST-1 analizi, canlı hücrelerden 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu gibi tetrazolyum tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan spektrofotometrik bir sitotoksite testidir. Proliferasyon gösteren hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi artmaktadır. Tetrazolyum tuzları bu enzim tarafından formazan tuzlarına dönüştürülmektedir. Formazan tuzlarının oluşumu sonucu meydana gelen renk değişimi spektrofotometre cihazı ile uygun dalga boyunda ölçülmektedir. WST-1 analizinde canlı hücreler sarı

renk oluştururken ölü hücrelerde renk oluşumu görülmemektedir. Bu analiz ile monoklonal antikorun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmektedir (Terzioğlu, 2014), (TOKUR & AKSOY, 2019).



Şekil 3.4. 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum tuzunun mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile formazan kristallerine dönüşmesi.

Hücreler tripsin ile 37°C'de yaklaşık 5 dakika inkübe edilerek flask yüzeyden ayrılmaları sağlanmıştır. Ardından tripsin aktivasyonunu inaktive etmek için Fetal Sığır Serumı içeren besi ortamı eklenmiştir. Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, yeni besi ortamı eklenerek pellet resüspanse edilmiştir. 1:1 oranında Tripan mavisi ile hücre süspansiyonu karıştırılmış (50ul hücre süspansiyonu + 50ul tripan mavisi) ve hücre sayımı yapılmıştır. 96 kuyucuklu plakalara 2×10^4 hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Bir kuyucuktaki total hacim 100µl olacak şekilde üzerine her hücrenin kendi besi ortamı eklenmiş ve bir gece 37°C ve % 5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Antikorlar farklı dilüsyon oranlarında hazırlanmıştır (Dilüsyon oranları : 1/50 - 1/100 - 1/250 - 1/500 -

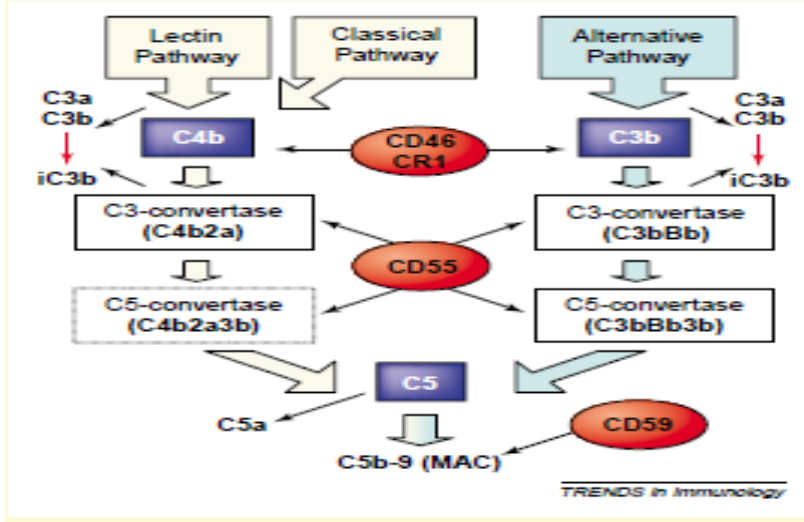
3.5. Kompleman Bağımlı Sitotoksiste

Kompleman sistem, bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Bakteri, tümör gibi yabancı hücrelerin yok edilmesinde etkin bir dizi protein içermektedir. Kanda bulunan kompleman bileşenleri, hücre yüzeylerinde C3b veya C4b gibi kompleman proteinlerinin biriktirilmesiyle hücrelerin parçalanmasını sağlamaktadır (Buettner et al., 2007).

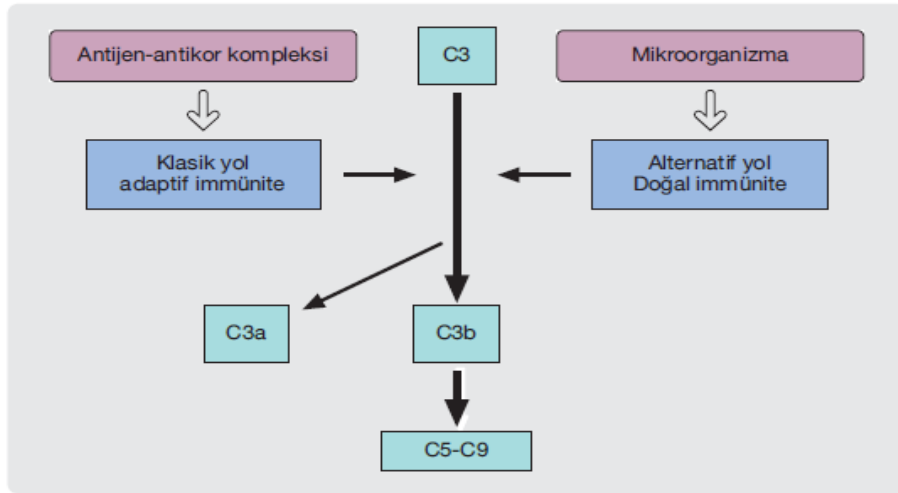
Kompleman sistem, serum proteinlerinin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Bu moleküller karaciğerde üretilmektedir. Proenzim olan kompleman proteinlerinin, aktive olabilmeleri için önceden aktifleşmiş enzimler ile proteolitik etkileşim gerekmektedir. Aktive olan enzim bir sonraki basamakta başka molekülleri aktive ederek devam eden bir kaskad sistemini oluştururlar. Bu yolun aktifleşmesi için üç yol bulunmaktadır:

- Antijen-antikor kompleksi olan klasik yol
- Karbonhidratların bağlandığı lektin yolu
- Mikroorganizmalar alternatif yol

Bu 3 yolda da ortak olan kompleman 3'ün (C3) iki fragmente yani C3a ve C3b'ye bölünmesidir. C3a fagositleri ve mast hücrelerini aktive ederken, C3b, fagositler için reseptör görevi görmektedir ve aynı zamanda membran atak kompleksi adı verilen ve hücre lizisine sebep olan kompleman proteinini (C5-C9) aktifleştirmektedir. Klasik yolun ilk adımı antijen ve antikorun bağlanmasıyla birlikte C1q'nun uyarılması ve böylece immün sistemin aktive olmasını sağlamaktadır. Lektin yolu C2 ve C4'ün aktive olması ile başlayarak tıpkı klasik yoldaki gibi C3 ile devam etmektedir. Alternatif yol için antikora ihtiyaç duyulmamaktadır ve C3b'nin mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan hidroksil ve amin gruplarına bağlanmalarıyla aktifleşir ve ardından klasik yoldaki gibi aktifleşmektedir (Düzgün, 2014), (Lan & Tinckam, 2018), (Nechansky et al., 2009).



Şekil 3.6. Kompleman sistemin 3 temel yolağı.



Şekil 3.7. Etki faktörlerinin kompleman sistemde seçtikleri yollar.

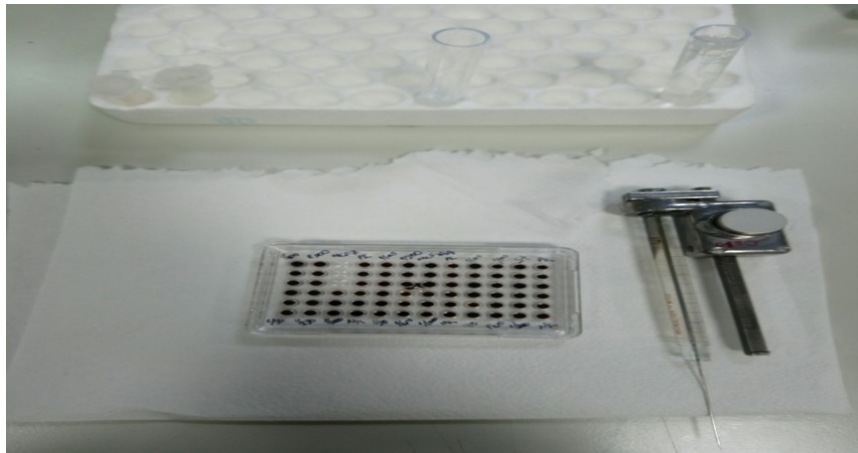
Bu analizde amaç, tümör hüresine bağlanan monoklonal antikorun immün sistem elemanları ile ortak çalışması sonucunda spesifik bir tedavi oluşturmaktır.

Terasaki plakalara hücre sayısı yaklaşık 100-200 olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Hücrelerin üzerine farklı dilüsyon oranlarında (1:50–1:100–1:250–1:500–1:1000) 1'er µl antikor eklenmiştir ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 5µl tavşan komplemanı eklenerek 1 saat oda

sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra 1'er damla akridin oranj etidyum bromür (AO/EB) eklenerek 5 dakika bekletilmiştir. Ardından Ege Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan floresan mikroskopta görüntüleme yapılmış ve kuyucuklardaki hücreler tek tek sayılmıştır. Akridin oranj ölü hücreleri kırmızı renge boyarken, etidyum bromür canlı hücreleri yeşile boyamıştır. Pozitif ve negatif kontrol kullanılmıştır. Pozitif kontrolde antikor yerine HLA kullanılmıştır. Negatif kontrolde antikor yerine PBS kullanılmıştır (Prang et al., 2005),(Razmkhah & Ghaderi, 2013).



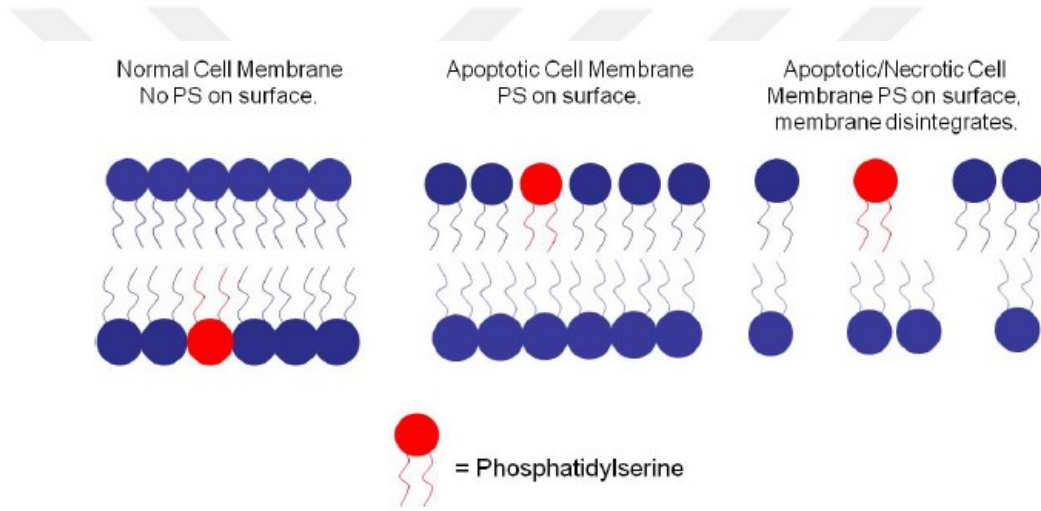
Resim 3.1. Kompleman deneyinde kullanılan materyaller.



Resim 3.2. Kompleman deneyinde kullanılan terasaki plaka ve hamilton pipet

3.6. Annexin-V Yöntemi ile Apoptotik Hücre Ölçümü

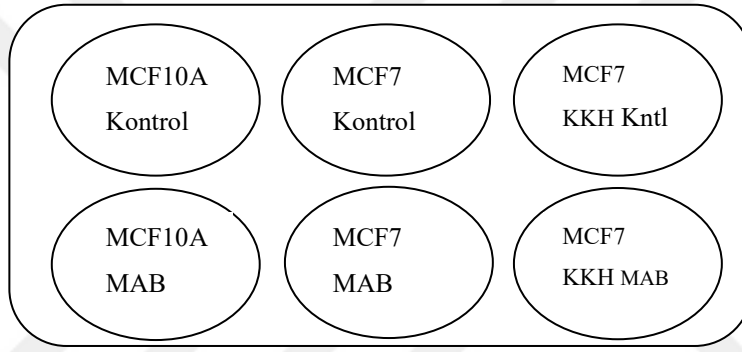
Fosfolipidlerin (PS), hücrelerin iç yüzeyinde bulunan bir fosfolipittir. Hücre apoptotik sürece girdiğinde bu protein hücrenin dış yüzeyine transloke olur. Annexin-V, fosfolipidlerine bağlanabilen bir proteindir. Ancak bu bağlanma hücrenin dışında meydana gelir. Özetle, apoptotik hücrede PS'ler dış yüzeye transloke olmakta ve Annexin V proteini de PS'lere bağlanarak bu hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır (Engeland, Nieland, Ramaekers, Schutte, & Reutelingsperger, 1998), (Demchenko, 2013), .



Şekil 3.8. Hücrenin canlı, apoptotik veya nekrotik olmasına göre PS'lerin hücre membranındaki konumu.

Apoptoz analizi, Arthur cihazı kullanılarak yapıldı. 6 kuyucuklu plaklara her kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve 1 gece 37°C , %5 CO_2 olan inkübatörde hücrelerin tutunması sağlandı. İnkübasyondan sonra deney grubu hücrelerine 1/1000 konsantrasyonda monoklonal antikor eklendi ve 24 saat inkübe edildi (Deney kontrol grubuna antikor eklenmemiştir). İnkübasyon süreleri dolduktan sonra kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 1x PBS eklenerek yıkama yapıldı. Ardından her kuyucuğa % 0.05 Tripsin-EDTA eklenerek 37°C 'de yaklaşık 5 dakika tutularak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Tripsin

inaktivasyonu için her kuyucuğa eklenen tripsinin 2 katı ml'de Fetal Sığır Serumunu içeren RPMI 1640 besi ortamı eklendi ve santrifüj tüplerine aktarıldı. 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerlerine besi ortamı eklenerek resüspanse edildi. 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine hücre süspansiyonlarından 100'er µl ve Muse™ Annexin V & Dead Cell reaktifinden 100'er µl ilave edildi ve 20 dk oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi. Ardından Arthur cihazında ölçüm yapıldı. Tüm analizler 3'er tekrarlı yapıldı (Pratama et al., 2018), (G. Wang et al., 2005), (Mattes, Michel, Goldenberg, & Sharkey, 2009).



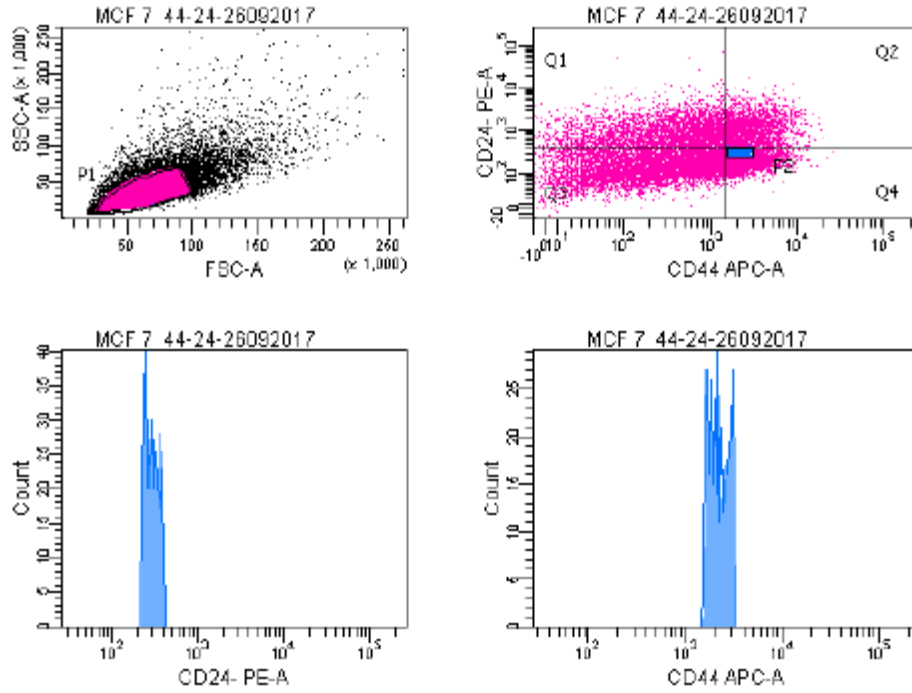
3.9. Apoptoz deneyi şeması

4. Bulgular

4.1. Floresan Aktif Hücre Ayırma (FACS) Yöntemiyle CD44⁺/CD24⁻ Kanser Kök Hücrelerinin Elde Edilmesi

Floresan aktif ayırma sonucunda CD44⁺/CD24⁻ belirteçli meme kanseri kök hücreleri ayrıştırılmıştır. İşlem sonucunda kanser kök hücresi olmayan bulk popülasyon ile kanser kök hücreleri elde edilmiştir.

FACSDiva Version 6.1.3



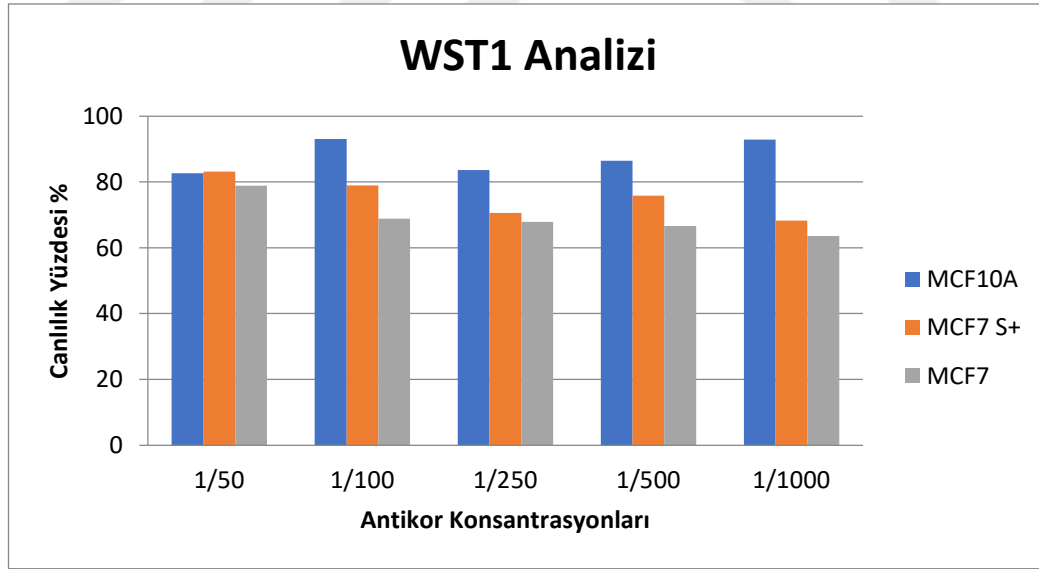
Şekil 4.1. FACS analizinin grafik verileri.

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	14,973	74.9	74.9
P2	398	2.7	2.0
NOT(P2)	14,575	97.3	72.9
Q1	3,474	23.2	17.4
Q2	2,046	13.7	10.2
Q3	7,258	48.5	36.3
Q4	2,195	14.7	11.0

Şekil 4.2. FACS analizinin sayısal verileri.

4.2. WST1 Yöntemi Monoklonal Antikorun Sitotoksosite Analizi

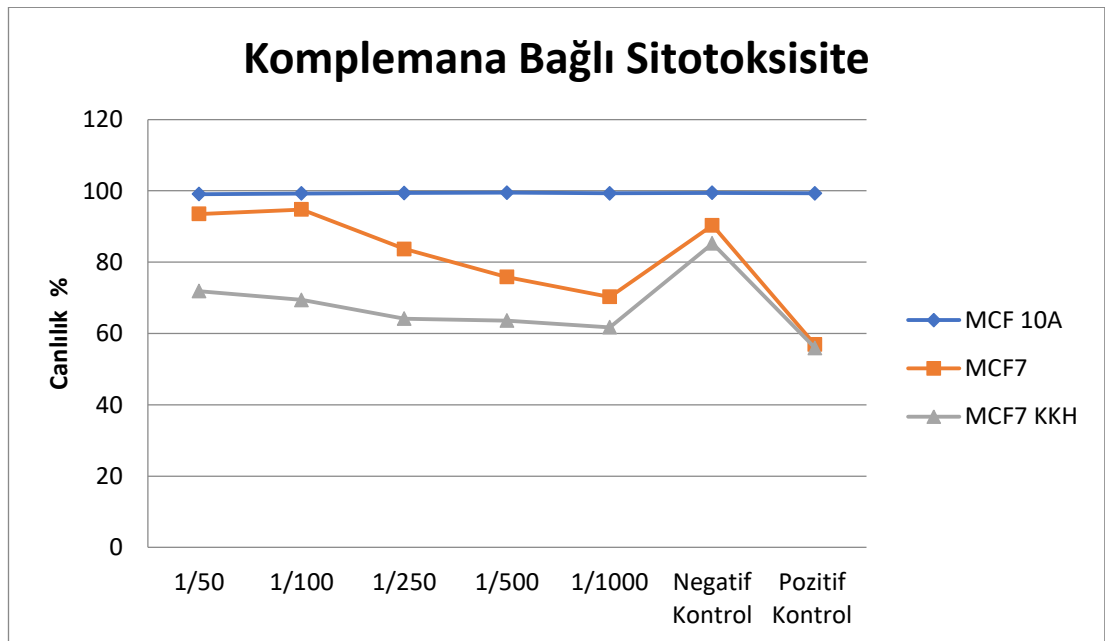
WST1 analizinde tüm deney grupları 3 tekrarlı yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Excel programında tablo yapılmış ve ortalamaları alınarak grafik oluşturulmuştur. Farklı konsantrasyonlardaki antikorun hücreler üzerinde canlılık etkisi grafik 4.1.'de gösterilmiştir. 1/50 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdeleri; MCF10A için %82,61, MCF7 için %78,84, MCF7 KKH için %83,16'dır. 1/100 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdeleri ; MCF 10A için %93,06, MCF7 için %68,87, MCF7 KKH için %78,98'dir. 1/250 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için; %83,59, MCF7 için %67,89, MCF7 KKH için %70,56'dır. 1/500 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için %86,44, MCF7 için %66,60, MCF7 KKH için 75,86'dır. 1/1000 konsantrasyonda hücrelerin canlılıkları yüzdeleri; MCF10A için %92,81, MCF7 için %63,56, MCF7 KKH için %68,28'dir. Konsantrasyon oranı arttıkça canlılık yüzdesi azalmıştır.



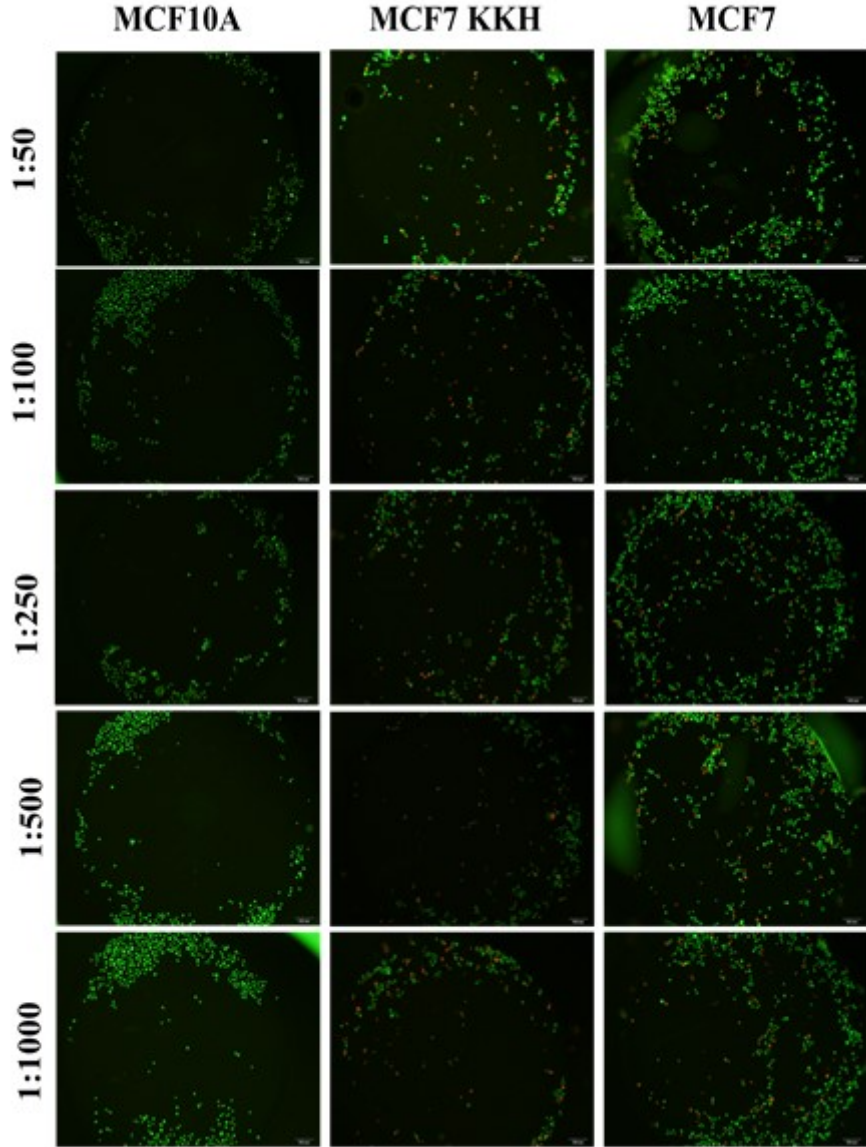
Grafik 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki antikorun MCF10A, MCF7 ve MCF7 KKH üzerine etkisi.

4.3. Komplemana Bağımlı Sitotoksiste Analizi

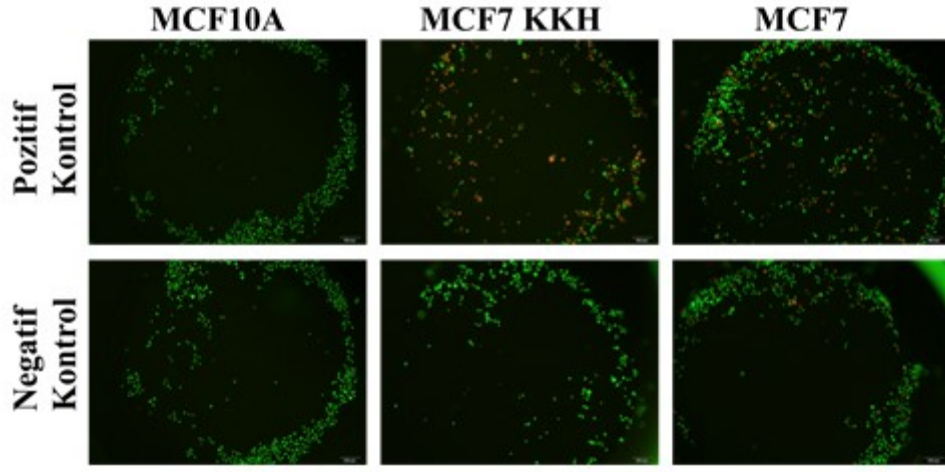
Kompleman analizinde tüm deney grupları 3 tekrarlı yapılmıştır. Sayılan hücreler Excel programında ortalamaları alınarak canlılık yüzdesi hesaplanmış ve grafik oluşturulmuştur (Grafik 4.2.). Sayılan hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü Şekil 4.3'te , pozitif ve negatif kontrollerin floresan mikroskop görüntüsü Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. 1/50 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için %99,07, MCF7 için %93,49, MCF7 KKH için %71,89'dur. 1/100 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için %99,07, MCF7 için %94,76, MCF7 KKH için %69,4'tür. 1/250 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için %99,49, MCF7 için %83,7, MCF7 KKH için %64,16'dır. 1/500 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için %99,48, MCF7 için %75,83, MCF7 KKH için %63 ,63'tür. 1/1000 konsantrasyonda hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için %99,3, MCF7 için %70,25, MCF7 KKH için %61,72'dir. Negatif kontrolde hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için %99,45, MCF7 için %79,92, MCF7 KKH için %72,5'tir. Pozitif kontrolde hücrelerin canlılık yüzdesi; MCF10A için %99,28, MCF7 için %58,86, MCF7 KKH için 60,92'dir. Konsantrasyon oranı azaldıkça ölüm oranı da azalmaktadır. Negatif kontrol ve pozitif kontrol anlamlı çıkmıştır.



Grafik 4.2. Farklı konsantrasyonlardaki antikorun kompleman ile hücreler üzerindeki etkis



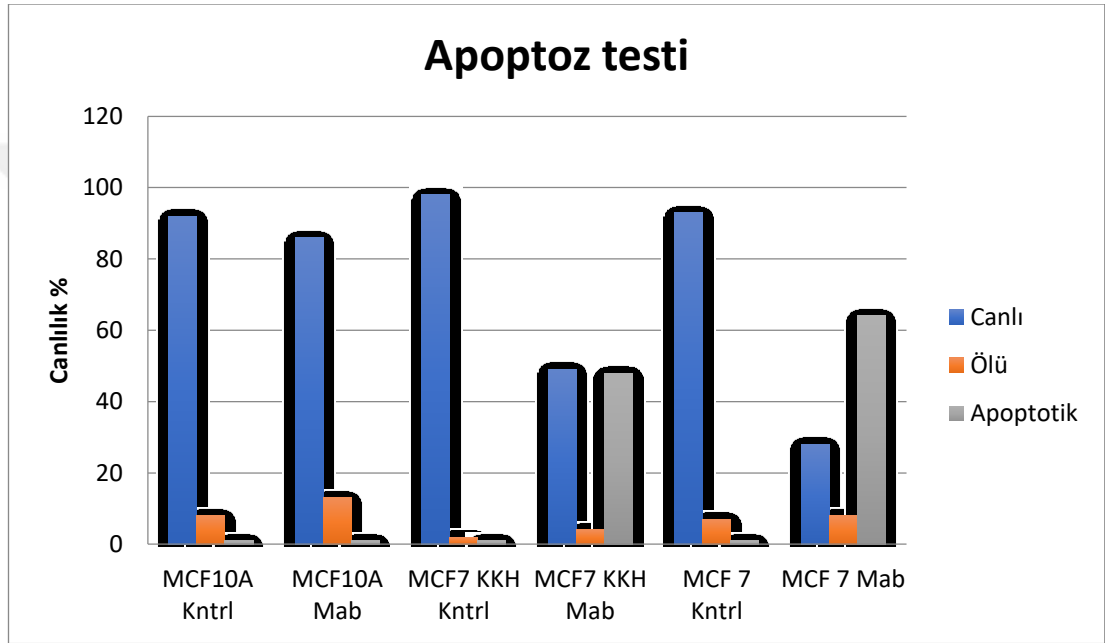
Şekil 4.3. Komplemana bağımlı sitotoksosite deneyinin floresan mikroskopunda görüntülenmesi.



Şekil 4.4. Komplemana bağımlı sitotoksosite deneyinin pozitif ve negatif kontrollerinin floresan mikroskopunda görüntülenmesi.

4.4. Apoptoz Analizi

Apoptoz analizi Arthur cihazında 3 tekrarlı yapılmıştır. Apoptoz deneyinde 1/1000 konsantrasyondaki monoklonal antikor kullanılmıştır. Hücrelerin canlılık yüzdesi grafiği Grafik.4.3'te gösterilmiştir.



Grafik 4.3. Antikorum 1/1000 oranındaki konsantrasyonunun apoptotik etkisi.

5. Tartışma

Kanserin büyümesinde, metastazında ve tedavi sonrası tekrarlamasında kanser kök hücrelerin etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu sebeple KKH'lerin mekanizmasının anlaşılması ve hedeflenmesi klinik tedavilerin başarısını arttıracaktır (Nilendu, Kumar, Kumar, Pal, & Sharma, 2018).

Günümüzde kemoterapi ve radyoterapi gibi hücreye spesifik olmayan tedavilerin yerine antikor aracılı immünoterapi ile kanser tedavileri geliştirilmektedir (Gelderman, Tomlinson, Ross, & Gorter, 2004). Poliklonal antikorlar düşük özgüllüğünden dolayı immünojenik yanıtta sınırlı başarıya sahiptirler. Monoklonal antikorların gelişmesi, antikorun tutarlılığının ve özgüllüğünün artmasını dolayısıyla daha yüksek başarı ile sonuçlanmayı sağlamıştır. Monoklonal antikorlar, biyomedikal ve klinik uygulamalarda oldukça önem kazanmıştır. Doku örneklerinde proteinlerin işleyişini izlemek ve/veya tespitini yapabilmek, çeşitli biyolojik yolların aktivasyonunu veya inhibisyonunu sağlamak, antijenleri saflaştırmak gibi çeşitli çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Dolayısıyla teşhis ve tedavi için oldukça önem taşımaktadırlar (Stern et al., 2016). Klinik kullanımı onaylanan ve sıklıkla kullanılan CD20 antikorları; rituksimab, ofatumab ve obinutuzumab'tır. Ancak bu antikorların tedavisinden sonra kanserin nüksettiği görülmektedir. Bu nedenle monoklonal antikorların geliştirilmesi önem konusudur. Mab'ların etki mekanizmaları; antikora bağlı hücrel sitotoksiste, komplemana bağlı sitotoksiste, apoptoz indüksiyonu ve kanser hücresinin gelişiminde önemli reseptör ve moleküllerin inhibisyonudur. Mab teknolojisi ile kanser ve kanser kök hücrelerin KBS veya ABHS'ye duyarlılığını düzenleyen yüzey antijenlerin hedeflenmesi, üretilen mAb'ın öldürme mekanizmasını belirlemektedir (Wirt et al., 2017). Metastaz yapan veya sessiz olarak niş ortamında bulunan hücrelerin hedef alınması için dolaşım sisteminde bulunan komplemanlar ile immünoterapinin indüklenmesi etkili ve kesin sonuçlar elde etmek için umut vadeden bir yöntemdir (Buettner et al., 2007), (Shuptrine, Surana, & Weiner, 2012).

CD20 antikorları tip I ve II şeklinde gruplanır. Tip I antikorları KBS'yi indüklemektedir. Ancak doğrudan hücre ölümüne olan etkileri zayıftır. Tip II antikorları ise doğrudan hücre ölümünü indüklerken KBS etkinliği zayıftır. ABHS ve

KBS önemli antikor fonksiyonlarıdır ve bu yolların aktive olması için Fc modifikasyonları geliştirilmektedir. Glikosilasyon modifikasyonları veya aminoasit sekanslarındaki modifikasyonlar ile yeni teknolojiler geliştirilmektedir. Hem ABHS hem de KBS için etkili antikorların üretilmesi, protein mühendisliği ve glikomühendislik teknolojileri ile birlikte geliştirilmesi daha etkin sonuçlar elde edileceğini düşündürmektedir (Wirt et al., 2017).

Monoklonal antikorlar üretim şekillerine göre ayrılmıştır. Murin mAb'ların immün sistemdeki etkileşimlerinden dolayı kimerik mAb'lar üretilmiştir. Murin mAb'lardaki Fc kısmı, insan Fc ile değiştirilmişken, kimerik mAb'larda Fc kısmı bağışıklık sistemini uyaracak özellikte geliştirilmiştir.

Günümüzde kullanılan mAb'ların çoğu, komplemana bağlı sitotoksikite ve antikora bağlı hücrel sitotoksikiteye etkili olan IgG1 izotipindedir. ABHS'ye dirençli olan hücreler KBS'ye duyarlı iken KBS'ye dirençli hücreler ABHS'ye duyarlıdır. Dolayısıyla, mAb konsantrasyonu, bu iki mekanizmanın sinerjik veya antagonik olarak işlev görüp görmedikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilmektedir (Tackenberg et al., 2015), (Strome et al., 2007).

Kanser hücreleri, immün sistem tarafından tanınmaktan ve yok edilmekten kaçınırlar. Tümörün büyümesi ve metastazı için kan dolaşımına erişmesi gerektiğinden, öncelikle kanda bulunan kompleman sisteminin kullanılması, kanser immünoterapisinde mAb aracılı KBS'nin önemini göstermektedir (Buettner et al., 2007).

Mab'ın konsantrasyonu tümör gelişimini durdurmak ve tümör hücrelerini yok etmek için oldukça önemlidir. Düşük konsantrasyondaki terapötik antikorların genellikle tümörün direnç mekanizmasına etkisi yetersiz olabilmektedir. Ancak yüksek konsantrasyonda mAb, hücre ölümünü gerçekleştirmesine rağmen kompleman proteinlerinin birikmesine ve erken tüketilmesine neden olabilir, böylece etki mekanizmasında verim düşmektedir. Bu sebeple antikorun konsantrasyonunun seçilmesinde KBS doyurucu miktarın seçilmesi önemlidir. (Stasiłojć, Österborg, Blom, & Okrój, 2016), (S.-Y. Wang & Weiner, 2008). Çalıştığımız antikorun etkin konsantrasyonu en düşük olan 1/1000 konsantrasyonda görülmüştür.

CD20 monoklonal antikorlarından olan ve meme kanserinde sıklıkla kullanılan Trastuzumab, Bcl-2 ailesi üyelerini hedef aldığı bilinmektedir. CD20 mAb'ları KBS ve/veya ABHS etkinliğinin yanı sıra apoptotik yolağı da indüklediği tespit edilen

monoklonal antikorlardır. Çalıştığımız antikorun da hem KBS etkisinin hem de apoptotik etkisinin bulunması klinikte oldukça tercih edilen CD20 antikorları gibi etkili bir tedavi aracı olabileceğini düşündürmektedir (Hassan, Watari, Abualmaaty, Ohba, & Sakuragi, 2014), (Gelderman et al., 2004).

Karbonhidratlar, hücre-hücre etkileşimi, protein katlanması, sinyal iletimi gibi oldukça önemli hücresel mekanizmalarda kritik role sahiptir. Bu sebeple glikolizasyon büyük önem taşımaktadır. Anormal glikozilasyon, kanser ile sonuçlanmaktadır. Karbonhidratlar teşhis ve tedavi için oldukça önemli hedeflerdir. Karbonhidratların önemi, karbonhidrat antikorlarının geliştirilmesi için bir hedef oluşturmuştur. Antikorlar, karbonhidratların ifadesinin ve hücre mekanizmasındaki rollerinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Ancak karbonhidrat bağlayan monoklonal antikor, antiprotein ve antipeptid monoklonal antikorlarının oldukça gerisinde kalmıştır. Ulusal Bilimler Akademisi tarafından verilmiş olan bir raporda, glikan spesifik antikorların bulunmaması, bu alandaki kilit eksikliktir (Stern et al., 2016).

Sialik asitler, glikan zincirlerinin ucuna eklenir ve glikokaliksin önemli bir bileşimini oluştururlar. Hücrenin yüzeyinde bulunan sialik asitler, hücre-hücre etkileşiminde, hücre sinyalizasyonunda ve hücrenin immün sistem ile etkileşiminde rol almaktadır (Meesmann et al., 2010). Sia'larda meydana gelen anormal sialilasyon hücrelerin kanserleşmesine sebep olmaktadır (Vajaria, Patel, Begum, & Patel, 2016).

Deaminonöraminik asit, sialik asit ailesinin bir üyesidir. Memelilerde deaminonöraminik asit oluşumu kolaylıkla saptanamayacak kadar küçüktür. İmmünohistokimyasal yöntemlerle memeli dokularında α -2 \rightarrow 8 bağlı oligoKDN'yi tanıyan monoklonal antikor olan mAb.kdn8kdn ile glikoprotein yapıları gösterilmiş ve dokulardaki deaminonöraminik asit miktarları incelenmiştir (Kanamori et al., 1994). Tümör hücrelerinde deaminonöraminik asit içeren glikokonjugatlar tanımlanmış ve tümör teşhisi için hassas problemler olarak kullanılabilirliği öne sürülmüştür. Bu sebeple kanser biyolojisi çalışmalarında anahtar molekül olarak kullanılabilirlikleri düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, akciğer, ovaryum ve meme kanseri dokularında artmış deaminonöraminik asit ifadesi olduğu gözlenmiş, bununla birlikte kanser tanısı ve tedavisi için kullanılabilirliği ihtimali ortaya konmuştur (Inoue et al., 2006), (Yabu et al., 2013).

Deaminonöraminik asit antijeni normal memeli hücrelerinde oldukça düşük seviyede ifade edilirken kanser hücrelerinde yüksek ifadesi, hedefe spesifik tedavilerde kullanılabilir bir molekül olduğunu düşündürmüştür. Bu sebeple tedavi amaçlı üretilen yeni bir mAb olan deaminonöraminik asit monoklonal antikoru üretilmiştir. Yapılan birçok çalışmada sialik asit seviyeleri ile KBS aktiviteleri arasında bir korelasyon görülmektedir (Luo et al., 2017). Bu nedenle üretilen deaminonöraminik asit monoklonal antikorunun KBS üzerinde etkisi incelenmiş ve sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada kullanılan mAb, çalışma grubumuz tarafından önceki projeler sonucu elde edilmiştir. Literatürde bu mAb ile ilgili bilgiler henüz yayınlanmamıştır. WST1 analizi mAb'ın uygun sitotoksik etkisinin olduğu doz aralığının belirlenmesi için yapılmıştır. WST1 analizi sonucunda kanser ve kanser kök hücrelerinde 1/50 konsantrasyonda en az sitotoksik etki görülmüştür. 1/1000 konsantrasyon sitotoksik etkisi en yüksek doz olarak belirlenmiştir. Epitelyum hücreleri üzerine sitotoksik etkisi oldukça düşüktür. Komplemana bağlı sitotoksikite analizi, immün sistemdeki kompleman molekülleri ile en etkili sitotoksik dozun belirlenmesi için yapılmıştır. Komplemana bağlı sitotoksikite deneyinde de 1/1000 konsantrasyonda en etkili sitotoksik sonuç alınmıştır. Bu değerler sonucunda apoptoz deneyinde 1/1000 konsantrasyonun apoptotik etkisi araştırılmış ve diğer analizlerle birlikte anlamlı sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda deaminonöraminik asit mAb'ı için konsantrasyon azaldıkça etkinliğin arttığı görülmektedir. Yüksek konsantrasyonda mAb'ın etkinliği oldukça düşüktür. Bunun sebebi olarak mAb'ın yüksek konsantrasyonda hücreye bağlanamadığı, homojen olarak çözünmediği, çapraz bağlanmaların meydana geldiği veya kompleman sistemdeki aşırı doyurucu ve biriktirme etkisi ile sistemin verimini düşürdüğü düşünülmektedir. Çalıştığımız antikorun klinikte kullanılan antikorların etki mekanizmalarına sahip olduğu gösterilmiştir. Klinikte kullanılan mAb'lardan farklı olarak en önemli özelliği kanser oluşumuna sebep olan kanser kök hücrelerini de hedef almasıdır. Ayrıca mAb'ın, kanserin gelişiminde büyük önem taşıyan sialik asit ailesine ait olan deaminonöraminik asite özgü olması bu alandaki eksikliklere ışık tuttuğunu düşündürmektedir.

6. Sonuç ve Öneriler

WST1 analizi mAb'ın uygun sitotoksik etkisinin olduğu doz aralığının belirlenmesi için yapılmıştır. Deneyle üçlü tekrarlar yapılmıştır. Ölçüm sonucunda hücrelerin canlılık yüzdeleri ;

1/50 konsantrasyon için canlılık yüzdeleri MCF10A epitelyum hücresinde %82,61, MCF7 kanser hücresinde %78,84, MCF7 KKH'de %83,16'dır. 1/50 konsantrasyonun kanser hücrelerini yok etme etkinliği düşük çıkmıştır.

1/100 konsantrasyon için canlılık yüzdeleri MCF10A epitelyum hücresinde %93,06, MCF7 kanser hücresinde %68,87, MCF7 KKH'de %78,98'dir. Bu konsantrasyonda epitelyum hücrelerinin canlılık yüzdesi yüksek değerde çıkmıştır. Kanser kök hücresinde etkin bir ölüm oranı görülmektedir. Kanser hücresinde de canlılık oranında azalma görülmüştür.

1/250 konsantrasyon için canlılık yüzdeleri MCF10A epitelyum hücresinde %83,59, MCF7 kanser hücresinde %67,89, MCF7 KKH'de %70,86'dır. Bu konsantrasyonda 1/100 konsantrasyona göre tüm hücrelerin canlılık yüzdelerinde azalma görülmüştür.

1/500 konsantrasyon için canlılık yüzdeleri MCF10A epitelyum hücresinde %86,44, MCF7 kanser hücresinde %66,60, MCF7 KKH %75,86'dır. 1/250 konsantrasyon ile kıyaslandığı zaman bu dozda ölüm etkinliği düşük çıkmıştır.

1/1000 konsantrasyon için canlılık yüzdeleri MCF10A epitelyum hücresinde %92,81, MCF7 kanser hücresinde %63,56, MCF7 KKH'de %68,28'dir. Epitelyum hücresinde canlılık oranı yüksek çıkmıştır. Kanser ve kanser kök hücrelerin canlılık yüzdelerinin en düşük görüldüğü konsantrasyon 1/1000'dir.

WST1 deneyinin sonucuna bakıldığında tüm mAb konsantrasyonlarında epitelyum hücrelerinin canlılığı yüksek çıkmıştır. T test ile yapılan analizde kanser hücresi için anlamlı dozlar 1/100, 1/500 ve 1/1000 konsantrasyonda görülmüştür ($p < 0,001$). Kanser kök hücresi için anlamlı dozlar 1/250 ve 1/1000 konsantrasyonunda görülmüştür. WST1 deneyinde hem kanser hem de kanser kök hücreleri için anlamlı konsantrasyon 1/1000 olarak hesaplanmıştır.

Komplemana bağılı sitotoksisite deneyi mAb'ın komplemant sistem ile etkileşimi sayesinde hedef alınan hücre üzerindeki en etkili sitotoksik etkisinin hangi dozda olduğunu belirlemek için yapılmıştır.

1/50 konsantrasyon için hücrelerin canlılık yüzdesi MCF10A'da %99,07, MCF7'de %93,49, MCF7 KKH'de %71,89'dur. WST1 deneyinde olduğu gibi bu deneyde de 1/50 konsantrasyonda etkin ölüm değeri görülmemiştir. Sadece kanser kök hücresinde canlılık düşük çıkmıştır.

1/100 konsantrasyon için hücrelerin canlılık yüzdesi MCF10A'da %99,07, MCF7'de %94,76, MCF7 KKH'de %69,4'tür. 1/50 konsantrasyonda görüldüğü gibi bu konsantrasyonda da sadece kanser kök hücresinin canlılık oranında azalma görülmüştür.

1/250 konsantrasyon için hücrelerin canlılık yüzdesi MCF10A'da %99,49, MCF7'de %83,7, MCF7 KKH'de %64,16'dır. Epitelyum hücresinde canlılık yüzdesi yüksek çıkmıştır. Kanser kök hücresinde ve kanser hücresinde konsantrasyon azaldıkça canlılık da azalmıştır.

1/500 konsantrasyon için hücrelerin canlılık yüzdesi MCF10A'da %99,48, MCF7'de %75,83, MCF7 KKH'de %63,63'tür. Konsantrasyonun azalmasıyla kanser ve kanser kök hücresinde canlılık yüzdesi de azalmıştır. Epitelyum hücresi canlılık yüzdesini korumaktadır.

1/1000 konsantrasyon için hücrelerin canlılık yüzdesi MCF10A'da %99,3, MCF7'de %70,25, MCF7 KKH'de %61,72'dir. WST1 analizinde olduğu gibi bu konsantrasyonda kanser ve kanser kök hücrelerinin canlılık yüzdesinde azalma görülürken epitelyum hücrelerinde canlılık yüzdesi yüksektir. WST1 deneyinde kanser hücrelerinin canlılık yüzdesi kanser kök hücresinden düşük çıkmıştır. Ancak kompleman deneyinde bu sonuç tam tersidir.

Komplemanın etkin çalışıp çalışmadığının anlaşılması için negatif ve pozitif kontrol yapılmıştır. Negatif kontrol için hücrelerin canlılık yüzdesi MCF10A'da %99,45, MCF7'de %79,92, MCF7 KKH'de %72,5'tir. Pozitif kontrol için canlılık yüzdesi; MCF10A'da %99,28, MCF7'de %58,86, MCF7 KKH'de 60,92'dir. Negatif kontrolde yüksek canlılık, pozitif kontrolde yüksek ölüm beklenmiştir. Bu durum komplemanın ve mAb'ın doğru çalıştığını göstermektedir. Kompleman deneyinde

kanser ve kanser kök hücresi için antikorun anlamlı dozları 1/500 ve 1/1000 olarak hesaplanmıştır ($p < 0,001$). Kompleman deneyinde iki doz anlamlı çıkmıştır. Ancak WST1 deneyi ile kıyaslandığında tüm hücre gruplarında ve deneylerde 1/1000 konsantrasyon en anlamlı doz olarak seçilmiştir.

Apoptoz deneyi mAb'ın apoptotik etkisinin bulunup bulunmadığını tespit etmek amacı ile yapılmıştır. WST1 ve kompleman deneyinde 1/1000 konsantrasyonu anlamlı ve etkin doz belirlendiği için apoptoz deneyi tek doz olarak denenmiştir. Kontrol grubu sadece hücrenin bulunduğu gruptur.

MCF10A kontrol grubunda canlı hücre %92, ölü hücre %8, apoptotik hücre %0'dır. MCF10A mAb grubunda canlı hücre %86, ölü hücre %13, apoptotik hücre %1'dir. Epitelyum hücresine mAb'ın herhangi bir apoptotik etkisi görülmemiştir.

MCF7 kontrol grubunda canlı hücre %93, ölü hücre %7, apoptotik hücre %1'dir. MCF7 mAb grubunda canlı hücre %28, ölü hücre %8, apoptotik hücre %64'tür. Kanseri hücresinde apoptotik oran oldukça yüksek çıkmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mAb'ın kanser hücresinde oldukça apoptotik etkisi olduğu görülmüştür.

MCF7 KKH kontrol grubunda canlı hücre %98, ölü hücre %2, apoptotik hücre %0'dır. MCF7 KKH mAb grubunda canlı hücre %49, ölü hücre %4, apoptotik hücre %48'dir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman mAb'ın apoptotik etkisi oldukça yüksek olduğu görülmüştür.

Apoptoz deneyinde de tıpkı WST1 ve kompleman deneylerinde olduğu gibi 1/1000 konsantrasyondaki antikorun yok etme etkinliği anlamlı çıkmıştır ($p < 0,001$).

Tüm sonuçlara bakıldığında mAb'ın en etkin dozunun 1/1000 olduğu, spesifik olarak kanser ve kanser kök hücrelerini hedeflediği açıkça görülmektedir. Epitelyum hücrelerinin minimum zarar görmesi tezin mAb tedavisi ile ilgili en temel amacını karşılamaktadır. Kanseri ve kanser kök hücrelerinin canlılığındaki önemli azalış mAb'ın etkin çalışmasının göstergesidir.

Yapılan bu çalışmada yeni üretilmiş olan mAb'ın sitotoksik etkileri ve başarısı tespit edilmiştir. Bu çalışma ışığında, geliştirilmiş olan mAb'ın tıp alanında etkin kullanılıyor olması için ileri çalışmalarla desteklenmesi önerilmektedir. Bu çalışmalar;

- ✓ İlk olarak *in vitro* deneyi olan antikora bağlı hücresel sitotoksosite (ABHS) ile KBS'nin birlikte karşılaştırılması ile sinerjik veya antagonist etkileri belirlenebilir.
- ✓ Apoptoz etkisi olduğu anlaşılan mAb'ın apoptotik yolağa nasıl etki ettiği ile ilgili çalışmalar yapılarak bu yolaktaki moleküller hedeflenebilir.
- ✓ Farklı hücre hatlarında mAb'ın etkinliği araştırılabilir.
- ✓ *In vitro* deneylerin tamamlanmasından sonra hayvan deneyleri ile doğal immün sistemde bu sonuçlar karşılaştırılabilir.
- ✓ Sonuçlar *in vivo* deneylerle desteklendiğinde klinik tedaviler için faz çalışmaları yapılabilir.
- ✓ Kanseri ve kanser kök hücrelerine spesifik bağlandığı tespit edilen mAb'ın etkinliğini arttırmak için ilaç ile kombine edilerek birlikte etkileri incelenebilir, böylece yeni ve etkin bir mAb piyasaya sürülebilir.

7. Kaynakçalar

- Abdollahpour-Alitappeh, M., Lotfinia, M., Bagheri, N., Sineh Sepehr, K., Habibi-Anbouhi, M., Kobarfard, F., ... Abolhassani, M. (2019). Trastuzumab-monomethyl auristatin E conjugate exhibits potent cytotoxic activity in vitro against HER2-positive human breast cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 234(3), 2693–2704. <https://doi.org/10.1002/jcp.27085>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Alp Can. (2014). Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. In *Akademisyen tıp kitapevi*.
- Article, R. (2013). *Monoclonal Antibodies in Therapeutics*. 1–5.
- Buettner, R., Huang, M., Gritsko, T., Karras, J., Enkemann, S., Mesa, T., ... Jove, R. (2007). Activated Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Signaling Induces CD46 Expression and Protects Human Cancer Cells from Complement-Dependent Cytotoxicity. *Molecular Cancer Research*, 5(8), 823–832. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-06-0352>
- Chen, W., Liu, Y., Li, M., Mao, J., Zhang, L., Huang, R., ... Ye, L. (2015). Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Pharmacological Sciences*, 127(3), 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.01.008>
- Demchenko, A. P. (2013). *Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis*. 157–172. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9481-y>
- dos Santos, M. L., Yeda, F. P., Tsuruta, L. R., Horta, B. B., Pimenta, A. A., Degaki, T. L., ... Moro, A. M. (2013). Rebmab200, a Humanized Monoclonal Antibody Targeting the Sodium Phosphate Transporter NaPi2b Displays Strong Immune Mediated Cytotoxicity against Cancer: A Novel Reagent for Targeted Antibody Therapy of Cancer. *PLoS ONE*, 8(7).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070332>

Düzgün, N. (2014). İmmün Sistemin Tanıtımı. *Ankara Üniversitesi İç Hastalıkları Romatoloji*, 97–122.

Elsevier Research Intelligence. (2016). *Elsevier Cancer Research Report*. 1–32. Retrieved from https://www.elsevier.com/_data/assets/pdf_file/0019/230374/Elsevier-CancerResearchReport.pdf

Engeland, M. Van, Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. M. (1998). *Annexin V-Affinity Assay : A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure*. 9, 1–9.

Fulawka, L., Donizy, P., & Halon, A. (2014). *Cancer stem cells – the current status of an old concept : literature review and clinical approaches*. 1–9.

Gelderman, K. A., Tomlinson, S., Ross, G. D., & Gorter, A. (2004). Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends in Immunology*, 25(3), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.01.008>

Greve, B., Kelsch, R., Spaniol, K., Eich, H. T., & Go, M. (2012). *Flow Cytometry in Cancer Stem Cell Analysis and Separation*. (25). <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22022>

Hassan, M., Watari, H., Abualmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). *Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer*. 2014.

Hu, Y., & Fu, L. (2012). Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *American Journal of Cancer Research*, 2(3), 340–356. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679565><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3365812>

Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., Wang, G., & Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1397–1402. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018898108>

- Inoue, S., Kitajima, K., & Inoue, Y. (2002). Identification of 2-Keto-3-deoxy-D-glycero -D- galacto nononic acid (KDN, Deaminoneuraminic Acid) Residues in Mammalian Tissues and Human Lung Carcinoma Cells . *Journal of Biological Chemistry*, 271(40), 24341–24344. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24341>
- Inoue, S., Kitajima, K., Sato, C., & Go, S. (2011). *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3*. 705, 669–678. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7877-6>
- Inoue, S., Poongodi, G. L., Suresh, N., Chang, T., & Inoue, Y. (2006). Identification and partial characterization of soluble and membrane-bound KDN(deaminoneuraminic acid)-glycoproteins in human ovarian teratocarcinoma PA-1, and enhanced expression of free and bound KDN in cells cultured in mannose-rich media. *Glycoconjugate Journal*, 23(5–6), 401–410. <https://doi.org/10.1007/s10719-006-6125-5>
- Kalra, K., & Tomar, P. C. (n.d.). *Stem Cell : Basics , Classification and Applications*.
- Kanamori, A., Kitajima, K., Inoue, Y., Inoue, S., Xulei, Z., Zuber, C., ... Troy, F. A. (1994). Monoclonal antibody specific for $\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked oligo deaminated neuraminic acid (KDN) sequences in glycoproteins. Preparation and characterization of a monoclonal antibody and its application in immunohistochemistry. *Histochemistry*, 101(5), 333–340. <https://doi.org/10.1007/BF00268994>
- Kaplan, B. W., & Ph, D. (2013). *Priority Medicines for Europe and the World " A Public Health Approach to Innovation " Update on 2004 Background Paper Written by Warren Kaplan Background Paper 6 . 5 Cancer and Cancer Therapeutics*. (April).
- Kumar, S., & Singh, N. P. (2006). *Review Article Stem cells : A new paradigm*. 12(27), 4–10.
- Lan, J. H., & Tinckam, K. (2018). Clinical Utility of Complement Dependent Assays in Kidney Transplantation. *Transplantation*, 102(1S Suppl 1), S14–S22.

<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001819>

- Luo, C., Chen, S., Xu, N., Wang, C., Sai, W. B., Zhao, W., ... Yao, W. B. (2017). Glycoengineering of pertuzumab and its impact on the pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *Scientific Reports*, 7(October 2016), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep46347>
- Mahmuda, A., Bande, F., Al-zihiry, K. J. K., Majid, R. A., Hamat, R. A., & Omar, W. (2017). *Monoclonal antibodies : A review of therapeutic applications and future prospects*. 16(March), 713–722.
- Mattes, M. J., Michel, R. B., Goldenberg, D. M., & Sharkey, R. M. (2009). *Induction of Apoptosis by Cross-Linking Antibodies Bound to Human B-Lymphoma Cells : Expression of Annexin V Binding Sites on the Antibody Cap*. 24(2).
- Meesmann, H. M., Fehr, E., Kierschke, S., Herrmann, M., Bilyy, R., Heyder, P., ... Schiller, M. (2010). *Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes*. 3347–3356. <https://doi.org/10.1242/jcs.066696>
- Mr, A., Sharifi J, Mr, P., & Paknahad A. (2015). Breast cancer and associated factors: a review. *Journal of Medicine and Life*, 8(4), 6–11. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5319297/pdf/SIJMedLife-08-04-06.pdf>
- Nakata, D., Close, B. E., Colley, K. J., Matsuda, T., & Kitajima, K. (2000). Molecular cloning and expression of the mouse N-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase which does not have deaminoneuraminic acid (KDN) 9-phosphate synthase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(2), 642–648. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2983>
- Nechansky, A., Szolar, O. H. J., Siegl, P., Zinoecker, I., Halanek, N., Wiederkum, S., & Kircheis, R. (2009). Complement dependent cytotoxicity (CDC) activity of a humanized anti Lewis-Y antibody: FACS-based assay versus the “classical” radioactive method-Qualification, comparison and application of the FACS-based approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(4), 1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.01.029>

- Nilendu, P., Kumar, A., Kumar, A., Pal, J. K., & Sharma, N. K. (2018). Breast cancer stem cells as last soldiers eluding therapeutic burn: A hard nut to crack. *International Journal of Cancer*, *142*(1), 7–17. <https://doi.org/10.1002/ijc.30898>
- Niles, A. L., Moravec, R. A., & Riss, T. L. (2009). *In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening*. 33–41.
- Prang, N., Preithner, S., Brischwein, K., Göster, P., Wöppel, A., Müller, J., ... Da Silva, A. J. (2005). Cellular and complement-dependent cytotoxicity of Ep-CAM-specific monoclonal antibody MT201 against breast cancer cell lines. *British Journal of Cancer*, *92*(2), 342–349. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602310>
- Pratama, N. P., Wulandari, S., Nugroho, A. E., Fakhrudin, N., Astuti, P., & Sudarsono. (2018). Tylophorine Abrogates G2/M Arrest induced by doxorubicine and promotes increased apoptosis in T47D breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *19*(11), 3065–3069. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3065>
- Razmkhah, M., & Ghaderi, A. (2013). HLA class I allele frequencies in Southern Iranian women with breast cancer. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *16*(2), 140–143.
- Shuptrine, C. W., Surana, R., & Weiner, L. M. (2012). Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *22*(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.009>
- Singh, N. (2007). *APOPTOSIS IN HEALTH AND DISEASE AND MODULATION OF APOPTOSIS FOR THERAPY : AN OVERVIEW*. *22*(2), 6–16.
- Stasiłojć, G., Österborg, A., Blom, A. M., & Okrój, M. (2016). New perspectives on complement mediated immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, *45*, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.02.009>
- Sterner, E., Flanagan, N., & Gildersleeve, J. C. (2016). Perspectives on Anti-Glycan Antibodies Gleaned from Development of a Community Resource Database.

ACS Chemical Biology, 11(7), 1773–1783.
<https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00244>

Strome, S. E., Sausville, E. A., & Mann, D. (2007). A Mechanistic Perspective of Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy Beyond Target-Related Effects. *The Oncologist*, 12(9), 1084–1095. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-9-1084>

Tabarestani, S., & Ghafouri-fard, S. (2012). *MINI-REVIEW Cancer Stem Cells and Response to Therapy*. 13, 5947–5954.

Tackenberg, B., Maurer, M. A., Giddens, J. P., Wang, L.-X., Nimmerjahn, F., Quast, I., ... Lünemann, J. D. (2015). Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 125(11), 4160–4170. <https://doi.org/10.1172/jci82695>

Terzioğlu, G. (2014). Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits. *Turkish Journal of Immunology*, 1(3), 74–89. <https://doi.org/10.5606/tji.2013.267>

Testis, T., Angata, T., Nakata, D., Matsuda, T., Kitajima, K., & Ii, F. A. T. (1999). *Biosynthesis of KDN (2-Keto-3-deoxy- D - glycerol - D - galactononic acid)*. 274(33), 22949–22956.

TOKUR, O., & AKSOY, A. (2019). In Vitro Sitotoksikite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112–118. <https://doi.org/10.31196/huvfd.325794>

Trounson, A. (2006). The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocrine Reviews*, 27(2), 208–219. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0016>

Vajaria, B. N., Patel, K. R., Begum, R., & Patel, P. S. (2016). Sialylation: an Avenue to Target Cancer Cells. *Pathology and Oncology Research*, 22(3), 443–447. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-0033-6>

Valent, P., Bonnet, D., Maria, R. De, Lapidot, T., Schuringa, J. J., Stassi, G., ... Johnsen, H. E. (2012). *terminology: the devil is in the details*. (October).

<https://doi.org/10.1038/nrc3368>

- Varki, N. M., & Varki, A. (2007). *PATHOBIOLOGY IN FOCUS Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease*. 87(April), 851–857. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700656>
- Verma, B., Jain, R., Caseltine, S., Bhattacharya, R., Markiewski, M. M., Rawat, A., ... Jon, A. (2019). *TCR Mimic Monoclonal Antibodies Induce Apoptosis of Tumor Cells via Immune Effector-Independent Mechanisms*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002376>
- Wang, B., Xi, C., Liu, M., Sun, H., Liu, S., Song, L., & Kang, H. (2018). Breast fibroblasts in both cancer and normal tissues induce phenotypic transformation of breast cancer stem cells: a preliminary study. *PeerJ*, 6, e4805. <https://doi.org/10.7717/peerj.4805>
- Wang, G., Li, X., Huang, F., Zhao, J., Ding, H., Cunningham, C., ... Li, Q. Q. (2005). Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(7–8), 881–893. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5017-3>
- Wang, S.-Y., & Weiner, G. (2008). Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(6), 759–768. <https://doi.org/10.1517/14712598.8.6.759>
- Wei, A., Fan, B., Zhao, Y., Zhang, H., Wang, L., Yu, X., ... Wang, S. (2016). ST6Gal-I overexpression facilitates prostate cancer progression via the PI3K/Akt/GSK-3 β /catenin signaling pathway. *Oncotarget*, 7(40). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11699>
- Weiner, G. J. (2007). Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunologic Research*, 39(1–3), 271–278. <https://doi.org/10.1007/s12026-007-0073-4>
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). STEM AND PROGENITOR CELLS: Origins, and Transdifferentiations. *Cell and Developmental Biology*,

387–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152334>

Wirt, T., Roskopf, S., Rösner, T., Eichholz, K. M., Kahrs, A., Lutz, S., ... Kellner, C. (2017). An Fc Double-Engineered CD20 Antibody with Enhanced Ability to Trigger Complement-Dependent Cytotoxicity and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 44(5), 292–300. <https://doi.org/10.1159/000479978>

Yabu, M., Korekane, H., Hatano, K., Kaneda, Y., Nonomura, N., Sato, C., ... Miyamoto, Y. (2013). Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type N-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology*, 23(6), 634–642. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws132>

Yang, Y. M., & Chang, J. W. (2008). Current status and issues in cancer stem cell study. *Cancer Investigation*, 26(7), 741–755. <https://doi.org/10.1080/07357900801901856>

Teşekkürler

Yüksek lisansım süresince yardımını esirgemeyen, bilgi birikimi ile yol gösteren değerli danışman hocam Prof.Dr. Gülperi ÖKTEM'e, tezimde kullanacağım tekniği sabırla öğreten, laboratuvarlarının kapısını açan, bilgi ve donanımı ile bana destek olan Prof. Dr. Mehmet Ali ÖKTEM'e, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Ayşegül UYSAL'a, yardıma ihtiyaç duyduğumda her an kapısını açan Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e, bu süreç boyunca desteklerini ve deneyimlerini esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım Ar. Gör. Eda AÇIKGÖZ'e, Ümmü GÜVEN'e, Fahriye DÜZAĞAÇ'a, Cansu TATAR'a, her zaman yanımda olan, bana evinin kapılarını açan, stresli anların kurtarıcısı, neşesi ile neşe katan kıymetli ekip arkadaşım Gizem İNETAŞ'a, ne zaman yardıma ihtiyaç duysam destek olan sevgili ev arkadaşım Yonca ERDAL'a, İzmir'de ailemden uzakta olmama rağmen yalnız hissettirmeyen, hayatıma renk katan çok değerli dostlarım Petek BİLİM'e, Aylin BUHUR'a, Gözde FAKIOĞLU'na, Özgün GERMİYAN'a, Çevik GÜREL'e, CEREN KUŞ'a, Kubilay Doğan KILIÇ'a, Elif ÖZTÜRK'e, Umut Doğu SEÇKİN'e, Cansın ŞİRİN'e ve Caner ÜNLÜER'e, Gürkan YİĞİTTÜRK'e

Lise, lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca her daim bana güvenen, yanımda olan, destekleyen değerli Talat Mert ŞATIROĞLU'na, stresli sürecimde varlığını hep hissettiren lisans hayatımın bana kattığı kıymetli dostum Elif DEMİRCİ'ye, lisede ve lisansta sınıf arkadaşım olan, her zaman destek alabildiğim değerli meslektaşım, dostum Zeynep Begüm DURDU'ya

En önemlisi hayatımın her döneminde benimle birlikte olan ve yardımlarını esirgemeyip her kararımdaya bana güvenen, güç veren, beni destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Selen Gençsoy

Tel: +90 555 360 58 08

E-posta: selengencsoy94@gmail.com

Adres: Büyükşehir Mahallesi Derya Sokak B.38 blok Daire: 27 Beylikdüzü / İSTANBUL

Doğum Tarihi : 02.09.1994

Doğum Yeri : İstanbul

Uyruğu : T.C



Eğitim Bilgileri

- 2016 – Halen **Ege Üniversitesi**
Kök Hücre Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)
- 2012- 2016 **İstanbul Kültür Üniversitesi**
Moleküler Biyoloji ve Genetik
- 2008 – 2012 **Beylikdüzü Cahit Zarifoğlu Lisesi**
Ortaöğrenim
- 2000-2008 **Bizimkent İlköğretim Okulu**
İlköğrenim

Sertifikalar

- Kasım 2013 – Ağustos 2014 **British Time İngilizce Eğitimi – Intermediate**
- 23-27 Kasım 2015 **Üniversiteler Etik Haftası Katılım Belgesi**, T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi EDMER
- 12 Mayıs 2018 **GMP – İyi Üretim Uygulamaları**, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
- 13 Mayıs 2018 **GLP – İyi Laboratuvar Uygulamaları**, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
- 14 Mayıs 2018 **GHP – İyi Hijyen Uygulamaları**, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
- 15 Mayıs 2018 **ISO 22716: 2007 – Kozmetik İyi Üretim Uygulamaları – GMP**, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi

Kongre Ve Seminerler

- 25 Şubat 2013 **Etkili Özgeçmiş Hazırlama ve Mülakat Teknikleri** , Mystaff, T.C Kültür Üniversitesi Kariyer Kulübü
- 16 - 18 Nisan 2013 **Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkileri**, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- 10 -12 Mayıs 2013 **I. Uluslararası GEN-AREL Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi**, T.C. İstanbul Arel Üniversitesi
- 14 Aralık 2013 **I.Tüp Bebek Paneli**, T.C. Haliç Üniversitesi Genetik Kulübü (HÜGEN)
- 20 - 21 Aralık 2013 **Nanoteknoloji ve Doku Mühendisliği: Güncel Sorunlar ve Gelecek Öngörüler**, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi

- 11 Nisan 2014 **Adler Psikolojisi Çerçevesinde 21. Yüzyılda Öğrencilerle Pozitif İlişkilerin Yeniden Yapılandırılması: Değişen Zaman, Zor Öğrenciler ve Kurulan Pozitif İlişkiler**, T.C İstanbul Kültür Üniversitesi Psikoloji Bölümü
- 14 Nisan 2014 **“Ben Seni Anlıyorum”** isimli Kişisel Gelişim Semineri , T.C. Kültür Üniversitesi IEEE Öğrenci Kulübü
- 19 – 20 Aralık 2014 **Nanoteknoloji ve Doku Mühendisliği: Güncel Sorunlar ve Gelecek Öngörüler**, T. C. İstanbul Kültür Üniversitesi
- 8 Nisan 2015 **Teknolojinin Yaşamımızdaki Yeri: Çocuklar ve Gençler Üzerindeki Yansımaları** , T.C İstanbul Kültür Üniversitesi Psikoloji Bölümü
- 18 Nisan 2015 **I. Kök Hücre Sempozyumu**, T.C. Haliç Üniversitesi Genetik Kulübü
- 4 Kasım 2015 **NeuroFormat**, T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Kariyer Kulübü
- 18 Aralık 2015 **Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar**, T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- 22 Kasım 2016 **Stem Cell Day**, Hacettepe Üniversitesi (PEDI-STEM)
- 10 Kasım 2017 **New Frontiers in Life Sciences Symposium**, İzmir Biomedicine & Genome Center (IBG DAYS 2017)
- 10 Şubat 2018 **ACUGEN 1.Yaşam Bilimleri Kongresi**, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi
- 5 Nisan 2018 **4. Onkoloji Araştırma Uygulamaları Kursu – Onkolojide Deneysel Hayvan Çalışmaları**, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü
- 31 Ekim 2018 **3. Kök Hücre Bölge Toplantıları**, Kök Hücre ve Hücresel Tedavi Derneği, Ege Üniversitesi ve Celal Bayar Üniversitesi
- 9 Şubat 2019 **ACUGEN 2. Yaşam Bilimleri Kongresi**, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi

Laboratuvar Teknikleri Deneyimi

- Laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu :
 - Otoklav
 - Kuru sterilizasyon
- Protein Tayini Yöntemleri :
 - SDS- Page
 - Western Blotlama
- Mikroskop kullanımı :
 - Işık mikroskobu
 - Diseksiyon mikroskobu
 - Floresan mikroskobu
- Mikrobiyoloji :
 - Bakterilerde boyama teknikleri
 - Bakterilerin fizyolojik karakter özelliklerinin belirlenmesi
 - Mikroorganizmaların sayım teknikleri
- Kantitatif ölçüm teknikleri :
 - ELİSA
 - Bradford
 - qRT PCR
- DNA izolasyonu :
 - Bitkiden genomik DNA izolasyonu
 - Memeli hücresinden genomik DNA izolasyonu
 - İnsan kanından genomik DNA izolasyonu
- Plazmid izolasyonu
- RNA İzolasyonu :
 - Bitkiden RNA izolasyonu
 - Memeli hücresinden RNA izolasyonu
- RT PCR
- Long PCR
- Nested PCR
- Protein İzolasyonları :
 - Bitkiden Toplam Protein İzolasyonu
 - Memeli Hücresinde Protein İzolasyonu
- Nükleer – Sitoplazmik İzolasyon
- Agaroz Jel Elektroforezi
- DNA/RNA Microarray Teknolojisi
- RFLP
- Hayvan Doku Kültürü Laboratuvarı :
 - Sıvı azottan hücre açma
 - Hücre pasajlanması
 - MTT Testi
 - Facs Flow ve Koloni Formasyon Assay
 - Floresan Boyama

- İmmünohistokimyasal boyama (Doku)
- İmmünofloresan boyama (Hücre)
- Komplemana Bağlı Sitotoksiste analizi
- Karyotip Analizi

Proje

- Proje Araştırmacısı ‘ Embriyonik Dönemde Yeniden Programlama Sürecinde miRNA Etkisi ile Kanser Kök Hücreleri Farklılaşmasının İncelenmesi’ TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Ege Üniversitesi
- Proje Araştırmacısı ‘ Meme kanseri hücrelerinde Deaminonöraminik asit antikorunun sitotoksik etkisinin belirlenmesi’ Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü, Genel Araştırma Projesi

Yabancı Dil

İngilizce

Seviye: Intermediate

Bulgarca

Seviye : Beginner

Kullanılan Bilgisayar Programı

Microsoft Office

Mesleki İlgi Alanları

Kök Hücre, Moleküler Kanser Biyolojisi, Preimplantasyon Genetik Tanı, Monoklonal Antikor Tedavisi, Sinir Bilim

Staj

- Özel Avcılar Hospital – Biyokimya Laboratuvarı / 12.07.2013-18.07.2013

Edinilen Bilgiler ; VDRL Testi, CRP Testi, Manuel ve kan grubu kartları ile kan grubu tayini, Kültüre göre agar seçimi, Agar çizim teknikleri, Antibiyogram

- Özel Reyap Hastanesi – Tüp Bebek Laboratuvarı / 04.08.2014-15.08.2014

Edinilen Bilgiler : Sperm hücre kalitesi ve sayımı, yumurta hücresi toplama, intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), embriyo gelişimi takibi, embriyo transferi, hücre dondurma işlemi

- Onkim Kök Hücre Teknolojileri / 27.07.2015 – 07.08.2015

Edinilen Bilgiler : Kordon Kanı Çalışma Protokolü, Flow Sitometri Protokolü

Bitirme Tezi

- Kök Hücre Bazlı Azospermi Tedavi Stratejileri – İstanbul Kültür Üniversitesi, Lisans, 2016
- Kanser Kök Hücrelerinde Deaminonöraminik Asit Monoklonal Antikörünün Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi – Ege Üniversitesi, Yüksek Lisans, 2018 - Halen