

2022

DOKTORA TEZİ

Büşranur ÖZALPER



T.C.  
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELERİNİN VE K2 VİTAMİNİNİN OSTEOSARKOM  
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN WNT /  $\beta$ -KATENİN  
YOLAĞI HEDEFLENEREK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Büşranur ÖZALPER**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2022



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELERİNİN VE K2 VİTAMİNİNİN OSTEOSARKOM  
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN WNT /  $\beta$ -KATENİN  
YOLAĞI HEDEFLENEREK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Büşranur ÖZALPER**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2022

T.C.  
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN KEMİK İLİĞİ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELERİNİN VE K2 VİTAMİNİNİN OSTEOSARKOM  
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN WNT /  $\beta$ -KATENİN  
YOLAĞI HEDEFLENEREK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Büşranur ÖZALPER**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

**Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel  
Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2281 nolu  
proje ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2022

**T.C.**  
**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

İnsan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerinin ve K2 Vitamininin  
Osteosarkom Hücreleri Üzerine Etkilerinin Wnt /  $\beta$ -Katenin Yolağı Hedeflenerek  
Araştırılması

Büşranur ÖZALPER

Doktora Tezi

07/06/2022

Tez Danışmanı

Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Prof. Dr. İnci ERGÜRHAN İLHAN

Doç. Dr. Neşe ÇÖLÇİMEN

Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için  
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Fatma Elif KILINÇ

Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

07/06/2022

Büşranur ÖZALPER

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi süreci boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü imkânı sağlayan, desteğini ve sevgisini her daim hissettiğim kıymetli hocam Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimleriyle desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan anabilim dalımızın değerli hocaları, Prof. Dr. Sevil ÇAYLI, Prof. Dr. A. Çevik TUFAN, Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Bahar KARTAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin laboratuvar çalışmalarında emeği ve desteği olan yol arkadaşım Dr. Tuba ÖZDEMİR SANCI'ya, sevgisi ve bilgisi ile yanımda olan Uzm. Bio. Gizem İLTER AKTAŞ'a, bana cesaret veren her zaman destekleyen Uzm. Bio. Gülben AKCAN'a ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın çok değerli asistanlarına sevgileri ve katkıları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın planlanmasına katkı sağlayan Ankara Şehir Hastanesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bölümü'nün kıymetli hocalarından Prof. Dr. İnci ERGÜRHAN İLHAN'a ve Ankara Şehir Hastanesi Çocuk Hastanesi Kök Hücre Laboratuvarı'nda bana yardımcı olan ve çalışmamın yürütülmesine katkı sağlayan Biyolog Yasin KÖKSAL'a çok teşekkür ederim.

Çalışmada kullandığım hücre hattının temininde bana yardımcı olan Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÜNGÖRMÜŐ'e sonsuz teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tez çalışmamın yürütülmesinde bana her türlü fırsatı sağlayarak çalışmama katkı sağlayan Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI'ya ve kıymetli asistanlarına da çok teşekkür ederim.

Tezimde yaptığım deneysel alışmalar, Ankara Şehir Hastanesi ocuk Hastanesi Kök Hücre Laboratuvarı ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Hayatımın her anında yanımda olan, beni bu günlere ulaştıran, bana en büyük desteği ve sevgiyi veren beni büyüten pek kıymetli babam Ali Osman BAŐKURT ve annem Pervin BAŐKURT'a, her koşulda beni sonsuz destekleyen ve yanımda olan kardeşlerime çok teşekkür ederim. Bu süreçte yanımda olan ve beni destekleyen kayınvalidem ve kayınpederime de çok teşekkür ederim.

Sevgisinden g aldığım, desteğini, güvenini her daim hissettiğim Sevgili eşim Doç. Dr. Mehmet ÖZALPER'e ve hayatımı anlamlandıran yaşam sevincim canım oğlum Muhammed Salih ÖZALPER'e

Sonsuz teőekkürlerimle...

**Büşranur ÖZALPER**

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Osteosarkom.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji.....	3
2.1.2. Lokalizasyon ve Yayılım.....	4
2.1.3. Osteosarkom Tümör Tipleri.....	4
2.1.4. Osteosarkom Belirtileri.....	5
2.1.5. Osteosarkom Tedavisi.....	5
2.1.6. Osteosarkom Histolojisi.....	6
2.1.7. Tümör Mikroçevresi.....	7
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler.....	8
2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tümör Mikroçevresindeki Rolü.....	9
2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerden Salınan Sitokinler.....	10
2.3. K Vitamini, Çeşitleri ve Osteosarkom Tedavisinde Yeri.....	13
2.4. Hücre Ölüm Yolakları.....	15
2.4.1. Apoptoz.....	16
2.4.2. Otofaji.....	20
2.4.3. Nekroz.....	20
2.5. Wnt/ $\beta$ -Katenin Sinyal Yolağı.....	21
2.5.1. Osteosarkomda Wnt/ $\beta$ -Katenin Sinyal Yolağı.....	23
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>24</b>
3.1. Sağlıklı Verici Kemik İliği Örneklerinin Toplanması ve Mononükleer Hücre İzolasyonu.....	24

3.2. Mononükleer Hücrelerden Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi ve Kültürü.....	25
3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	27
3.3.1. Morfolojik Analiz .....	27
3.3.2. Farklılaşma Testleri.....	27
3.3.3. Akım (Flow) Sitometri ile İmmünofenotip Analizi .....	28
3.4. İnsan Osteosarkom Hücre Hattı (Saos-2) Kültürü .....	29
3.5. K2 Vitamini Dozlarının Belirlenmesi .....	30
3.5.1. K2 Vitamininin Hazırlanması .....	30
3.5.2. İn Vitro Sitotoksitenin XTT Testi ile Belirlenmesi.....	30
3.5.3. IC <sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması.....	31
3.6. Ko-Kültür Deney Sistemlerinin Oluşturulması.....	31
3.7. Ko-Kültür Deneyleri Sonrası Yapılan Analizler.....	33
3.7.1. Akım (Flow) Sitometri ile Annexin-V/PI Yöntemi .....	33
3.7.2. Spektrofotometri ile Enzim (ALP) Aktivitesi Tayini .....	35
3.7.3. ELİSA Yöntemi ile Sitokin (IL-6 ve TGF-β1) Analizi.....	36
3.7.4. İmmünohistokimya Analizleri .....	37
3.8. İstatistiksel Analiz.....	38
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
4.1. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve Karakterizasyonu .....	39
4.1.1. Morfolojik Özellikleri .....	39
4.1.2. Farklılaşma Testleri.....	39
4.1.3. Akım (Flow) Sitometri ile İmmünofenotip Analizi .....	42
4.2. İnsan Osteosarkom Hücre Hattı (Saos-2) Kültürü ve K2 Vitamini Dozunun Belirlenmesi.....	43
4.2.1. K2 Vitamini Saos-2 Hücreleri Üzerine Etkisinin XTT Yöntemi ile Belirlenmesi .....	43
4.3. Ko-Kültür Deneyleri Sonrası Yapılan Analizlerin Bulguları.....	45
4.3.1. Akım (Flow) Sitometri ile Annexin-V/PI Yöntemi Bulguları .....	45
4.3.2. Spektrofotometri ile Enzim (ALP) Aktivitesi Sonuçları.....	48

4.3.3. ELİSA Yöntemi ile Sitokin (IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) Tayini Bulguları.....	51
4.3.4. İmmünohistokimya Yöntemi Bulguları .....	54
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>61</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>68</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>70</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>89</b>
EK-1. Etik Kurul İzni .....	89
EK-2. Özgeçmiş .....	90



## ÖZET

### **İnsan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerinin ve K2 Vitamininin Osteosarkom Hücreleri Üzerine Etkilerinin Wnt/ $\beta$ -Katenin Yolağı Hedeflenerek Araştırılması**

Histolojik olarak malign osteoid varlığı ile karakterize olan osteosarkom (OS), çocuklarda ve gençlerde en sık görülen primer kemik tümörüdür. Agresif ve metastatik yapıya sahip olan OS, genelde akciğere metastaz yaparak hastalığın ölümcül seyrine neden olur. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH), mikroçevrede önemli rol oynadığı bilinmesine karşın osteosarkom hücreleri sağkalımına etkisi tartışmalıdır. Tümör mikroçevresindeki iletişim salgılanan sitokinler, kemokinler ve ekstraselüler veziküller aracılığıyla farklı yolların aktivasyonu/inhibisyonu ile sağlanmaktadır. Ayrıca mikroçevrede var olan K2 vitamini ile kemik metabolizması arasındaki ilişkinin araştırılması, K2 vitamininin osteogenez modülasyonundaki olası rollerinin aydınlatılmasında önemlidir.

Çalışmamızda, sağlıklı kemik iliği MKH'lerinin ve K2 vitamininin Saos-2 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri in vitro ortamda hücre-hücre teması olmadan (membranlı/insert) yapılan ko-kültür deneyleriyle incelendi. Saos-2 hücrelerinin apoptotik özellikleri akım sitometri yöntemiyle analiz edildi. Saos-2 hücrelerinin osteoblastik olgunlaşmayı indükleme yeteneğini değerlendirmek için Alkalen fosfataz (ALP) enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kültür sonrası süpernatanta salınan sitokinlerin (IL-6 ve TGF- $\beta$ 1) tayini ELİSA yöntemi ile belirlendi. Saos-2 hücrelerinde  $\beta$ -katenin proteinin ekspresyon çalışmaları ise immünohistokimyasal olarak belirlendi.

Ko-kültür sonuçlarımıza göre Saos-2 hücrelerinin MKH'ler ile etkileşiminde apoptotik hücre sayısının arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Kültür süpernatantlarından elde edilen ALP enzim aktivitesi ölçümlerinde azalma tespit edilmesine rağmen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kültür

süpernatantlarından elde edilen ELİSA sonuçlarına göre salgılanan IL-6 ve TGF- $\beta$ 1 sitokin miktarlarında azalma tespit edildi ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Saos-2 hücrelerinde immünohistokimyasal yöntemlerle boyanan  $\beta$ -katenin ekspresyonunun ko-kültür gruplarında hücre çekirdeklerinde anlamlı olarak azaldığı saptandı.

Bu bulgular ışığında MKH'lerin ve K2 vitamininin osteosarkom mikroçevresine Wnt sinyal yolağı aracılığıyla etkili olduğu saptandı. K2 vitamininin tümorojeniteyi azaltabileceğı ancak terapötik amaçlı kullanım için farklı doz ve süreleri içeren in vivo ve in vitro pre-klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiğı sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, K vitamini, mezenkimal kök hücre, osteosarkom,  $\beta$ -katenin.

## ABSTRACT

### **Investigation of the Effects of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Vitamin K2 on Osteosarcoma Cells by Targeting Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway**

Osteosarcoma (OS), which is histologically characterized by the presence of malignant osteoid, is the most common primary bone tumor in children and adolescents. OS, which has an aggressive and metastatic structure, usually metastasizes to the lung and causes the fatal course of the disease. Although bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) are known to play an important role in the microenvironment, their effect on osteosarcoma cell survival is controversial. Communication in the tumor microenvironment is provided by the activation/inhibition of different pathways via secreted cytokines, chemokines and extracellular vesicles. In addition, investigating the relationship between vitamin K2 in the microenvironment and bone metabolism is important in elucidating the possible roles of vitamin K2 in the modulation of osteogenesis.

In our study, the apoptotic effects of healthy bone marrow MSCs and vitamin K2 on Saos-2 cells were investigated in co-culture experiments in vitro without cell-cell contact (membrane/insert). Apoptotic properties of Saos-2 cells were analyzed by flow cytometry. Alkaline phosphatase (ALP) enzyme activity was measured spectrophotometrically to evaluate the ability of Saos-2 cells to induce osteoblastic maturation. The cytokines (IL-6 and TGF- $\beta$ 1) released into the supernatant after culture were determined by the Elisa method. Expression studies of  $\beta$ -catenin protein in Saos-2 cells were determined immunocytochemically.

According to our co-culture results, it was determined that the number of apoptotic cells increased in the interaction of Saos-2 cells with MSCs, but there was no statistically significant difference. Although a decrease was detected in ALP enzyme activity measurements obtained from culture supernatants, the results were not statistically significant. According to Elisa results obtained from culture supernatants, a decrease in

the amount of secreted IL-6 and TGF- $\beta$ 1 cytokines was detected, but no statistically significant difference was found. It was determined that the expression of  $\beta$ -catenin, stained by immunohistochemically, in Saos-2 cells was significantly decreased in the cell nuclei of the co-culture groups.

In the light of these findings, it was determined that MSCs and vitamin K2 were effective in the osteosarcoma microenvironment via the Wnt signaling pathway. It was concluded that vitamin K2 can reduce tumorigenicity, but it should be supported by in vivo and in vitro pre-clinical studies with different doses and durations for therapeutic use.

**Keywords:** Apoptosis, mesenchymal stem cell, osteosarcoma, vitamin K,  $\beta$ -catenin.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ALP	: Alkalen fosfataz
Apaf	: Apoptoz proteaz aktive edici faktör
Bcl-2	: B-hücreli lenfoma 2 geni
BSA	: Sığır serum albümin
CD	: Faklılaşma faktörü
CK1	: Casein kinase 1
CM	: Şartlandırılmış (Koşullu) ortam
DAB	: 3,3'-diaminobenzidine
DMEM-LG	: Dulbecco's modified eagle medium-low glukoz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
Dvl	: Dishevelled
ELİSA	: Enzim bağılı immün ölçüm yöntemi
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
FBS	: Fetal bovine serum
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
Fz	: Frizzled
GSK3β	: Glikojen sentez kinaz 3β
IC <sub>50</sub>	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
IL	: İnterlökin
ISCT	: Uluslararası Hücre & Gen Terapi Derneği (The International Society for Cell & Gene Therapy)
kDa	: Kilodalton
Kİ	: Kemik iliği
M	: Molar
MHC	: Major Histocompatibility Complex

MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
mL	: Mililitre
MNH	: Mononükleer Hücre
OS	: Osteosarkom
PBS	: Phosphate-buffered saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PDGF	: Platelet (trombosit) kaynaklı büyüme faktörü
PI	: Propidyum iyodür
PTHrP	: Paratiroid hormon ilişkili protein
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
Saos-2	: İnsan osteosarkom hücre hattı
TCF/LEF	: T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TGF- $\beta$	: Transforme edici büyüme faktörü beta
TME	: Tümör mikro çevresi
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XTT	: 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> En yaygın görülen tip olan Konvansiyonel OS'nin histopatolojik ışık mikroskopik görüntüsü, Hematoksilen-Eozin boyama .....	6
<b>Şekil 2.2.</b> Kemik tümörü mikroçevresi .....	7
<b>Şekil 2.3.</b> Erişkin mezenkimal kök hücre kaynakları ve farklılaşabilecekleri hücre tipleri.....	8
<b>Şekil 2.4.</b> Mezenkimal stroma ve tümör etkileşimi.....	11
<b>Şekil 2.5.</b> TGF- $\beta$ 'nin osteosarkom tümörü ve metastaz gelişimindeki merkezi rolü .....	13
<b>Şekil 2.6.</b> K vitaminlerinin kimyasal yapıları (K1: 2-metil-3 fitil-1,4-naftokinon; K2: 2-metil-3-difarnesil-1,4-naftokinon; K3: 2-metil-1,4-naftokinon).....	14
<b>Şekil 2.7.</b> Wnt/ $\beta$ -Katenin sinyal yolağının apoptozdaki rolü .....	21
<b>Şekil 2.8.</b> Wnt/ $\beta$ -Katenin sinyal yolağı.....	23
<b>Şekil 3.1.</b> Mononükleer hücre izolasyonu için örneğin fikol üzerine alınması (sol), Fikol ile dansite gradient yönteminin uygulanması sonrası hücre tabakalarının oluşumu (sağ). .....	25
<b>Şekil 3.2.</b> Saos-2 hücreleri ile Mezenkimal Kök Hücrelerinin ThinCert™ hücre kültür membranları kullanılarak oluşturulan ko-kültürü .....	33
<b>Şekil 3.3.</b> Akım sitometri cihazının şematik gösterimi .....	34
<b>Şekil 3.4.</b> Akım sitometri cihazında apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi. ....	35
<b>Şekil 4.1.</b> Sağlıklı vericilere ait MKH'lerin invert mikroskop görüntüleri x40 (sol) ve x100 (sağ) büyütme.....	39
<b>Şekil 4.2.</b> Sağlıklı vericilere ait MKH'lerin Oil Red O boyası ile boyanan yağ damlacıkları görüntüleri, x100 büyütme. ....	40

<b>Şekil 4.3.</b> Sağlıklı vericilerin kemik hücrelerine farklılaşmış MKH'leri, x40 (üst), sağlıklı vericilerin kemik hücrelerine farklılaşmış MKH'lerinin Alizarin red ile boyanan kalsiyum birikintileri (alt) x100 büyütme.....	41
<b>Şekil 4.4.</b> İnsan kemik iliğinden izole edilmiş MKH'lerin immünofenotipik özelliklerinin akım sitometrik analizi.....	42
<b>Şekil 4.5.</b> Saos-2 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri, x100 (sol) ve x200 (sağ) büyütme.....	43
<b>Şekil 4.6.</b> K2 vitamininin Saos-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin XTT testi ile değerlendirme sonuçları (48. saat).....	44
<b>Şekil 4.7.</b> K2 vitamininin Saos-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin XTT testi ile değerlendirme sonuçları (72. saat).....	44
<b>Şekil 4.8.</b> Çalışma gruplarına ait 48. saatteki canlı hücre oranları.....	47
<b>Şekil 4.9.</b> Çalışma gruplarına ait 48. saatteki apoptotik hücre oranları.....	47
<b>Şekil 4.10.</b> Anneksin V/PI yöntemi ile apoptoz tayini sonuçları.....	48
<b>Şekil 4.11.</b> pNP (p-Nitrofenol) standart kalibrasyon grafiği.....	49
<b>Şekil 4.12.</b> Çalışma gruplarına ait 48. saatteki ALP konsantrasyonları.....	50
<b>Şekil 4.13.</b> IL-6 standart grafiği.....	51
<b>Şekil 4.14.</b> Çalışma gruplarına ait 48. saatteki IL-6 konsantrasyonları.....	52
<b>Şekil 4.15.</b> TGF- $\beta$ 1 standart grafiği.....	53
<b>Şekil 4.16.</b> Çalışma gruplarına ait 48. saatteki TGF- $\beta$ 1 konsantrasyonları.....	54
<b>Şekil 4.17.</b> K2 vitamini uygulanan ve uygulanmayan (Kontrol 1) Saos-2 hücrelerinde $\beta$ -katenin'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı invert mikroskop görüntüleri, x100 ve x200. <b>Ok:</b> İmmün-pozitif alanlar. <b>Boya:</b> DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojeni.....	55

- Şekil 4.18.** K2 vitamini uygulanan ve uygulanmayan (Kontrol 2) MKH'lerde  $\beta$ -katenin'in immünohistokimyasal yöntemle boyandığı invert mikroskop görüntüleri, x100 ve x200. **Boya:** DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojeni. .... 56
- Şekil 4.19.** K2 vitamini uygulanan ve uygulanmayan (Kontrol 3) Saos-2 hücrelerinde  $\beta$ -katenin'in immünohistokimyasal yöntemle boyandığı invert mikroskop görüntüleri, x100 ve x200. **Boya:** DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojeni..... 57
- Şekil 4.20.** Çalışma gruplarına ait sitoplazmik  $\beta$ -katenin ekspresyonlarının immünohistokimya sonrası istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 59
- Şekil 4.21.** Çalışma gruplarına ait nükleer  $\beta$ -katenin ekspresyonlarının immünohistokimya sonrası istatistiksel olarak karşılaştırılması..... 60

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Osteosarkom sınıflaması.....	4
<b>Tablo 2.1.</b> Apoptozis ve genler.....	17
<b>Tablo 3.1.</b> MKH'lerin karakterizasyon analizinde kullanılan belirteçler.....	29
<b>Tablo 3.2.</b> Oluşturulan deney grupları.....	32
<b>Tablo 4.1.</b> K2 vitamininin Saos-2 hücreleri için hesaplanan IC <sub>50</sub> değerleri.....	45
<b>Tablo 4.2.</b> Gruplar arasındaki apoptotik farklılıkları belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	46
<b>Tablo 4.3.</b> ALP enziminin gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	50
<b>Tablo 4.4.</b> IL-6'nın gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	52
<b>Tablo 4.5.</b> TGF-β1'in gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	53
<b>Tablo 4.6.</b> β-katenin'in sitoplazmik ekspresyonunun gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	58
<b>Tablo 4.7.</b> β-katenin'in nükleer ekspresyonunun gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.....	59
<b>Tablo 4.8.</b> β-katenin'in nükleer ekspresyonunun gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan Post Hoc Tukey sonuçları.....	60

# 1. GİRİŞ

Osteosarkom (OS), daha çok genç erişkin ve çocuklarda görülen primer malign kemik tümürüdür. Kemikteki en aktif bölge olan uzun kemiklerin metafizleri, OS büyümesinin esas bölgeleridir (1). Son yıllarda cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi tekniklerinde ilerlemelere rağmen özellikle metastatik hastalarda sağkalım oranları değişmemiştir. Bu nedenle yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin tanımlanmasına ihtiyaç vardır (2). Tümörün kendisinden ziyade tümör mikroçevresini hedeflemek önerilen tedaviler arasındadır (3).

Osteosarkomun oluşumu ve gelişimi, kemik mikroçevresi ile yakından ilişkilidir (3). Mikroçevrede yer alan MKH'ler kendi kendini yenileme ve osteoblast, kondroblast, miyoblast, adiposit gibi birçok hücre tipine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler (4). Mezenkimal kök hücreler, rejeneratif, immünosupresif, immünomodülatör ve anti-inflamatuvar özellikleri nedeniyle klinik ve preklinikte önem taşımaktadır. İmmünosupresif olmaları nedeniyle kanser, otoimmün hastalıklar, hasarlı doku ve organları onarmada immün yanıtı düşürmek için terapötik bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (5,6).

Kemik mikroçevresindeki mezenkimal kök hücrelerin (MKH) osteosarkom metastazını indüklediği düşünülmektedir. MKH'ler tümör gelişimi, metastaz ve ilaç direnci ile yakından ilişkilidir (3). Daha önceki çalışmalar, tümör hücrelerinde ilaç direnci gelişmesine neden olan çeşitli mekanizmaları tanımlamış olsa da, tümör mikroçevresinin ilaç direncinin gelişiminde anahtar bir rol oynadığı belirtilmektedir (7)(4). Proliferasyon ve metastaz gibi osteosarkomun malign özelliklerinin, sadece tümörün kendisinin özelliklerinden değil, aynı zamanda mikroçevreden de önemli ölçüde etkilendiği, tümör hücrelerine yakın olan normal hücrelerin, doğrudan temas yoluyla tümör hücrelerinin etkisi altında olduğu belirtilmektedir (8). Bu mikroçevrede var olan hücreler tarafından salınan sitokinlerin de tümör hücreleri üzerinde etkileri olduğu bildirilmektedir (9)

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada K vitamininin anti-tümör etkileri araştırılmış ve birçok kanser hücresinde büyümeyi inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Buna karşılık K vitamininin osteosarkom hücreleri üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar çok nadirdir (10). K2 vitamininin hem osteosarkom hücreleri sağkalımına etkisi hem de mezenkimal kök hücrelerle indirekt etkileşimlerinin OS patogenezindeki rolünü araştırmaya yönelik planlanmış olması çalışmamızın özgün değerini ortaya koymaktadır.

Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmamızda osteosarkom hücrelerini, sağlıklı kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri ile indirekt ko-kültüre ederek in vitro ortamda tümör mikroçevresini taklit etmeyi ve bu mikroçevrede yer alan MKH'lerin ve K2 vitamininin osteosarkom hücreleri üzerindeki apoptotik ve proliferatif etkilerini incelemeyi amaçladık. Bunun için MKH'lerin ve K2 vitamininin osteosarkom hücre hattına anti-tümörojenik etkilerinin olup olmadığı farklı yöntemlerle ayrı ayrı ve ko-kültür ortamında enzim ölçümleri (ALP), sitokin tayini (interlökin-6 ve TGF- $\beta$ 1) ve hücre yolakları (Wnt/ $\beta$ -katenin) üzerinden araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Osteosarkom

Osteosarkom (OS), osteoid veya immatür kemik doku üreten mezenkimal hücrelerin oluşturduğu malign kemik tümördür (11). Mezenkimal orijinli olan bu malign hücreler kemikten veya nadiren yumuşak dokudan köken alır (12).

#### 2.1.1. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Osteosarkom, dünyada en sık görülen primer malign kemik tümörlerinden biri olup, yıllık görülme insidansı 3.4/1 000 000'dur (13). OS, başlıca pediatrik hastaları etkileyen tüm kemik tümörlerinin ~% 60'ını oluşturarak daha çok genç yetişkin ve adolesanlarda görülür (8,14). Osteosarkomlar sıklıkla puberteye bağlı büyümenin en hızlı olduğu dönemde görülür ve yaş büyüdükçe görülme sıklığı da artar. Pik insidansını kızlarda 10 ile 14, erkeklerde 15 ile 19 yaşları arasında yapar. Her yaş grubunda ve her ırkta erkekler kadınlara oranla daha fazla etkilenir (15).

Osteosarkom için fenotipik risk faktörleri fizyolojik büyüme ile ilişkili uzun boy ve yüksek doğum ağırlığını içerir (16). Vakaların büyük çoğunluğu sporadik mutasyonların sonucudur, ancak tümör baskılayıcı fonksiyon kaybı genellikle OS'de tanımlanır ve patogenezinde kritik bir adımdır. Kromozomal dengesizlik ve tümör baskılayıcı genlerin kaybından kaynaklanan genetik değişikliklere ek olarak, OS ayrıca proliferasyonu ve metastazı destekleyen bir kemik mikro ortamı oluşturarak ana sinyal yollarında bozulmalara da sebep olabilir (17).

Osteosarkom gelişimi birkaç genetik yatkınlık durumuyla ilişkili olmasına rağmen OS tümörlerinin çoğu sporadiktir. Çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen mevcut OS etiyojisi belirsizliğini korumaktadır (18). İnsanlarda osteosarkoma neden olduğu bilinen tek çevresel ajan iyonlaştırıcı radyasyondur. Radyasyon, osteosarkomların yaklaşık %2'sinde rol oynamaktadır (19).

### 2.1.2. Lokalizasyon ve Yayılım

Lezyonlar herhangi bir kemikte oluşabilir sıklıkla mezenkimal kök hücre havuzunu temsil eden uzun kemiklerin metafizlerinde görülür (20). Olguların yaklaşık %50'si diz çevresi kaynaklıdır; en yaygın diğer bölgeler distal femur, proksimal tibia ve proksimal humerustur (21). Daha az görülen bölgeler ise kafatası, çene ve pelvis kemiğidir (22). Ancak nadiren ekstremitelerin yumuşak dokularında da (ör: kas doku) görülebilir (23). Hastaların yaklaşık %15-20'sinde tanı anında radyografik olarak saptanabilir metastazlar bulunmaktadır. Cerrahi rezeksiyon sonrası metastatik hastalık geliştiğinden çoğu hastada mikro metastaz olduğu kabul edilir (21). Osteosarkomlar sıklıkla akciğere (>%70) nadiren de diğer kemiklere ve organlara metastaz yapar. Metastazlar hem akciğerlerde hem de kemiklerde aynı anda bulunabilir (24,25).

### 2.1.3. Osteosarkom Tümör Tipleri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından osteosarkom sınıflandırılması aşağıdaki şekildedir.

**Tablo 2.1.** Osteosarkom sınıflaması (26,27).

<b>1- İntramedüller</b>	<b>2- Multifokal</b>
A- Konvansiyonel (Klasik)	<b>3- Gnathic</b>
Osteoblastik	<b>4- Jukstakortikal</b>
Kondroblastik	Periosteal
Fibroblastik	Parosteal
B- Epiteloid	Yüksek dereceli yüzey
C- Dev hücreden zengin	<b>5- İntrakortikal</b>
D- Osteoblastom benzeri	<b>6- Sekonder Osteosarkom</b>
E- Küçük hücreli	
F- Telenjektatik	
G- Düşük dereceli santral	

Konvansiyonel osteoblastik OS yaklaşık %70 ile en yaygın görülen tiptir. Kondroblastik ve fibroblastik OS tümörlerinin her biri %10 ile ikinci en yaygın tiptir (18).

#### **2.1.4. Osteosarkom Belirtileri**

Osteosarkomlu hastalar sıklıkla etkilenen bölgede ağrı, kısıtlı eklem hareketi, lokalize sıcaklık artışı gibi spesifik olmayan şikayetlerle başvurur. Çok az hastada patolojik kırıklar oluşabilir (28). Hastalığın ileri evrelerinde genellikle kilo kaybı, halsizlik ve ateş izlenir (29).

Prognostik önemi olan alkale fosfataz (ALP) ve laktat dehidrojenaz (LDH) yükselmeleri dışında laboratuvar bulguları nadirdir (30).

#### **2.1.5. Osteosarkom Tedavisi**

Hastalığın tedavisi 1970'lere kadar öncelikle cerrahi rezeksiyon ile sağlansa da hastaların çoğunda tanıdan sonraki bir yıl içinde ölümcül seyreden akciğer metastazı görülmüştür (31). Sonraki yıllarda cerrahi öncesi (neoadjuvan) ve sonrası (adjuvan) kemoterapinin uygulanmasıyla metastatik olmayan osteosarkom için ameliyat sonrası uzun süreli kür oranı %25'ten %60'a yükselmiş olup (32), beş yıllık sağkalım ortalama %70 civarındadır (33). Lokalize osteosarkomlu bireylerin ortalama beş yıllık sağkalımları yaklaşık %80'dir, ancak metastatik hastalığı olanların prognozları çok daha kötüdür (22). Solunum yetmezliği ile birlikte ilerleyen akciğer metastazın gelişmesi genellikle ölümle sonuçlanır (34).

Primer ve metastatik osteosarkomu tedavi etmek için standart bakım protokolü sisplatin, doksorubisin, metotreksat ve ifosfamidden oluşan çoklu kemoterapi rejimidir (35,36). Son zamanlarda OS tedavisinde bifosfonat sınıfı ilaçlar dikkat çekmektedir. Bifosfonatlar, osteoklast aktivitesi üzerindeki etkilerinin yanı sıra tümör hücrelerinin büyümesini ve proliferasyonunu inhibe etme, apoptozu indüklemeye ve anjiyojenik büyüme faktörlerini aşağıya regüle etme işlevi görür. Ancak bu ilaçların osteosarkomu baskılamadaki rolü tartışmalıdır (37).

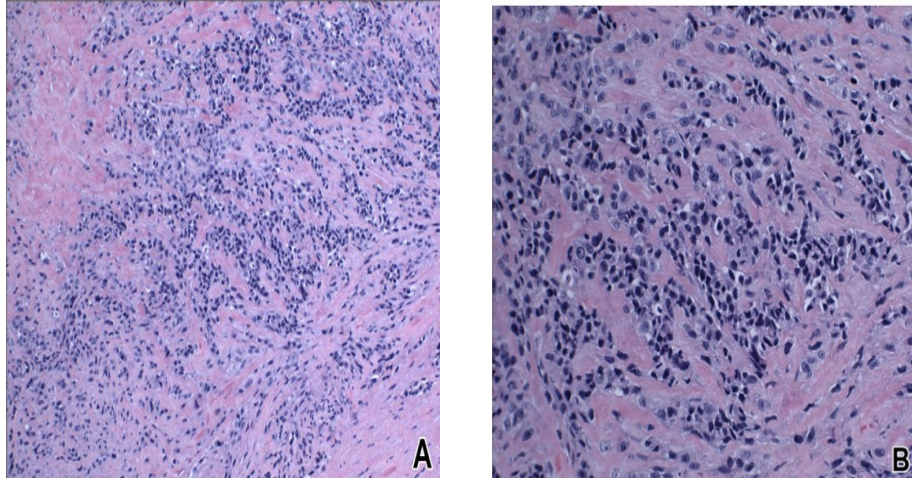
Osteosarkom tümörlerinin çoğunun patolojik ve moleküler özellikleri, OS'nin osteoblast farklılaşma yolağındaki genetik ve epigenetik bozulmalardan

kaynaklanmaktadır. Mevcut kemoterapiler çoğunlukla OS tümörlerinin proliferatif yönlerini hedeflediğinden, farklılaşmanın teşvik edilmesi ve/veya farklılaşma kusurlarının üstesinden gelinmesi için etkili bir adjuvan tedavi uygulanmalıdır (18).

Tedavide kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerin kombine edilmesi ile daha yüksek sağkalım oranları oluşsa da kemoterapinin yan etkilerine bağlı ölümler gerçekleşmektedir. Kemoterapinin sağlıklı dokularda oluşturduğu sitotoksosite de tedavide dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca hangi tedavi seçeneğinin uygulanması konusunda hala tam bir fikir birliğinin olmaması mevcut kemoterapiye alternatif yaklaşımlara zemin oluşturmaktadır (38,39).

### 2.1.6. Osteosarkom Histolojisi

Osteosarkom, histolojik olarak malign mezenkimal kök hücre ve tümör hücreleri tarafından osteoid üretimi ile karakterizedir (18). En yaygın histolojik tip olan konvansiyonel osteosarkomlar tüm vakaların yaklaşık %75'ini oluşturur (40). Bu sarkomlar kemik, kıkırdak veya lifli yapıların hakim olduğu bir matrikse sahiptir ve matriks hücrelerinin baskınlığına göre alt tiplere ayrılır. Histolojik açıdan, osteosarkom, osteoid matriks veya immatür kemik oluşumu ile birlikte malign, anaplastik (pleomorfik) iğsi hücre proliferasyonu ile karakterizedir (17) (Şekil 2.1).

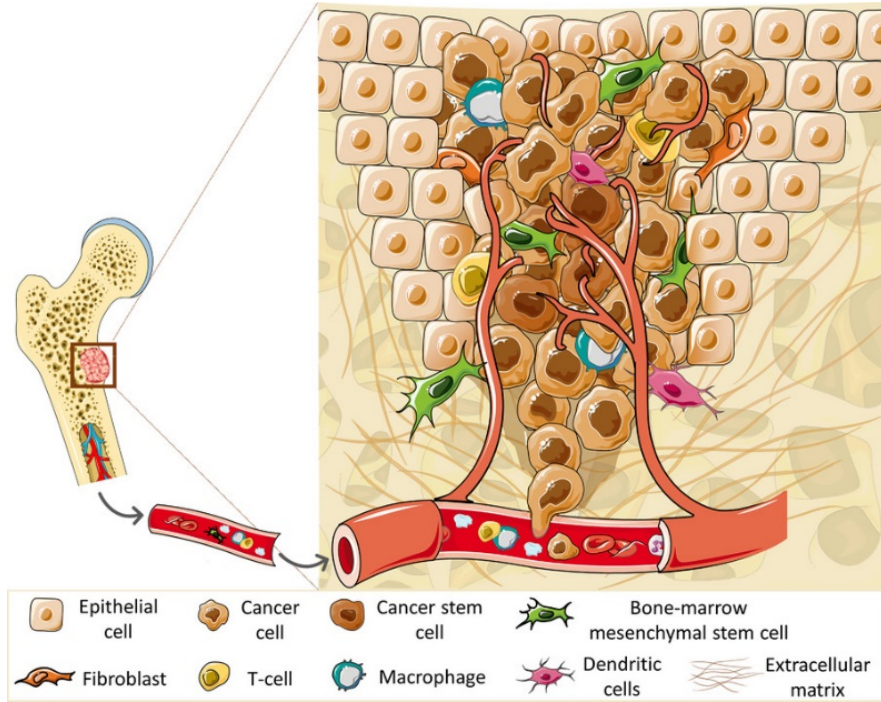


**Şekil 2.1.** En yaygın görülen tip olan Konvansiyonel OS'nin histopatolojik ışık mikroskopik görüntüsü, Hematoksilen-Eozin boyama (17).

Osteosarkomlar çeşitli hücre dışı matrisler üretebildiği ve değişik derecelerde farklılaşmaya sahip olabildiğinden, histolojik yapısı sadece vakadan vakaya değil, aynı vakada bölgeden bölgeye de önemli ölçüde değişebilir. Çeşitli alt tiplere göre sınıflandırılması sadece baskın histolojik modele göre değil, aynı zamanda anatomik yerleşimine ve bazen de histolojik derecesine göredir (41).

### 2.1.7. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi, hücreler arası matris ve hücresel bileşenler içerir (42). Tümör mikroçevresinde fibroblastlar, endotel hücreleri, bağışıklık hücreleri ve MKH gibi hücreler yer almakta (Şekil 2.2) ve bu hücrelerin arasındaki etkileşim tümörün yayılımında, invazyonunda ve metastaz gelişiminde önemli rol oynamaktadır (43,44). Mikroçevre sarkomun ilk gelişimini, kemoterapiye direnci ve tümör hücrelerinin metastatik yayılmasını da destekleyebilir (45,46). Tümör mikroçevresinin heterojen yapısı kanserde sağkalım, progresyon, metastaz, ilaçların başarısızlığı ve ilaç direncinin en önemli nedenlerinden sayılmaktadır (47).

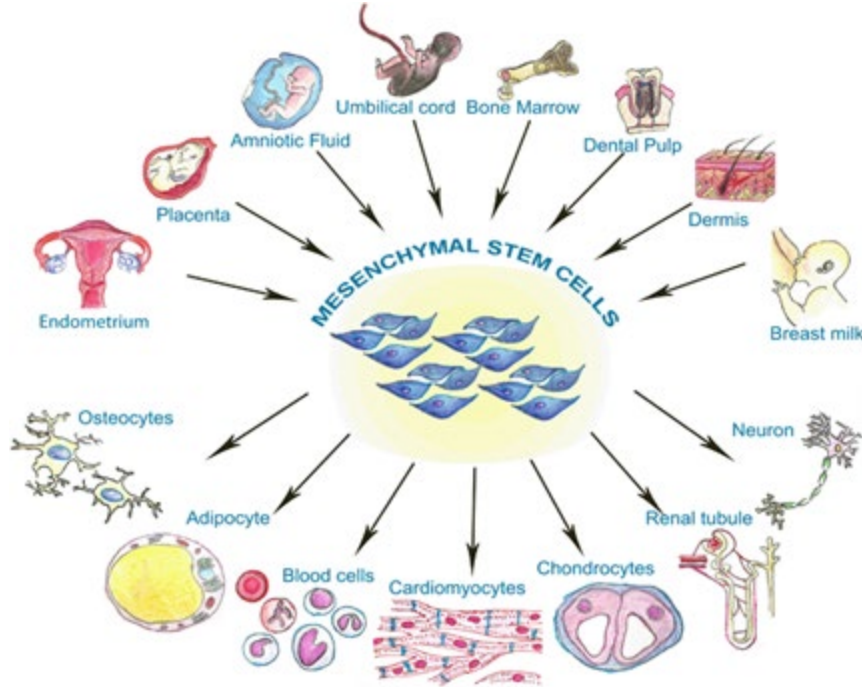


Şekil 2.2. Kemik tümörü mikroçevresi (48).

Tümör mikroçevresinde var olan hücrelerin yanı sıra hücreler arası matriks bileşenleri; proteazlar, büyüme faktörleri, ligandlar, metabolitler, sitokinler, DNA ve küçük RNA'lar gibi çözünebilen faktörlerin de tümör gelişiminde doğrudan veya dolaylı olarak rol aldığı gösterilmiştir (47).

## 2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Kemik iliğinde hematopoetik olmayan kök hücrelerin varlığı 140 yıl önce Alman patolog Cohnheim tarafından bildirilmiş ve bu hücreler ilk olarak 1970'li yıllarda Friedenstein ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Friedenstein, fetal buzağı serumu içeren kemik iliği aspiratının ortama yayılması sonucu adezyon yeteneği olan, osteoblast, kondroblast ve adiposit gibi hücrelere farklılaşabilen, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen kolonilerin varlığını bildirmiştir (49). İlk yapılan çalışmalarda mezenkimal kök hücre kaynağı kemik iliği iken (50) sonraki çalışmalarda diş pulpası, periost, trabeküler kemik, kas dokusu ve maksillofasiyal dokular, perisitler, dermis, kıl folikülü, dalak, akciğer, karaciğer, pankreas, testis, menstrüel kan, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı ve periferik kandan da mezenkimal kök hücre izolasyonları yapılmıştır (50–52).



Şekil 2.3. Erişkin mezenkimal kök hücre kaynakları ve farklılaşabilecekleri hücre tipleri (52).

Uluslararası Hücre & Gen Terapi Derneği (ISCT), 2019 yılından itibaren mezenkimal kök hücre yerine mezenkimal stromal hücre terimini önermektedir (53). MKH'ler immunofenotipik özellikleri itibariyle CD34, CD45, HLA DR ve CD14 gibi tipik hematopoietik belirteçleri göstermezken, CD105, CD73 gibi hematopoietik olmayan hücre yüzey belirteçlerini ifade ederler. Uluslararası Hücre & Gen Terapi Derneği tarafından mezenkimal kök hücreler için asgari üç tanımlayıcı özellik belirtilmektedir.

- 1- Standart kültür ortamında plastik yüzeye yapışabilmeleri,
- 2- CD105, CD73 ve CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerini ifade etmeleri, ancak CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 ve HLA-DR gibi hematopoetik belirteçleri ifade etmemeleri,
- 3- İn vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri (54).

Kemik iliği mikroçevresinin önemli bir bileşeni olan MKH'ler kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ ve kemik iliği stromal hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan multipotent öncü hücrelerdir (4). Son zamanlarda rejeneratif, immünosupresif, immünomodülatör ve anti-inflamatuvar özellikleri nedeniyle klinik ve preklinikte kullanıma girerek Avrupa Birliği Tıp Ajansı tarafından İlaç Hücre (Cell Drug) kapsamına alınmıştır (55). İmmünosupresif olmaları nedeniyle kanser, otoimmün hastalıklar, hasarlı doku ve organların onarımında immün yanıtı düşürmek için tedavi edici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (5,6).

### **2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Tümör Mikroçevresindeki Rolü**

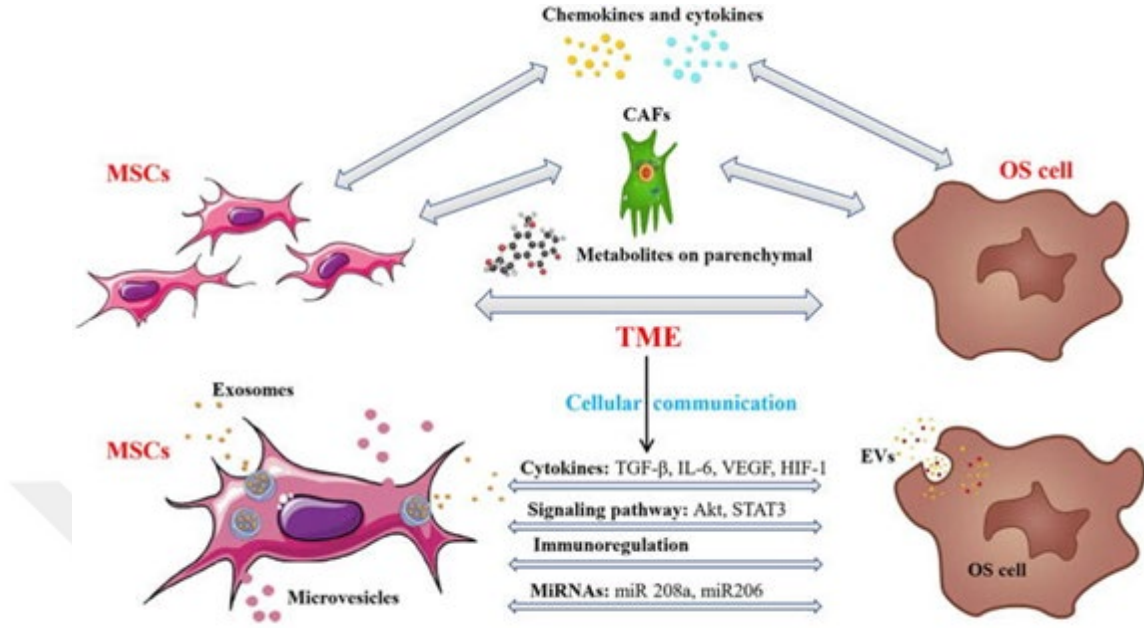
Osteosarkomların, osteoblast farklılaşma sürecinde MKH'lerden veya osteoblast öncü hücrelerinden geliştiğini gösteren çalışmalar olsa da (56,57) kökenine dair kesin bir kanıt yoktur. Bu sebeple özellikle genetik modifikasyon teknolojisi kullanılarak yapılacak çalışmalar OS'nin kökenini açıklamaya yardımcı olabilir. Klinik öncesi yapılan çalışmalar ile tümörlerin hücresel kökenini anlamak tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde oldukça önemlidir (58).

Mezenkimal kök hücrelerin tümör gelişimindeki etkileri de hala tam olarak anlaşılammıştır (6). Kanser tipine bakılmaksızın, bazı çalışmalar MKH'lerin tümör hücre büyümesini inhibe edici etkileri olduğunu gösterirken, bazı çalışmalarda MKH'lerin tümör hücrelerinin sağ kalımını destekleyen proliferatif etkileri olduğunu göstermiştir (59,60). Çalışmalar kemik iliği kökenli MKH'lerin tümör dokusuna ve metastaz olan bölgelere yöneldiğini (61–63) ve o hücrelerle kaynaştığını (64) belirtmektedir ancak bunu hangi mekanizmalar ile gerçekleştirdiği tam olarak bilinmemektedir (61,65).

### **2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerden Salınan Sitokinler**

Sitokinler, hücre iletişimde görev alan 5-20 kDa ağırlığında salgısal proteinlerdir. Spesifik reseptör ligandlarına bağlanarak hedef hücrede sinyal iletimini başlatırlar. Sitokinler, inflamasyon, otoimmün hastalıklar ve kanser patogeneğinde önemli rol oynarlar (66). Tümör mikroçevresinde bulunan sitokinler, tümör hücreleri ve kanserle ilişkili hücreler arasında parakrin sinyal iletimi yoluyla haberleşme sağlar (47). Bu mikroçevrede interlökinler, tümör nekroz faktör ailesi, interferon ailesi ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) protein ailesi gibi farklı fonksiyonlara sahip birçok sitokin bulunmaktadır (67).

Tümör mikroçevresinin hücresel bileşenlerinden olan MKH'ler ile tümör hücreleri arasındaki iletişim esas olarak hücre dışı veziküller (mikroveziküller ve eksozomlar), sitokinler, sinyal yolları, immünoregülasyon ve miRNA aracılığıyla olmaktadır (68) (Şekil 2.4). Mezenkimal kök hücrelerden salgılanan birçok sitokinin tümörün beslenmesini, büyümesini ve anjiyogenezini uyarabileceği kabul edilmektedir (69). Ayrıca tümör hücrelerinden ya da hasarlı dokulardan salınan çeşitli sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri de MKH reseptörlerine bağlanarak MKH'lerin damar dışına çıkmalarını ve hedefe yönelmelerini sağlamaktadır (70,71).



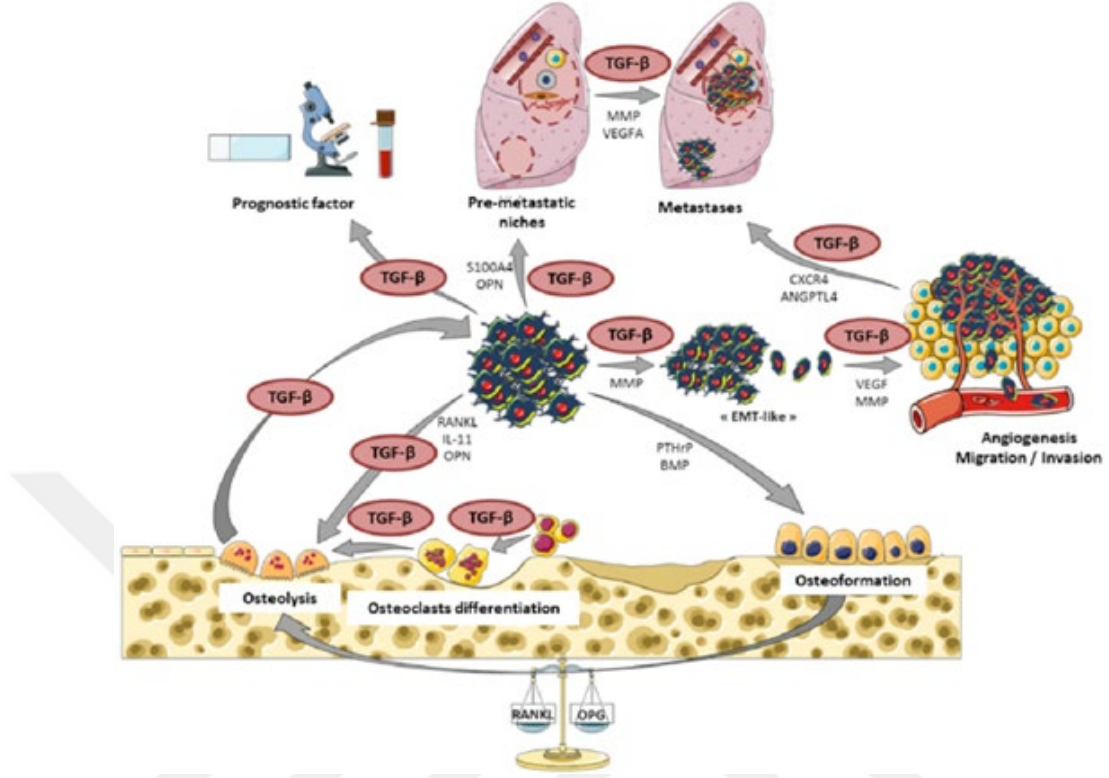
**Şekil 2.4.** Mezenkimal stroma ve tümör etkileşimi (68).

Salgılanan bu sitokinler arasında interlökin-6 (IL-6) başrol oynar (72). IL-6, antijene özgü immün yanıtı ve inflamatuvar reaksiyonları etkileyen birden çok hücre tipini etkileyen bir sitokindir (73). IL-6 monositler, fibroblastlar, T hücreleri ve birçok kanser hücresi tarafından salgılanır ayrıca B hücrelerinin farklılaşmasını uyararak antikor üretimini destekler (74). IL-6 salgısındaki artış inflamatuvar hastalıkların şiddetinin artmasına ve kanser gelişiminin hızlanmasına sebep olabilir (75). Kanser gelişiminde IL-6'nın, proliferasyon, anjiyogenez, migrasyon, invazyon ve metastazı arttırdığı (76,77) ve IL-6 yıkımının in vitro osteosarkom hücrelerinde hem migrasyonu hem de invazyonu azalttığı çalışmalarda gösterilmektedir (74).

İnterlökin-6'nın sekresyonu TGF-β1'e bağımlıdır (78). TGF-β1, hücre dışı matriks birikimini ve MKH'lerin proliferasyonunu indükleyen çok fonksiyonlu bir sitokindir (79). Makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, B hücreleri, T hücreleri, kanser hücreleri ve daha birçok hücre tarafından sentezlenen TGF-β; hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması (diferansiasyon), adhezyon, morfogenez, hücreler arası

matriks oluşumu ve apoptoz (programlı hücre ölümü) gibi çeşitli hücrel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır (80,81). Normal fizyolojik koşullar altında, TGF- $\beta$ , hücrelerin büyümesini sınırlayarak ve apoptozu uyararak doku homeostazının sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır. TGF- $\beta$  sinyalizasyonunun karsinogenezdeki rolü ise karmaşıktır (82). Hastalığın erken evrelerinde tümör baskılayıcı, sonraki evrelerde tümör destekleyicisi olarak görev yapmaktadır (82,83). Karsinogenez sürecinde TGF- $\beta$ 'nın anti-tümöral immün cevabı baskılanır. TGF- $\beta$  sinyalizasyonunun kesilmesi Epitelyal Mezenkimal Geçişe (EMT) neden olarak kanserin ilerlemesini sağlar. Hücreler arası etkileşimlerin bozulması sonucu metastazlar oluşur (84). TGF- $\beta$ , tümör hücrelerinde EMT'nin ana indükleyicisi gibi görünmektedir (85), ancak EMT'yi indüklemek için Wnt/ $\beta$ -katenin yolu dahil olmak üzere diğer sinyal yollarıyla da iş birliği yapmaktadır (86).

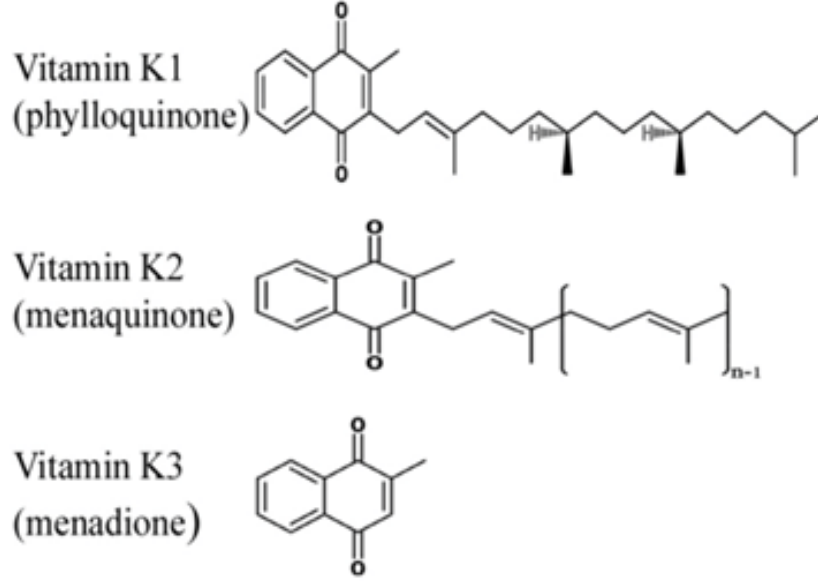
Osteosarkom istilasının ilk aşamalarında, TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörleri, bozulmuş kemik matriksinden salınarak osteosarkom hücreleri üzerine etki eder ve paratiroid hormon ilişkili protein (PTHrP), IL-6 ve IL-11 salınımını uyarır. Bu sitokinler daha sonra osteoklastları uyararak proinflamatuvar sitokinlerin daha fazla salınmasını sağlar ve kemik yıkımını aktive eder (87). Kemik yıkımını takiben, TGF- $\beta$ 'ler, tümör hücrelerini ve mikroçevresini hedefleyerek OS büyümesini ve metastatik yayılımını destekler. Reseptör aktivatör nükleer kappa-B ligandı (RANKL) ve IL-11 gibi osteolitik faktörlerin ekspresyonunu yükselterek kemik osteolizini ve protümoral faktörlerin salgılanmasını uyarır. Ayrıca Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ekspresyonunu ve dolayısıyla anjiyogenezi yukarı regüle eder. Son olarak, TGF- $\beta$ 'ler, immün hücre proliferasyonunu ve aktivitesini düzenleyerek immünosupresif etki gösterir (85) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. TGF-β'nin osteosarkom tümörü ve metastaz gelişimindeki merkezi rolü (88).

### 2.3. K Vitamini, Çeşitleri ve Osteosarkom Tedavisinde Yeri

K vitamini, ilk olarak 1929'da anti-hemorajik aktiviteleri nedeniyle Henrick Dam tarafından tesadüfen tanımlanmıştır (89). Pıhtılaşma proteinlerinin aktif formlarının sentezinde etkili olan K vitaminleri yağda çözünür ve normal koagülasyonun sağlanmasında önemli rolleri vardır (90–92). Biyokimyasal olarak 2-metil-1,4-naftakinon türevlerinden oluşmaktadır (93). İki doğal, bir sentetik olmak üzere üç gruptan oluşur; filokinon (K1), menakinon (K2) ve menadion (K3) (Şekil 2.6) (94).



**Şekil 2.6.** K vitaminlerinin kimyasal yapıları (K1: 2-metil-3 fitil-1,4-naftokinon; K2: 2-metil-3-difarnesil-1,4-naftokinon; K3: 2-metil-1,4-naftokinon) (95).

- K1 vitamini (fitonadion ya da filokinon) diyet yoluyla alınan K vitaminlerinin esas kaynağıdır. Yeşil yapraklı bitkiler (lahana, maydonoz, brokoli, ıspanak vb.), kivi, yeşil üzüm, avokado, soya fasülyesi, kişniş, yeşil çay, kanola, zeytinyağı gibi besin kaynaklarında bol bulunur (96).
- K2 vitamini (menakinon) fermentasyon yapan mikroorganizmalar ve insanda terminal ileum ile kolonda bulunan bağırsak bakterileri tarafından sentezlenir (90). Menakinon-n (MK-n) olarak adlandırılan bir dizi K vitamini formunu içerir; n, tekrarlayan 5-karbon birimlerinin sayısını yansıtır. Ana diyet menakinonları MK-4 ile MK-10'dur (96). Balık, yumurta, karaciğer, böbrek, süt, tereyağı ve fermente peynir gibi hayvansal gıdalarda bulunur. Menakinonlar, düşük yoğunluklu lipoproteinler tarafından karaciğerden kemik gibi ekstrahepatik dokulara taşınır (96).
- K3 vitamini (menadion) sentetik olarak üretilip provitamin olarak kullanılan formudur. Karaciğerde protrombin biyosentezi, kan plazmasındaki protrombinin artırılması ve kanın pıhtılaşması için gereklidir (93). K3 vitamininin yüksek dozları alerjik reaksiyonlar, hemolitik anemi ve karaciğer hücrelerinde

sitotoksosite gibi çeşitli yan etkilere neden olduğundan dolayı toksik olarak kabul edilir (97).

K vitamini, K vitaminine bağımlı proteinlerin post-translasyonel modifikasyonunda bazı glutamik asit rezidülerinin  $\gamma$ -karboksiglutamik aside (Gla) dönüşümünü sağlayan enzimatik reaksiyonun kofaktörüdür (98). K vitamini bağımlı proteinlerin karboksilasyonu hemostazın sağlanması, kemik metabolizması, büyümenin devamı ve sinyal iletimi için gereklidir (90,99). K2 vitamini, osteoblastik aktiviteyi uyarır ve osteoblastların hücre dışı matrisinde osteokalsin birikimini artırarak kemik mineralizasyonunda önemli rol oynar (98,100,101). Menakinonların hem pro-osteoblastik hem de anti-osteoklastojenik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kemik mineral yoğunluğunu korumak yerine kemik kalitesini iyileştirme etkisine de sahiptir (100).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, K vitamininin anti-tümör etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmalar K vitamininin lösemi, hepatoselüler karsinom, akciğer, meme, mesane ve prostat kanserleri dahil olmak üzere kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (102–107). Buna karşılık K vitamininin osteosarkom hücreleri üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar çok nadirdir (10).

#### **2.4. Hücre Ölüm Yolakları**

Morfolojik kriterlere dayalı olarak üç farklı hücre ölüm yolağı tanımlanmıştır:

1. Tip I (nükleer dejenerasyon/apoptoz),
2. Tip II (sitoplazmik vakuolizasyon/otofajik hücre ölümü)
3. Tip III dejenerasyon (hücre yırtılması/nekroz) (108).

## 2.4.1. Apoptoz

### 2.4.1.1. Apoptozun Tarihçesi

Apoptoz, normal gelişim sırasında organizmanın ihtiyaç duymadığı, istenmeyen veya hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması için evrimsel olarak korunmuş programlı hücre ölümüdür (109). Yunancada apo (ayrı) ve ptosis (düşen) kelimelerinin birleşmesi ile oluşan apoptozis terimi çiçek veya ağaç yapraklarının dökülmesini tanımlar (110).

Işık mikroskobu ve boyama yöntemlerinin keşfiyle 1920 yılında hücre ölümü ile ilgili ilk olarak nekroz tanımlanmıştır (111). 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından iskemiye maruz kalan dokuda nekrozdaki farklı olan hücre ölümü gözlenmiştir (110). 1980 yılında ise Wyllie programlanmış hücre ölümü olan apoptozun biyokimyasal araştırmalarının temelini sağlamıştır (112). Duke ve arkadaşları 1983 yılında jel elektroforezi sistemi ile apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA'nın parçalandığını göstermiştir. Bu sayede apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı gösterilerek apoptozis konulu çalışmalar ivme kazanmıştır (113).

Apoptozun artması nörodejenaratif (Alzheimer, Huntington, Parkinson), hematolojik (aplastik anemi, Fanconi anemisi), otoimmün (multipl skleroz, romatoid artrit, skleroderma) bozukluklara; azalması ise kanser, viral enfeksiyonlar, metabolik hastalıklara yol açar (114).

Çok hücreli organizmalarda homeostaz hücre farklılaşması, proliferasyonu ve ölümü arasındaki denge ile sağlanır (115). Hücre proliferasyonu hakkında birçok şey bilinmesine rağmen hücre ölümünün altında yatan moleküler mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır (116). Bir hücrenin apoptoza girme kararı, çok çeşitli düzenleyici uyarılardan etkilenebilir (115). Apoptotik süreç hücre içi ve hücre dışı uyarılar tarafından aktive edilir. Serbest radikaller, oksidanlar, ilaçlar, bazı nörotransmitterler, glukokortikoidler, TGF- $\beta$ , tümör nekroz faktörü (TNF), nöron büyüme faktörü, koloni uyarıcı faktörler, insülin benzeri büyüme faktörü, ultraviyole ve iyonize edici radyasyon dış uyarılardır. Tümör süpresör (baskılayıcı) gen olan p53, onkogenler, gıda yetersizliği-

antimetabolitler, viral-bakteriyal enfeksiyonlar ve glukokortikoidler ise iç uyaranlardır (114,117,118).

Apoptoz, tipik olarak, çok çeşitli hücrel proteinleri parçalayan bir sistein proteaz ailesi olan kaspazların aktivasyonu tarafından yönlendirilir. Kaspaz proteazlarının aktivasyonuna göre içsel ve dışsal olmak üzere iki ana yolak vardır (119).

İçsel yolak (İntrinsik Yol / Mitokondri Aracılı Apoptoz)

DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği, oksidatif stres ve ultraviyole radyasyon gibi çeşitli hücre içi uyaranlar tarafından aktive edilir. Bcl-2 protein ailesinin proapoptotik (Bid, Bak ve Bax) ve antiapoptotik (Bcl-2 ve Bcl-XL) üyeleri tarafından yönetilir (120) (Tablo 2.2). Mitokondriyal sitokrom c salınımı ile serbest kalan sitokrom c, Apaf-1'e bağlanır. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 aktivasyonunu indükler ve apoptozom denilen kompleks oluşur (119).

**Tablo 2.2.** Apoptozis ve genler (111).

Proapoptotik genler	Antiapoptotik genler
<ul style="list-style-type: none"><li>• Bcl-2 ailesinden; Bid, Bak, Bax, Bad, Bik, Bcl-XS, Hrk1</li><li>• c-myc</li><li>• p53, p21</li><li>• Fas (APO-1/CD95)</li><li>• FADD/MORT1, RIP</li><li>• İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)</li><li>• LOH (MTS1/CDK41)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bcl-2 ailesinden; Bcl-XL, BHRL-1, Bcl-W, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1</li><li>• c-abl</li><li>• p35</li><li>• ras onkogeni</li><li>• çözünebilir Fas</li><li>• A20</li></ul>

### Dışsal yolak (Ekstrinsik Yol / Reseptör Aracılı Apoptoz)

Apoptozis hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen TNF reseptörü 1 (TNF-R1), Fas (APO-1/CD95), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand dahil olmak üzere TNF ailesinin ölüm reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla tetiklenir (120). TRAIL ve FAS gibi membran ölüm reseptörlerine bağlanan ligand, pro-kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olur bu da kaspaz-3 ve -7'nin aktivasyonunu tetikleyebilir ve hücre ölümüne yol açan TRAIL ve FAS ligandı gibi dış faktörler tarafından indüklenir (119).

Tümörler içsel yol aracılığıyla apoptoz indüksiyonuna dirençli hale getiren mutasyonlar geçirdiklerinden, kanser tedavisinde sıklıkla dışsal apoptoz yollarını hedeflenir (120).

#### **2.4.1.2. Morfolojik Değişiklikler**

Apoptoz mekanizması enerji gerektiren aktif ve fizyolojik bir süreçtir. Mitokondriyonlar tarafından ölüme götüren faktörlerin salınımı Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir. Apoptozu uğrayan hücre komşu hücrelerle olan temasını kaybederek morfolojik olarak küçülür. Su kaybederek büzüşen hücrede zar proteinleri yıkılır ve hücre zarında kabarcıklar oluşur. Sitoplazma yoğunlaşır. Nükleer membranın yakınında yoğunlaşan kromatinin yıkılması ile artan büzüşme sonucu ışık mikroskopunda yoğun ve koyu boyanan küçük yapılar olan piknotik çekirdekler görülür. Nükleozomlar arasında DNA'yı parçalara ayıran endonükleazlar aktive olur. Apoptoz sonucunda artıkların ortadan kaldırılması için özelleşmiş hücrelerce fagosite edilen zarla çevrili küçük apoptotik cisimler oluşur. Enflamatuar reaksiyon olmaksızın apoptotik cisimler fagositik hücrelerce uzaklaştırılır (121,122).

Apoptotik hücreler nekrozdan farklı olarak parçalandıktan sonra içeriklerini dış ortama salmazlar (122). Apoptozun hatalı düzenlenmesi sonucu hücre sağkalımında oluşan değişiklikler kanser, viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar ve AIDS (edinilmiş immün yetmezlik sendromu) dahil olmak üzere birçok hastalığın patogenezi katkıda bulunur (115,123).

### 2.4.1.3. Apoptoz Tayininde Kullanılan Yöntemler

Apoptozun belirlenmesi için çeşitli morfolojik ve biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Apoptoza gitmek için sinyali alan hücrede birçok değişiklik oluşmaktadır. Bu süreçte nükleus, sitoplazma, mitokondri veya hücre membranında değişimler olur. Hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin hücre membranının dış yüzeyine çıkması en belirgin değişimlerdenidir. Membranda oluşan bu yer değişikliği hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Hücrenin dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserine bağlanma özelliği olan Anneksin V, floresan bir madde (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücrenin görünür hale gelmesini sağlar. Anneksin V-FITC kompleksinin fosfatidilserine bağlanma oranı akım sitometri ile ölçülebilmektedir. Bu yöntemde ikinci bir boya olarak eklenen propidyum iyodür (PI) ölü hücrelerin boyanmasına imkân sağlar. Böylece Anneksin V-FITC ve PI ile eş zamanlı yapılan boyama canlı ve ölü hücrelerin belirlenmesini sağlar (124).

#### Apoptoz tayininde kullanılan yöntemler:

- Morfolojik görüntüleme yöntemleri (Hematoksilen-Eozin boyama, Giemsa boyama, Elektron mikroskopi, Floresan mikroskopi, Faz kontrast mikroskopi)
- İmmünohistokimyasal yöntemler (M30 yöntemi, Annexin V, TUNEL, Kaspaz 3)
- Biyokimyasal yöntemler (Agaroz jel elektroforezi, Western blotting, Akım sitometri)
- İmmünolojik yöntemler (ELİSA, Fluorimetrik Yöntem)
- Moleküler biyoloji yöntemleri (117,125).

### **2.4.2. Otofaji**

Yunanca “kendi kendini yeme” anlamına gelen otofaji; açlık, büyüme faktörü eksikliği, hipoksi durumunda hücre içindeki organellerin ve sitoplazmik yapıların lizozomlar tarafından parçalandığı katabolik bir süreci ifade eder (126,127). Otofaji sonucunda lizozomlarda veya vakuollerde üretilen metabolitler, yeni makromoleküllerin sentezi için enerji kaynağı ya da yapı taşı olarak yeniden kullanılır. Yıkım için hedeflenen sitoplazmik yapıların otofagozom denilen çift zarlı veziküllere paketlenerek lizozoma taşınması ile tanımlanan otofaji, hücrenel içeriğin lizozoma nasıl gönderildiğine bağlı olarak üç çeşittir: Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (126).

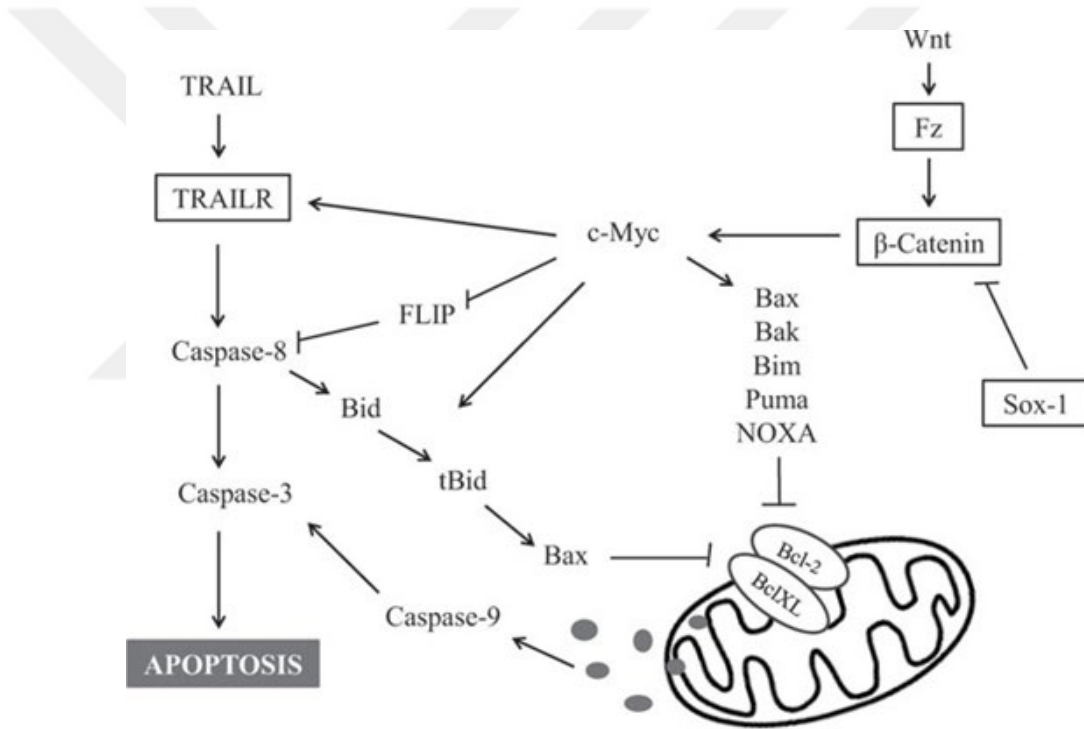
Otofajinin kanser metabolizmasında rolü metastatik ve anti-metastatik olduğunu gösteren çalışmalar nedeniyle tartışmalıdır. Otofaji, kanser metastazının ilk evresinde, tümör nekrozunu ve immün hücre infiltrasyonunu kısıtlayarak metastazı antagonize eder. Böylece, kanser hücrelerinin birincil bölgeden yayılmasını önlemeye çalışır. Metastazın ileri evrelerinde ise malign hücreler ekstraselüler matriksten ayrılarak başka bir bölgede kolonize olur ve bu yeni ortamdaki metastatik hücreleri indükleyerek, metastazın destekleyicisi olarak hareket edebilir. Kanser hücreleri, genetik mutasyonlar veya epigenetik modifikasyonlar üreterek programlanmış hücre ölümünden kaçmak için çeşitli stratejiler geliştirir. Bu nedenle, tek tip programlanmış hücre ölümünü indüklemek kanser metastazının tedavisi için yeterli olmayabilir. Farklı hücre ölümü indükleyicilerinin kombine kullanımı, metastatik hücreleri öldürmek için daha doğru bir yaklaşım olacaktır (128–130).

### **2.4.3. Nekroz**

Nekrozda hücre zedelenmesi meydana geldiğinden süreç pasif ve patolojiktir. Hücre membranı hasarı sonucu su ve ekstraselüler iyonlar çevreye sızar. Organeller geri dönüşümü olmayan değişikliklere uğrarlar. Lizozomal enzimler ekstraselüler alana verilirken komşu dokuda hasara ve ileri düzeyde enflamatuar yanıtı neden olur (118,121).

## 2.5. Wnt/ $\beta$ -Katenin Sinyal Yolağı

Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi önemli biyolojik süreçleri kontrol eden evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yoludur. Ayrıca hem embriyonik hem erişkin dönemde hücre kutuplaşmasının sağlanması, hücre siklusunun düzenlenmesi, hücre adezyonu, anjiogenez, apoptozis ve adipogenez gibi biyolojik olaylarda rol oynar (131,132) (şekil 2.7).

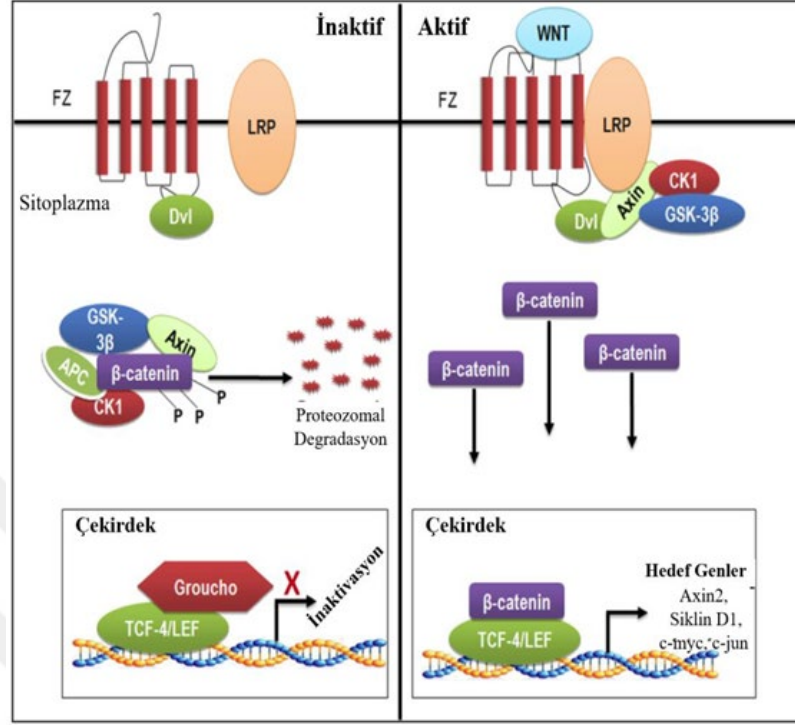


şekil 2.7. Wnt/ $\beta$ -Katenin sinyal yolağının apoptozdaki rolü (129).

Temel olarak üç farklı Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır; bu yolağlardan biri olan Wnt/ $\beta$ -katenin (kanonik) yolağı kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (134,135). Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağında, Wnt ligandının Frizzled (Fz) reseptörüne ve Fz'nin ko-reseptörü olarak tanımlanan düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein olan LRP5/6 proteinine bağlanması ile birlikte hücre içi sinyalizasyon başlar. Böylelikle Wnt sinyal mekanizmasının başlatılabilmesi için gerekli olan l yapı (Fz-Wnt-LRP5/6)

birbirleriyle bağlantı kurmuş olur (136–138) (Şekil 2.7). Bu bağlanmanın sonrasında sinyal önce sitoplazmaya geçer ve DVL (dishevelled) fosforilasyonu uyarılır. Daha sonrasında bu fosforilasyon Axin, APC (adenomatous polyposis coli), CK1 (casein kinase 1), GSK-3 (glycogensynthase kinase 3)'ten oluşan yıkım kompleksini dağıtarak,  $\beta$ -katenin stabilizasyonunu sağlar ve  $\beta$ -kateninin nükleer translokasyonuna izin verir. Çekirdeğe giren  $\beta$ -katenin, transkripsiyon faktör ailesi olan TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) üyelerine bağlanarak hücrenin proliferasyonunu sağlayacak çok sayıda Wnt hedef geninin transkripsiyonunu sağlar (139–141).

Wnt sinyali yokluğunda ise  $\beta$ -kateninin sitoplazmada yıkımı sağlanır. Hücrede üç farklı lokalizasyonda (membranda, sitoplazmada ve nükleusta) bulunabilen  $\beta$ -kateninin sitoplazmada parçalanamaması sonucu nükleusa geçmesiyle malign süreç başlar ve nükleusta onkojenik genler aktive olur (Şekil 2.8). Bu sinyal yolunda görev alan çeşitli biyomoleküllerde meydana gelen bazı patolojik değişiklikler hem Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonuna, hem de kanser başta olmak üzere birçok ciddi hastalıkların oluşmasına neden olabilmektedir (131,142). Dolayısıyla bu sinyal yolu ve bu yolda görev alan biyomoleküllerin aydınlatılması hem oluşumlarında rol oynadıkları hastalıkların etiyolojilerinin ayrıntılı biçimde ortaya konulmasında hem de bu hastalıkların tedavisi için yeni hedef moleküllerin belirlenmesinde oldukça önemlidir (132).



Şekil 2.8. Wnt/β-Katenin sinyal yolağı (143).

### 2.5.1. Osteosarkomda Wnt/β-Katenin Sinyal Yolağı

Osteosarkom patogenezinde Wnt/β-katenin sinyallemesinin rolü tam olarak anlaşılammıştır (45,134,142). Wnt/β-katenin sinyali, normal osteoblast farklılaşması ile ilişkilidir. Anormal Wnt/β-katenin sinyali normal kemik gelişimini bozmakta ve osteosarkomda sıkça görülmektedir (144). Wnt sinyal yolunun anahtar molekülü olan β-kateninin OS hücrelerinde ekspresyonunun arttığı, bu durumun da uzak metastaz ve kötü prognozla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcut olmasına rağmen aşırı ekspresyonunun klinikteki önemi hala belirsizliğini korumaktadır (145). Multifaktöriyel bir protein olan β-katenin hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilişkilidir. Osteosarkom hücrelerinde anormal Wnt aktivasyonunu spesifik olarak hedefleyen terapötik ajanların geliştirilmesi ise hala araştırılmaktadır (142).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

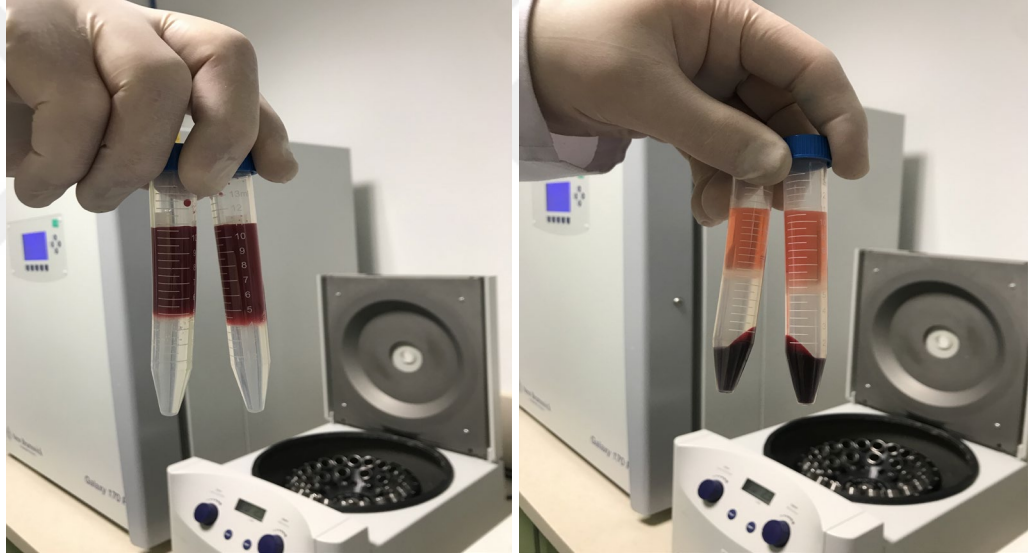
#### 3.1. Sağlıklı Verici Kemik İliği Örneklerinin Toplanması ve Mononükleer Hücre İzolasyonu

Çalışmamız için Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na başvurulmuş olup, kurulun 17.03.2021 tarihli toplantısında çalışmamızın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir (Onay/Protokol No:2021/28). Çalışmamız için Ankara Şehir Hastanesi/Çocuk Hastanesi Kemik İliği Nakil Ünitesine veya Hematoloji bölümüne allojenik nakil için başvuran kişilerin sağlıklı vericilerinden kemik iliği örneği alındı. Sağlıklı vericiler seçilirken, geçirilmiş ya da geçirmekte olduğu onkolojik veya enfeksiyon hastalığının olmamasına, kemik iliği örneği vermesine fiziksel ve tıbbi engel olmamasına dikkat edildi. Sağlıklı vericilerden alınan onam sonrası ameliyathane ortamında posterior iliak krestten alınan kemik iliği aspirasyonu sonrası 2-5 ml kadar kemik iliği örneği çalışma için ayrıldı.

Sağlıklı vericilerden alınan kemik iliği aspirasyonu örnekleri Ankara Şehir Hastanesi/Çocuk Hastanesi/Kök Hücre Laboratuvarına ulaştıktan sonra dansite gradient yöntemi ile mononükleer hücre (MNH) izolasyonu yapıldı (Şekil 3.1).

- \* Kemik iliği örnekleri aynı volümde (1/1) Phosphate Buffer Solution (PBS) (AppliChem, Almanya) ile seyreltildi.
- \* Ayrı bir tüpte seyreltilmiş kemik iliğiyle aynı volümde (1/1) ficol (Cegrogen Biotech, Almanya) hazırlandı ve seyreltilen ürün ficol üzerinde tabaka oluşturacak şekilde damla damla eklendi.
- \* Tüp içerisindeki örnek 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj (Eppendorf 5702, Almanya) edildi.
- \* Santrifüj sonrasında buffy coat (MNH) pastör pipeti ile toplandı ve steril falkon tüpe alındı.

- \* Hücreleri içeren pellet üzerine 10 ml PBS eklenerek homojenize edildi ve 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.
- \* Pellet haline gelen hücreler üzerine %60 Dulbecco’s Modified Eagle Medium Low Glucose w/L-Glutamine (DMEM-LG), %30 Fetal bovine serum (FBS) (Biochrom, Almanya) ve %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) (OriGen, ABD) içeren dondurma (freezing) solüsyonu eklenerek 2 ml’lik kriyoviallerde alikuatlandı. +4 °C’de 1 saat, -20 °C’de 4 saat, -80 °C’de 24 saat bekletildikten sonra -196 °C sıvı azot tanklarına (MVE-1500-Series-190, Chart) alındı.



**Şekil 3.1.** Mononükleer hücre izolasyonu için örneğin fikol üzerine alınması (sol), Fikol ile dansite gradient yönteminin uygulanması sonrası hücre tabakalarının oluşumu (sağ).

### **3.2. Mononükleer Hücrelerden Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi ve Kültürü**

- \* Azot tankından alınan kriyovialler oda ısısında hızlıca çözüldü. Çözülen hücreler yeni bir tüpe alınarak ortamdaki dondurma solüsyonunu uzaklaştırmak için 5 ml PBS eklenerek 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine 5 ml büyüme besiyeri [DMEM-LG (Lonza, ABD), %10

fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin (Biochrom, Almanya), %1 antifungal (Candisept)] eklenerek 25 cm<sup>2</sup>'lik (T25) flaska aktarıldı ve 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültüre edildi.

- \* Kültür flaskı tabanına yapışan hücreler gözlendikten sonra her 3 günde bir kültür besiyeri tazelenir. Böylece yapışmayan hematopoetik hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanır.
- \* Yapışkan karakterdeki hücrelerin %80-90 oranında (konfluent) çoğalarak kültür kabını doldurması beklenir. Konfluent hale gelen hücreler pasaj 1'e geçirilir. Bu işlem için önce hücre kültür ortamından besiyeri uzaklaştırılır daha sonra ortama PBS eklenerek hücreler yıkılır.
- \* Hücre kültür ortamından PBS uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 2 ml %0.05 tripsin/EDTA (Biochrom, Almanya) konuldu ve inkübatörde yaklaşık 5-10 dakika beklenir. Bu aşamada hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları invert mikroskopta (Olympus CKX41) kontrol edilir.
- \* Bir süre sonra kültür flaskındaki hücreleri tripsinin etkisinden uzaklaştırmak için besiyeri eklenerek kalkmış olan tüm hücreler steril bir falkona aktarılır ve 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- \* Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant atılır ve pellet 1 ml besiyeri eklenerek resüspanse edilir. Sayım için hazırlanan örnekten 20 µl, tripan mavisinden 20 µl (eşit hacimde olmalı) ependorf tüpe alınır ve pipetaj yaparak homojenize edildikten sonra Thoma lamına aktarılarak mikroskop altında sayılır. Sayım sonucuna göre pasaj 1'e geçecek hücreler ekim için hazırlanır. 1 mL'deki canlı hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{Canlı hücre sayısı (hücre/mL)} = \text{Tüm alanlarda sayılan hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon katsayısı} \times 10^4$$

### 3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

#### 3.3.1. Morfolojik Analiz

Kemik iliği aspirasyonu ile elde edilip pasaj 2'ye getirilen hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince invert mikroskop ile incelendi.

#### 3.3.2. Farklılaşma Testleri

Çoğaltılan pasaj 2'deki MKH'ler adipojenik ve osteojenik farklılaşmayı uyaran besiyeri ortamında üç hafta kültüre edildikten sonra farklılaşma potansiyelleri değerlendirildi.

##### Adipojenik Farklılaşma

- \* MKH'lerin kültür kabında %80 yoğunluğa ulaşması beklendi. Yoğunluğa ulaşmış hücreler 5 ml PBS ile yıkandı ve üzerlerine 2 ml adipojenik farklılaşma besiyeri (MesenCult Adipogenic Differentiation Supplement-Human, Stemcell, Kanada) eklenerek iki günde bir kültür ortamı tazelendi.
- \* Üç hafta sonunda flasklardaki besiyerleri toplanarak PBS ile yıkandı ve hücreler 5 ml %10 formol (Sigma, ABD) ile fikse edildi.
- \* Fiksasyonun ardından formol uzaklaştırılıp distile su ile yıkama işlemi yapıldı.
- \* 5 ml %70 izopropanol eklenerek 5 dk beklendi.
- \* 5 ml Oil Red O (Sigma, ABD) boyası eklenerek 5 dk oda ısısında beklendi ve distile su ile yıkama yapıldı.
- \* Hücrelerin çekirdek boyaması için flaska 5 ml Hematoksilen eklendi ve distile su ile yıkama yapıldı.
- \* Dijital görüntüleme sistemi ile (Olympus CKX41) flaskların fotoğrafları çekildi.

### Osteojenik Farklılaşma

- \* Osteojenik farklılaşma için üretilen hücreler 5 ml PBS ile yıkandı ve üzerlerine 5 ml osteojenik farklılaşma besiyeri (MesenCult Osteogenic Stimulatory Kit, Stemcell, Kanada) eklenerek iki günde bir kültür ortamı tazelendi.
- \* Üç hafta sonunda flasklardaki besiyerleri toplanarak PBS ile yıkandı ve hücreler 5 ml %4 paraformaldehit ile 30 dk oda ısısında fikse edildi.
- \* Fikse edilen hücreler distile su ile yıkanarak paraformaldehitin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı.
- \* Flasklara 5 ml Alizarin Red boyası (Sigma, ABD) eklenerek 20 dakika oda ısısında bekletildi ve distile su ile yıkama yapıldı.
- \* Dijital görüntüleme sistemi ile (Olympus CKX41) flaskların fotoğrafları çekildi.

### **3.3.3. Akım (Flow) Sitometri ile İmmünofenotip Analizi**

Kemik iliği kökenli MKH'lere özgü hücre yüzey belirteçleri akım sitometri cihazı ile (NovoCyte 3000 Akım Sitometrisi, ACEA, ABD) analiz edildi.

- \* Hücrelerin yüzey moleküllerinin analizi için pasaj 2 MKH'ler kullanıldı.
- \* Kültür kabında üretilen hücreler istenilen yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılıp hücre süspansiyonları hazırlandı.
- \* Homojenize edilen hücre pelleti akım sitometri tüplerine eşit dağıtılarak üzerlerine 100 µl PBS-BSA-NaN<sub>3</sub> (FACS) eklendi.
- \* Her birinden 5 µl olacak şekilde CD73 (344006, Biolegend), CD90 (328110, Biolegend), CD105 (323218, Biolegend) ve CD34 (343604, Biolegend) antikorlarından eklendi (Tablo 3.1).

- \* Tüpler oda ısısında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi; inkübasyon sonrası 2 kez FACS buffer eklenerek 4 °C’de 1800 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- \* Santrifüj sonrası süpernatant döküldü, pelletin üzerine 200 µl PBS eklenerek resüspanse edilip immünofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için akım sitometri cihazında analiz edildi.

**Tablo 3.1.** MKH’lerin karakterizasyon analizinde kullanılan belirteçler.

Antikor	Antikor yanıtı
CD73-APC	Pozitif
CD90-PE	Pozitif
CD105-PE/Cy7	Pozitif
CD34-FITC	Negatif

#### 3.4. İnsan Osteosarkom Hücre Hattı (Saos-2) Kültürü

Çalışmamızda kullanılan Saos-2 hücre hattı Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü, HÜKÜK Kayıt No:02111901) tarafından hediye edildi. -196 °C’deki sıvı azot tankından alınan hücreler oda ısısında hızlıca çözüldü. Kriyovialde çözülen hücreler yeni bir tüpe alınarak ortamdaki dondurma solüsyonunu uzaklaştırmak için 5 ml PBS eklenerek 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerine 5 ml büyüme besiyeri [DMEM-LG High Glucose (Lonza, ABD), %10 fetal sıgır serumu, %1 penisilin-streptomisin, % 1 antifungal] eklenerek 25 cm<sup>2</sup>’lik flaska aktarıldı ve 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatörde kültüre edildi. Üç günde bir besiyeri ortamı değiştirildi.

Konfluent yapıya ulaşan hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra steril PBS ile yıkandı ve üzerine 2 ml tripsin enzimi konularak yaklaşık 5 dakika inkübe edildi. Tripsin hacminin iki katı besiyeri konularak süspansiyon haline gelen hücre steril falkon tüpe aktarılarak 1800 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı ve dipte kalan pellet 1 ml besiyeri ile sulandırılarak sayım yapıldı. Sayım sonrası hücre yeni bir flaska ekilerek pasaj atlatıldı.

### **3.5. K2 Vitamini Dozlarının Belirlenmesi**

#### **3.5.1. K2 Vitamininin Hazırlanması**

Çalışmada kullanılan K2 vitamini (V9378-250mg, Sigma-Aldrich) toz halde temin edildi. K2 vitamini, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde hazırlanan stok çözeltiler 0.2 µM filtrasyon ile sterilize edilerek tek kullanımlık alikuatlara bölünüp -20 °C'de saklandı. 500 µM ara stok solüsyonu besiyeri ile dilüe edilerek 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM ve 200 µM K2 vitamini dozları hazırlandı.

#### **3.5.2. İn Vitro Sitotoksitenin XTT Testi ile Belirlenmesi**

K2 vitamininin Saos-2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin olup olmadığı ya da sitotoksik etkisinin ne düzeyde olduğunu tayin etmek amacıyla hücre canlılık testi yapıldı. 48. ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek için XTT (30007, Biotium) hücre canlılık kiti kullanıldı.

XTT [2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] yapısındaki tetrazolyum tuzları metabolik aktif hücreler tarafından turuncu renkli formazan kristallerine indirgenir. Oluşan formazan kristallerinin miktarındaki artış metabolik olarak aktif hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Turuncu renkli formazan suda çözünür ve yoğunluğu bir spektrofotometre ile ölçülebilir (146).

96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına ekilen Saos-2 hücreleri ( $5 \times 10^3$ ) kuyu başına 100 µl besiyeri konularak %5 CO<sub>2</sub> ortamında 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin tutunmalarını takiben kültür ortamındaki besiyeri uzaklaştırılarak 5 µM, 10 µM, 25 µM,

50 µM, 75 µM, 100 µM ve 200 µM konsantrasyonlarında K2 vitamini içeren taze besiyerleri eklenerek 37 °C’de 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. Ayrıca hücrelerin besiyeri ortamında kültüre edildiği ‘kontrol’ ve besiyeri ortamı %0.1-2 oranında DMSO içeren ‘DMSO kontrol’ grupları da oluşturuldu. Süre sonunda her kuyucuğa 50 µl XTT reaksiyon solüsyonu eklendi. Işık almaması için alüminyum folyoya sarılarak iki saat 37°C’de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildikten sonra ELİSA okuyucusunda (Thermo Scientific, Varioskan Flash Multiplate Reader) 475 nm ve 630 nm (arka plan) dalga boylarında ölçümü yapıldı. Normalleştirilmiş absorbans değerleri elde etmek için arka plan absorbansını sinyal absorbansından çıkararak elde edilen değerler hücre canlılığı hesaplamalarında kullanıldı. Hücre canlılık yüzdeleri kontrol grubu baz alınarak hesaplandı. Test farklı zamanlarda üç kez tekrar edildi. Sitotoksitenin yüzde canlılık üzerinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı;

$$\% \text{ Canlılık} = \left( \frac{\text{K2 vitamini içeren kuyucukların absorbans ortalaması}}{\text{pozitif kontrol kuyucuklarının absorbans ortalaması}} \right) \times 100$$

### 3.5.3. IC<sub>50</sub> Değerinin Hesaplanması

Farklı zamanlarda K2 vitamini uygulanan Saos-2 hücrelerinin sitotoksiste testi sonucu elde edilen canlılık absorbans değerleri kontrol değeri (K2 vitamini uygulanmayan) ile normalize edildi. Normalizasyon sonucu elde edilen absorbans değerleri Graphpad Prism 8 programı kullanılarak grafize edildi ve bu inkübasyon süreleri için elde edilen IC<sub>50</sub> (*Half-maximal inhibitory concentration*) değerleri hesaplandı. Böylece K2 vitamininin apoptotik etkilerinin araştırılacağı dozlar ve inkübasyon süreleri belirlendi.

### 3.6. Ko-Kültür Deney Sistemlerinin Oluşturulması

Hücre kültürü ile yapılan ko-kültür çalışmaları membranlı ve membransız olarak yapılabilmektedir. Çalışmada kullandığımız membranlı (indirekt) ko-kültür yöntemi, kültür ortamında kullanılan hücrelerin birbirleri ile hücre-hücre teması olmadan çözünür faktörlerin difüzyonu (parakrin) yoluyla etkileşimini sağlamaktadır (147) (Şekil 3.2). Daha çok adeziv karakter gösteren hücrelerde tercih edilmektedir.

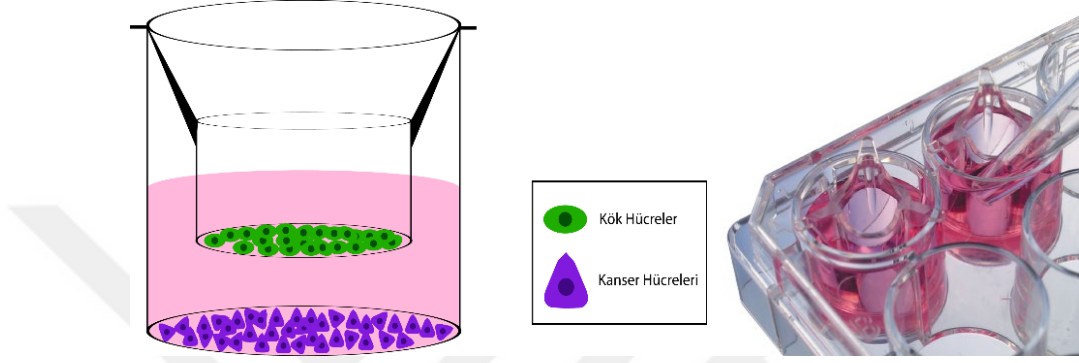
Membransız (direkt) ko-kültür yönteminde ise doğrudan hücre-hücre ve hücre-hücreler arası matris etkileşimi ve çözünür faktörler yoluyla sinyalleşme olmaktadır (148). Özellikle farklı adezyon karakteri gösteren hücrelerin ko-kültür çalışmalarında bu yöntem kolaylık sağlamaktadır. Tez çalışmamızda kullanılan her iki hücre tipinin de (Saos-2 ve MKH) flaska yapışma özelliği olduğu için ve kültür sonrası hücre ayrıştırma tekniklerini kullanımda karşılaşılabileceğimiz zorluklardan dolayı bu yöntem ko-kültür çalışmalarımızda tercih edilmemiştir. Tez çalışmamız için oluşturulan deney grupları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Oluşturulan deney grupları.

1	Saos-2 (Kontrol 1)
2	Saos-2 + K2 vitamini (25 µM)
3	Saos-2 + K2 vitamini (50 µM)
4	MKH (Kontrol 2)
5	MKH + K2 vitamini (25 µM)
6	MKH + K2 vitamini (50 µM)
7	Saos-2 + MKH (Kontrol 3)
8	Saos-2 + MKH + K2 vitamini (25 µM)
9	Saos-2 + MKH + K2 vitamini (50 µM)

T75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilen Saos-2 ve mezenkimal kök hücreleri kültür flaskının tabanını %80 kaplayınca tripsinizasyon işlemi yapılarak hücreler kaldırılıp sayımları yapıldı. 12 kuyucuklu kültür kaplarına Saos-2 hücreleri ( $1 \times 10^5$ ) ekildi. Saos-2 hücrelerinin üzerine hücrelerin birbirileri ile doğrudan temasını engelleyecek şekilde 1 µm por çapında ThinCert<sup>TM</sup> hücre kültürü membranları (Geriner Bio-One, Avusturya) dikkatli bir şekilde yerleştirildikten sonra, membranların üzerine 1:1 oranında MKH'ler ( $1 \times 10^5$ ) ekildi (Şekil 3.2) (Kontrol 3). Ayrıca Saos-2 (Kontrol 1) ve MKH (Kontrol 2) kuyucukları oluşturuldu. Canlılık testi sonrası belirlenen optimum dozlarda hazırlanan K2 vitamini içeren

besiyerleri ilgili kuyucuklara (2 ml) eklenerek %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37 °C'de 48 saat boyunca ko-kültüre edildi. Plaklar invert mikroskop kullanılarak günlük olarak canlılık, çoğalma, apoptoz ve enfeksiyon açısından değerlendirildi.

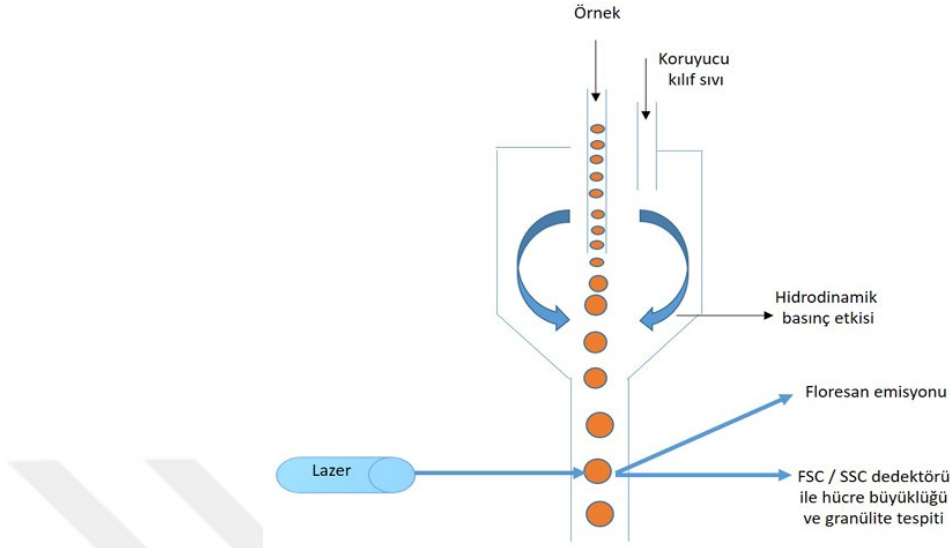


**Şekil 3.2.** Saos-2 hücreleri ile Mezenkimal Kök Hücrelerinin ThinCert™ hücre kültür membranları kullanılarak oluşturulan ko-kültürü.

### 3.7. Ko-Kültür Deneyleri Sonrası Yapılan Analizler

#### 3.7.1. Akım (Flow) Sitometri ile Annexin-V/PI Yöntemi

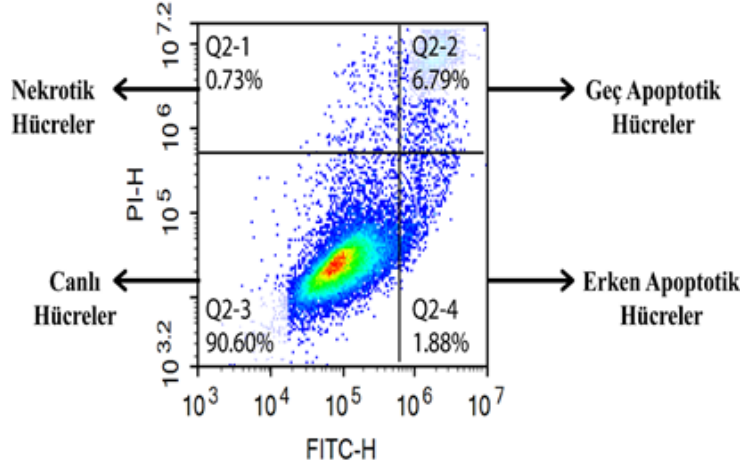
Akım sitometri, süspansiyon halindeki hücre ya da partiküllerin lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilerek hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyallerin toplanarak analiz edilmesi prensibine dayanır. Bunun için hedeflenen yapı ya da hücre özel bir boya veya floresan madde ile işaretli bir antikor kullanılarak işaretlenir (149). Floresan ile işaretlenmiş olan hücreler hava basıncı ile PBS veya tampon çözelti içinden geçirilir. Sıvı akışının hızlı olması yüksek basınca sebep olur ve hücrelerin cam veya kuartzdan yapılmış akış kabineye getirilmesini sağlar. Bu kabin süspansiyon halindeki hücrelerin lazer kaynağından sıra ile geçmesini sağlar (Şekil 3.3). Lazer ışığının etkisi ile hücreler floresan boyalara çarparak aktive olur ve yayılım yapar. Yayılımın etkisi filtre ve dedektörler sayesinde tespit edilir, elektrik sinyallerine çevrilerek amplifiye edilen veriler bilgisayara iletilir (150).



**Şekil 3.3.** Akım sitometri cihazının şematik gösterimi (150).

Akım sitometri yöntemi apoptozis, proliferasyon, hücre yapısı analizi ve hücre sayımı gibi birçok çalışmada sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem sayesinde hem hücrede nükleer değişiklik hem de membranda değişiklikler oluşurken bile apoptozis ölçülebilmektedir. Apoptozis meydana geldiğinde normalde hücre membranının iç kısmında yer alan fosfatidilserin membranın dış kısmına göç eder. Fosfatidilserine bağlanan Annexin V ile hücrelerdeki apoptozis belirlenir. Ayrıca hücrelerin ölü/canlı olduğunu ayırt edebilmek için PI boyama yapılır (151).

Apoptozu gösterebilmek için Annexin-V/PI kiti (640914, Biolegend) kullanıldı. Analiz edilen hücreler özelliklerine göre farklı alanlara dağılma gösterir. Canlı hücreler Annexin V (-) / PI (-), nekrotik hücreler ise Annexin V (-) / PI (+), erken apoptotik hücreler Annexin V (+) / PI (-) ve geç apoptotik hücreler Annexin V (+) / PI (+) boyanma gösterir (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4.** Akım sitometri cihazında apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi.

Kemik iliği MKH'lerin ve K2 vitamininin, Saos-2 hücreleri sağkalımı üzerindeki etkisini göstermek amacıyla akım sitometri ile apoptoz tayini Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi / Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı. 48 saatlik ko-kültürün sonunda ilgili kuyucuklardaki membranlar uzaklaştırılarak Saos-2 hücreleri tripsinize edildi ve 1.5 ml'lik ependorflarda 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşturulan hücre peleti üzerine kit içinde hazır bulunan binding buffer (bağlanma tamponu) eklendi. Üzerine 5 µl Annexin V-FITC eklenip vortekslendikten sonra oda ısısında, karanlıkta 10 dakika inkübe edildi. Ardından 10 µl PI (propidyum iyodür) eklenip vortekslendikten sonra oda ısısında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi ve üzerine binding buffer eklenerek akım sitometre cihazında analiz edildi.

### 3.7.2. Spektrofotometri ile Enzim (ALP) Aktivitesi Tayini

Kemik dokusu hücrelerinden olan osteoblastlar, tip 1 kollajen lifleri ve matriks proteinleri sentezleyerek kalsifiye olmamış osteoid dokuyu oluştururlar. Osteoblastlar granüllü endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi yönünden zengindirler. Ayrıca osteonektin, osteokalsin, glikoprotein, glikozaminoglikan ve alkalin fosfataz enzimi salgırlar. Osteoid doku kalsifiye olunca osteoblastların aktivitesi azalır ve osteoblastlardan osteositler oluşur. Alkalin fosfataz enzimi aracılığı ile kalsiyum ve fosfor

iyonları birleşerek kalsiyum fosfat moleküllerini meydana getirir. Bu moleküllerin hidroksiapatit denilen iğne şeklinde kristaller halinde matrikse çökmesiyle matriks kalsifikasyonu oluşur (152). Bu sebeple, ALP aktivitesi hücrelerde mineralizasyon ve dolayısıyla kalsifikasyon ile ilişkilidir.

Vücudumuzda kas-iskelet sisteminden başka sindirim sisteminde de fonksiyon gösteren ALP enziminin aktivitesindeki değişiklikler kemik dokusu ve karaciğer metabolizmasına ilişkin bilgiler verir (153).

Tablo 3.2’de gösterilen çalışma gruplarına ait besiyerlerindeki ALP aktivitesi ölçümü için kit (Abcam, Alkaline Phosphatase Assay Kit-Colorimetric, Cat No: ab83369) kullanıldı. Öncelikle 0, 4, 8, 12, 16 ve 20 nmol/120µL konsantrasyonlarında pNPP standartları hazırlandı ve üzerlerine 10 µL ALP enzim solüsyonu eklendi. Her bir çalışma grubuna ait örnekten 80 µL alınıp 96 kuyucuklu plaklara transfer edildi. Örnek kuyulara 5 mM konsantrasyonda hazırlanan pNPP solüsyonundan 50 µL eklenerek 25 °C’de 60 dk ışıktan koruyarak inkübe edildi. ALP aktivitesini sonlandırmak için bütün kuyucuklara 20 µL durdurma solüsyonu eklenerek 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak ölçümü yapıldı. Kontrol gruplarına ait (Kontrol 1, Kontrol 2, Kontrol 3) absorbanslar ile standardize edilerek sonuçlar verildi.

### **3.7.3. ELİSA Yöntemi ile Sitokin (IL-6 ve TGF-β1) Analizi**

Kemik iliği MKH ve Saos-2 hücrelerinin 48 saatlik ko-kültürünün ardından membranlar uzaklaştırıldı. Sitokinlerin analizi için besiyerleri her bir grup için ayrı ayrı toplanarak 2000 rpm’de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar 0,2 µm’lik filtreden geçirilerek -80 °C’de derin dondurucuda saklandı. Ko-kültür sonucu elde edilen süpernatantlardan interlökin-6 (IL-6) ve transforming growth factor-β1 (TGF-β1) analizi ELİSA yöntemi ile yapıldı ve gruplar arasında farklılaşan sitokin profilleri karşılaştırıldı.

ELİSA yöntemine başlamadan önce -80 °C’de saklanan hücre kültürü süpernatantları ve +4 °C’de saklanan kit içerikleri 30 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Sitokin analizi için ELİSA kitleri (CK-bio-12137, CK-bio-13772) kullanıldı. 96

kuyucuklu plakların 1. sütununa 50 µl standart, 50 µl streptomycin-HRP eklendi. Diğer sütunlara ise 40 µl süpernatant, 10 µl anti-TGF-β1 antikor (Biotinlenmiş Antikor) ve 50 µl streptavidin-HRP eklenerek 37 °C’de 60 dk inkübe edildi. Süre sonunda kuyular ters çevrilerek boşaltıldı. Kuyuların tamamen boşaltılması amacıyla plaklar hafifçe kurutma kâğıdı üzerine vurularak örnekler uzaklaştırıldı. Kuyular yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı. Plak tabanında kalan sıvı kurutma kâğıdı vasıtasıyla uzaklaştırıldı. Yıkamanın ardından boşaltılan kuyucukların her birine 50 µl chromogen solution A, 50 µl chromogen solution B eklenerek karanlık ortamda 37 °C’de 15 dk inkübe edildi. Kör kuyulara ise sadece chromogen solution A ve chromogen solution B eklendi. Reaksiyonun sonlandırılması için kuyucukların her birine 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek 10 dakika içinde 450 nm dalga boyunda ELİSA okuyucusunda absorbanlar ölçüldü. Tüm işlemler her kuyuya eşit solüsyon veren mikropipetör kullanılarak yapıldı. Standartların absorbanları kullanılarak standart eğri grafiği çizildi ve hücre kültürü süpernatant örneklerinin sonuçları karşılaştırıldı.

#### **3.7.4. İmmünohistokimya Analizleri**

Hücre içinde bulunan bazı enzimlerin ya da makromoleküllerin lokalizasyonlarını incelemeye yardımcı olan immünohistokimya yönteminde sistem, incelenecek olan bir makromoleküle karşı geliştirilmiş antikorun ortaya konulmasıdır. Spesifik antijen-antikor ilişkilerinden yararlanılarak moleküllerin hücre içindeki yerlerinin belirlenmesi ve görülebilir hale gelmesi amaçlanmaktadır. Bu anlamda Wnt sinyal yolağının anahtar düzenleyicilerinden biri olan β-katenin’in hücre içerisindeki yerinin ve sinyal yolağının aktivasyonunun çalışma gruplarında farklı olup olmadığının belirlenmesi için monoklonal Anti β-katenin antikor (sc-7963, Santa Cruz) kullanıldı.

12 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen Saos-2 hücreleri, MKH’ler ile ko-kültüre edildi. İmmün boyama için her kuyucuğun tabanına yuvarlak lameller (15x15mm, Nest) yerleştirildi. 48 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkama yapıldı. Hücreler %4’lük formaldehit ile 10 dakika boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonrası %10 FBS, %1 Boveine Serum Albumin (BSA), %0.1 Tween ve 0.3 M glisin içeren PBS ile oda sıcaklığında bir saat bloklama yapıldı. Primer antikor %1 BSA ve %0.1 Tween içeren PBS ile 1/100 oranında dilue edildi. Hücreler bir gece boyunca 4 °C’de ve nemli

ortamda primer antikor eklenerek inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün PBS ile üç kez yıkama yapıldıktan sonra sekonder antikor (poliklonal, Anti-Rabbit IgG H&L (HRP); Abcam, MA, ABD) eklendi ve oda sıcaklığında bir saat inkübasyona bırakıldı. DAB substrat kitinde bulunan (Abcam, Cambridge, MA, ABD) DAB kromojen ve DAB substrat karışımı protokole göre hazırlandı. PBS ile yıkama sonrası sekonder antikor uzaklaştırılarak DAB (3,3'-diaminobenzidine) ile boyandı. Boyama sonrası PBS ile yeniden yıkama yapıldı. Artan alkol serilerinden geçirilen preparatlar ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı. İmmunositokimyasal değerlendirmeler ışık mikroskopunda (Olympus, BX43, Japonya) görüntüledi.

### **3.8. İstatistiksel Analiz**

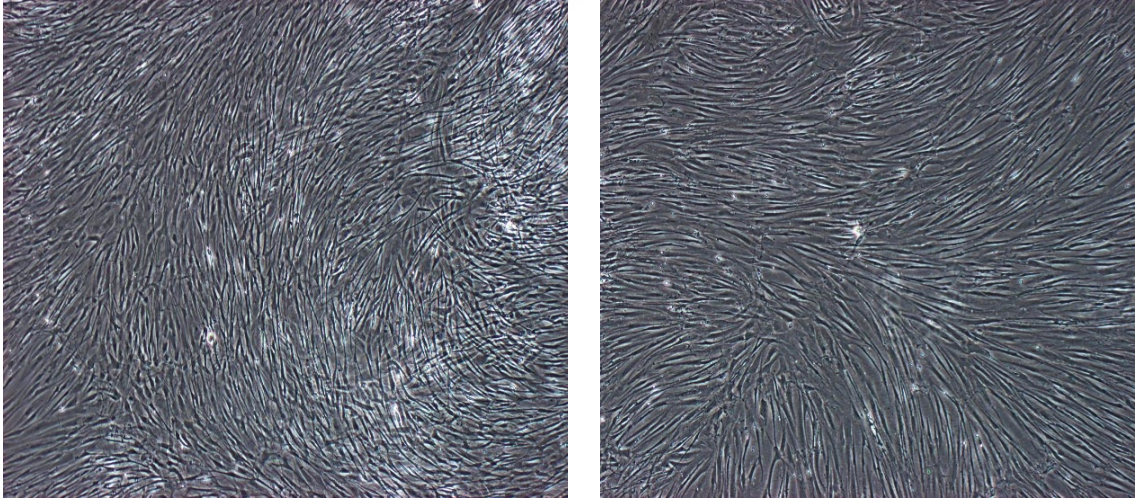
İstatistiksel analiz, SPSS25 paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testine göre yapıldıktan sonra verilerin normal dağıldığı gözlemlendi. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Karşılaştırma verileri ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verildi. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edildi. Analizler her bir örnek ve ölçüm için en az üç kez gerçekleştirilen deneyler sonucu elde edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve Karakterizasyonu

#### 4.1.1. Morfolojik Özellikleri

Uluslararası Hücre & Gen Terapi Derneği (ISCT-International Society for Cell & Gene Therapy) mezenkimal kök hücreleri; kültür ortamında plastik yüzeye yapışan, spesifik yüzey belirteçlerine sahip olan ve osteosit, adiposit, kondrosit soylarına farklılaşabilen hücreler olarak tanımlamıştır. İnsan kemik iliği kökenli MKH'lerin hücre kültürü görüntüleri Olympus CKX41 marka invert mikroskopla çekildi. Sağlıklı vericilere ait MKH'lerin invert mikroskop ile çekilen görüntülerinde iğsi fibroblast benzeri oldukları ve adeziv özellik gösterdikleri görüldü (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Sağlıklı vericilere ait MKH'lerin invert mikroskop görüntüleri x40 (sol) ve x100 (sağ) büyütme.

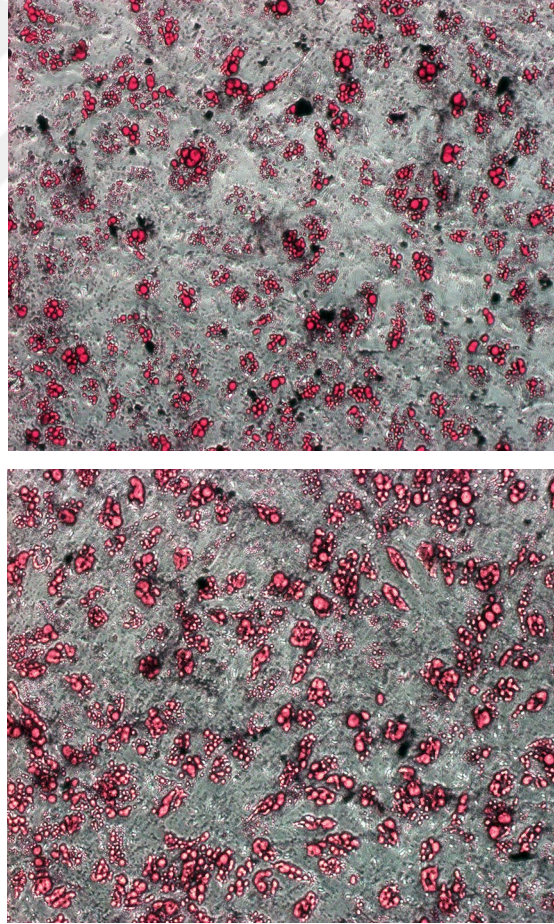
#### 4.1.2. Farklılaşma Testleri

Çalışmada kemik iliği kökenli MKH'lerin immünojenotipik karakterizasyonunda adipojenik ve osteojenik yönde farklılaşma kapasiteleri analiz edildi. T25'lik flasklarda

çoğaltılan hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları morfolojik olarak analiz edildi.

### Adipojenik Farklılaşma

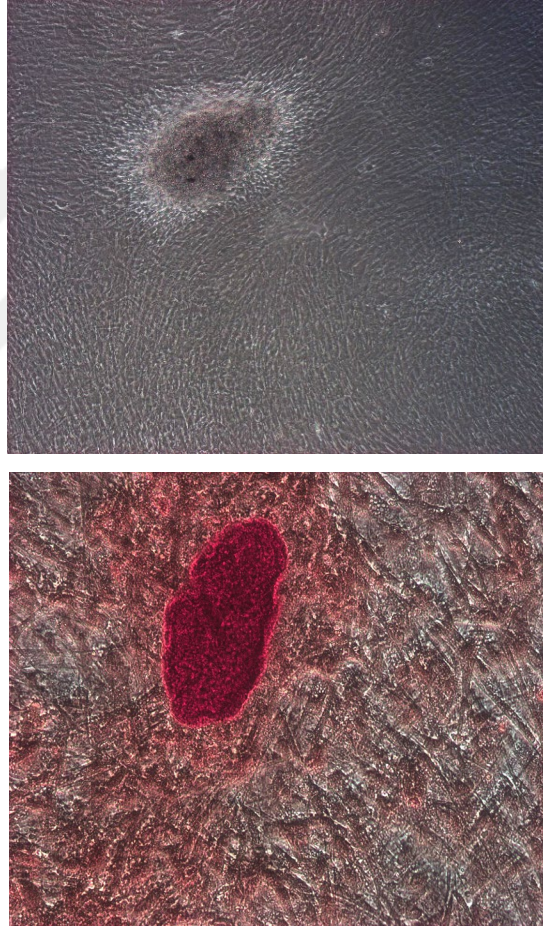
Sağlıklı vericilerin kemik iliklerinden elde edilen MKH'lerin adipojenik hücre soylarına farklılaşmalarını göstermek için MesenCult Adipogenic Differentiation Supplement-Human (Stemcell) kiti kullanıldı. Üç hafta sonra MKH'lerin sitoplazmalarında biriken yağ damlacıklarını göstermek için Oil Red O boyama yapıldı. Olympus CKX41 marka invert mikroskop altında görüntülendi (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Sağlıklı vericilere ait MKH'lerin Oil Red O boyası ile boyanan yağ damlacıkları görüntüleri, x100 büyütme.

### Osteojenik Farklılaşma

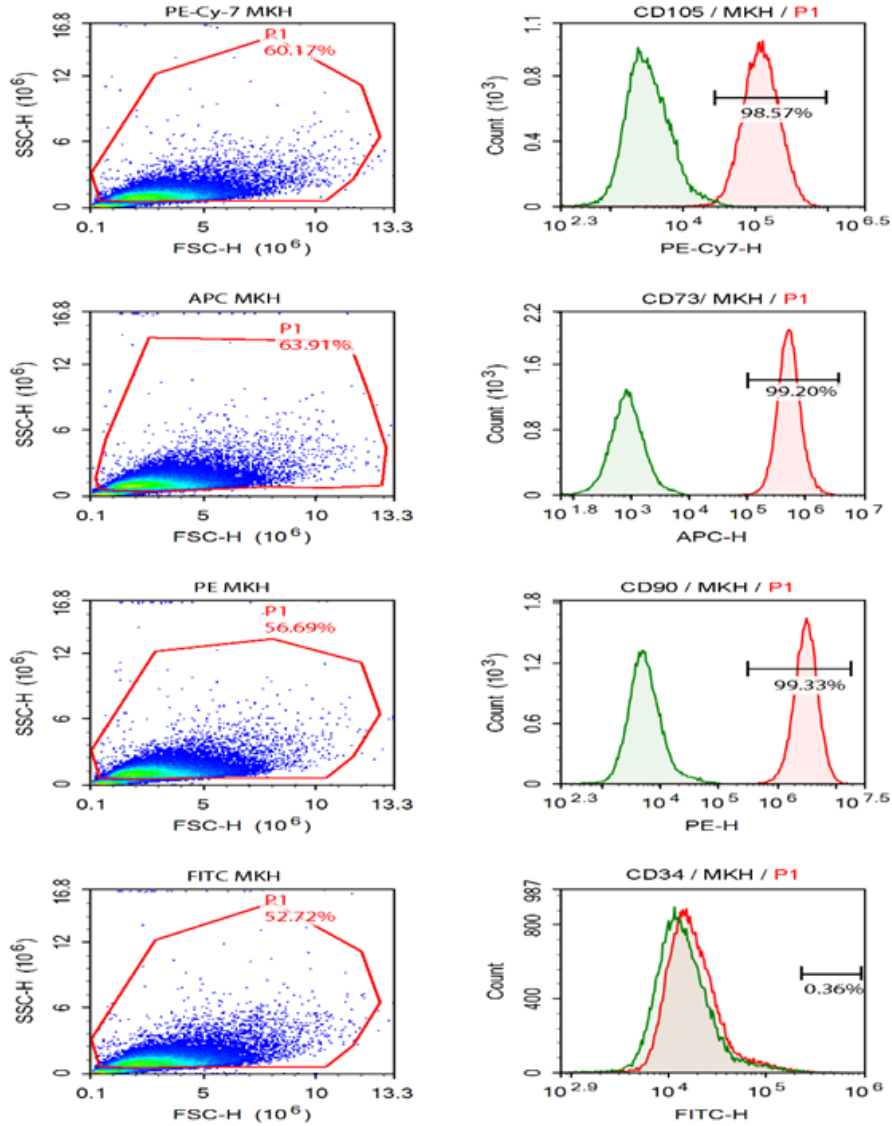
Sağlıklı vericilerin kemik iliklerinden elde edilen MKH'lerin osteojenik hücre soylarına farklılaşmalarını göstermek için Osteogenic Stimulatory Supplements-Human (Stemcell) kullanıldı. Üç hafta sonra oluşan kalsiyum depozitlerini görüntülemek için Alizarin red boyası kullanılarak mineralize kemik yapıları gözlemlendi. Olympus CKX41 marka invert mikroskop altında görüntüledi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Sağlıklı vericilerin kemik hücrelerine farklılaşmış MKH'leri, x40 (üst), sağlıklı vericilerin kemik hücrelerine farklılaşmış MKH'lerinin Alizarin red ile boyanan kalsiyum birikintileri (alt) x100 büyütme.

### 4.1.3. Akım (Flow) Sitometri ile İmmünojenotip Analizi

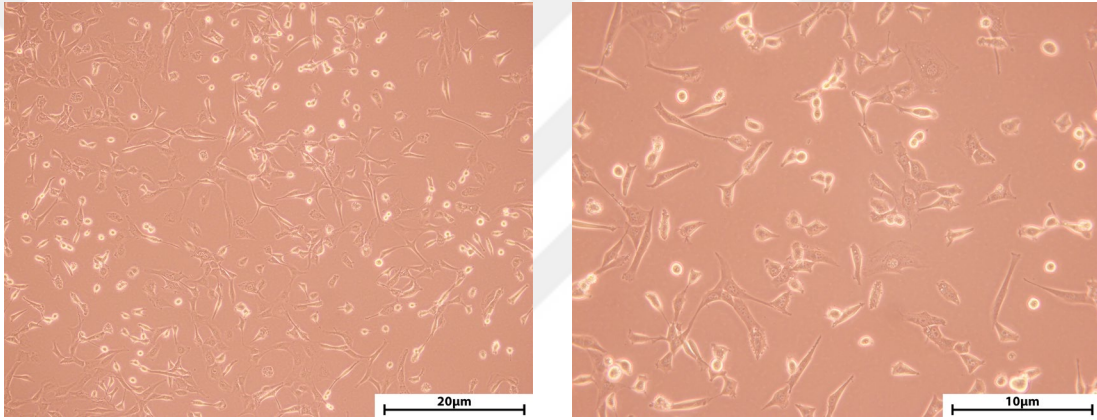
Sağlıklı vericilere ait mezenkimal kök hücrelerinin MKH'ye özgü yüzey belirteçlerinden CD105, CD73, CD90 belirteçlerini ifade ettiği gözlenirken, hematopoetik kök hücre belirteci olan CD34'ü ifade etmediği (<%1) gözlemlendi. Akım sitometri analizi sonucu elde edilen bulgular immünojenotip açısından bu hücrelerin MKH olduklarını doğruladı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. İnsan kemik iliğinden izole edilmiş MKH'lerin immünojenotipik özelliklerinin akım sitometrik analizi.

## 4.2. İnsan Osteosarkom Hücre Hattı (Saos-2) Kültürü ve K2 Vitamini Dozunun Belirlenmesi

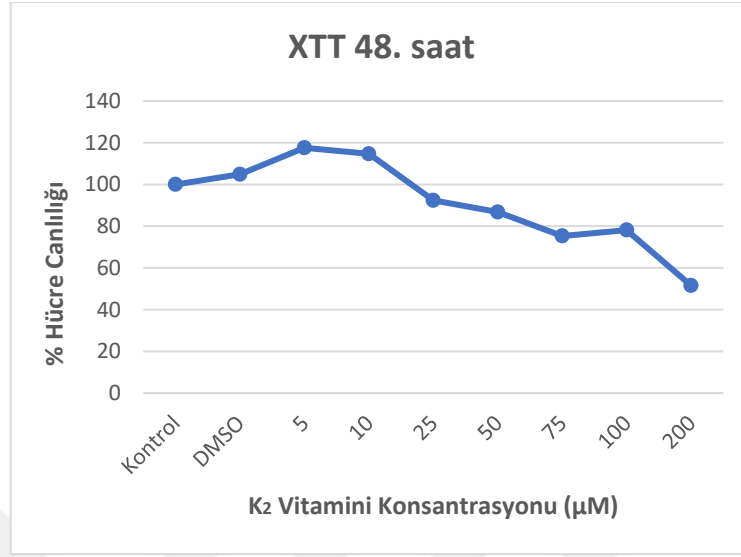
Saos-2 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri incelendiğinde kültür kabının yüzeyine yapıştıkları gözlemlendi. Saos-2 hücrelerinin iğsi yapılar oluşturmadığı ve MKH'lere nazaran daha oval bir yapıda olduğu görüldü. Olympus CKX41 marka invert mikroskop altında görüntülendi (Şekil 4.5).



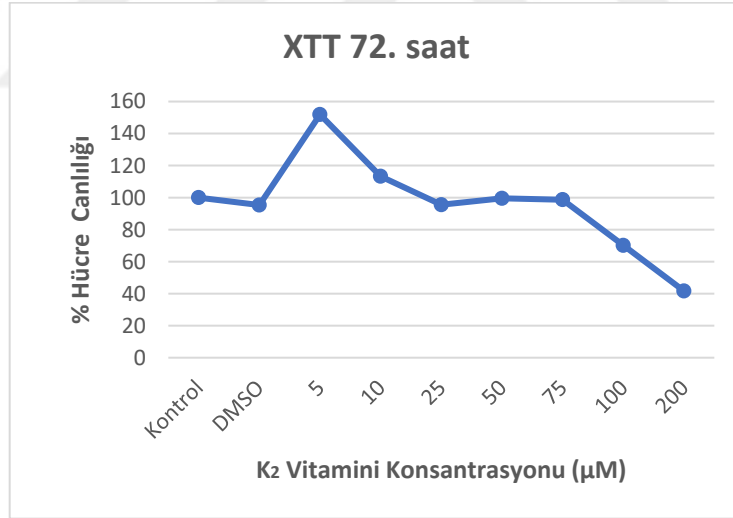
Şekil 4.5. Saos-2 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri, x100 (sol) ve x200 (sağ) büyütme.

### 4.2.1. K2 Vitamini Saos-2 Hücreleri Üzerine Etkisinin XTT Yöntemi ile Belirlenmesi

Saos-2 hücrelerine 48 ve 72 saat boyunca K2 vitamini (5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 200 µM) uygulandı. K2 vitamininin Saos-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri XTT yöntemiyle belirlenmiş olup 48 ve 72 saatlik maruziyet sonuçları Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre kat artışı olarak hesaplandı.



**Şekil 4.6.** K2 vitamininin Saos-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin XTT testi ile değerlendirme sonuçları (48. saat).



**Şekil 4.7.** K2 vitamininin Saos-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin XTT testi ile değerlendirme sonuçları (72. saat).

DMSO kontrol gruplarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmediğinden bundan sonraki deneyler için bu grup çalışılmaya dahil edilmemiştir.

Saos-2 hücreleri 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda K2 vitaminine maruz bırakıldı ve sitotoksosite XTT testi ile belirlendi. Ardından, her inkübasyon süresi (48 ve 72 saat) için ayrı ayrı IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** K2 vitamininin Saos-2 hücreleri için hesaplanan IC<sub>50</sub> değerleri.

Zaman	IC <sub>50</sub> (µM)
48. saat	50.62
72. saat	37.54

Bu değerler ışığında K2 vitamininin Saos-2 hücrelerine uygulanacak konsantrasyonu 25 µM ve 50 µM (48. saat) olarak belirlendi.

### **4.3. Ko-Kültür Deneyleri Sonrası Yapılan Analizlerin Bulguları**

#### **4.3.1. Akım (Flow) Sitometri ile Annexin-V/PI Yöntemi Bulguları**

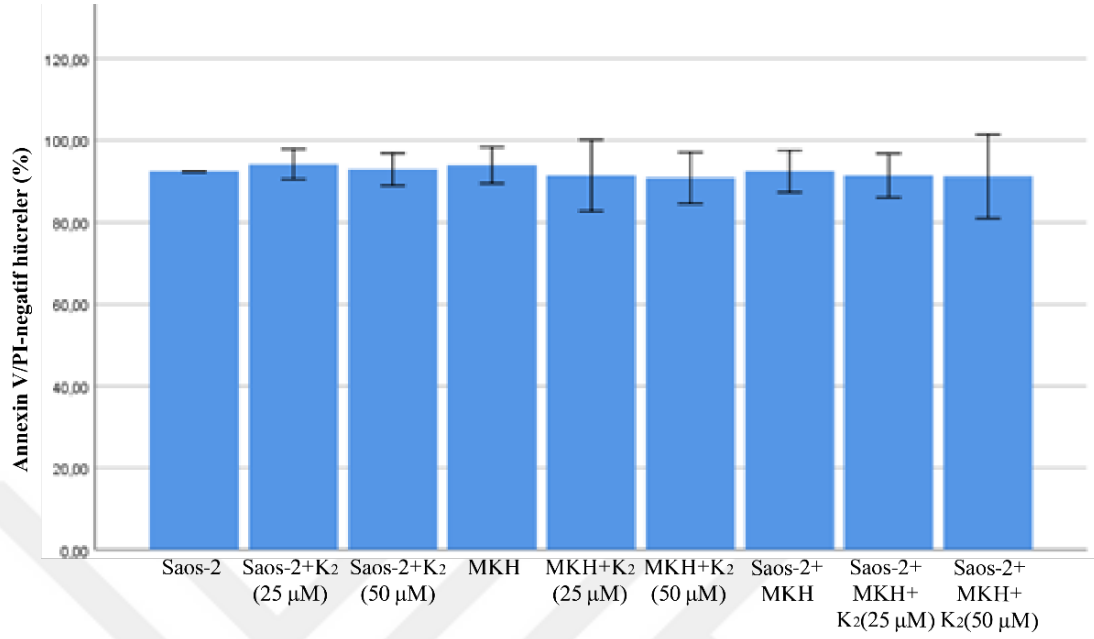
Çalışmamızda sağlıklı vericilerin MKH'lerinin Saos-2 hücreleri ile ko-kültürü membran kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol 1, Kontrol 2, Kontrol 3 ve K2 vitamini uygulanan (25 µM ve 50 µM) gruplar ko-kültüre edildi. 48 saat sonundaki apoptozis oranları akım sitometri ile analiz edildi. Değerlendirmeler 'Geç Apoptotik Hücre Oranı (2. Bölge)', 'Canlı Hücre Oranı (3. bölge)', 'Erken Apoptotik Hücre Oranı (4. Bölge)' ve 'Toplam Apoptotik Hücre Oranları (2., 4. bölgeler)' baz alınarak yapıldı.

Apoptozu tayin etmek için uygulanan Annexin V/PI yöntemi sonucu elde edilen değerler ile canlı hücreler, erken apoptotik hücreler, geç apoptotik hücreler ve toplam apoptotik hücrelerin yüzdelerini gösteren grafikler istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Gruplar arasındaki apoptotik farklılıkları belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

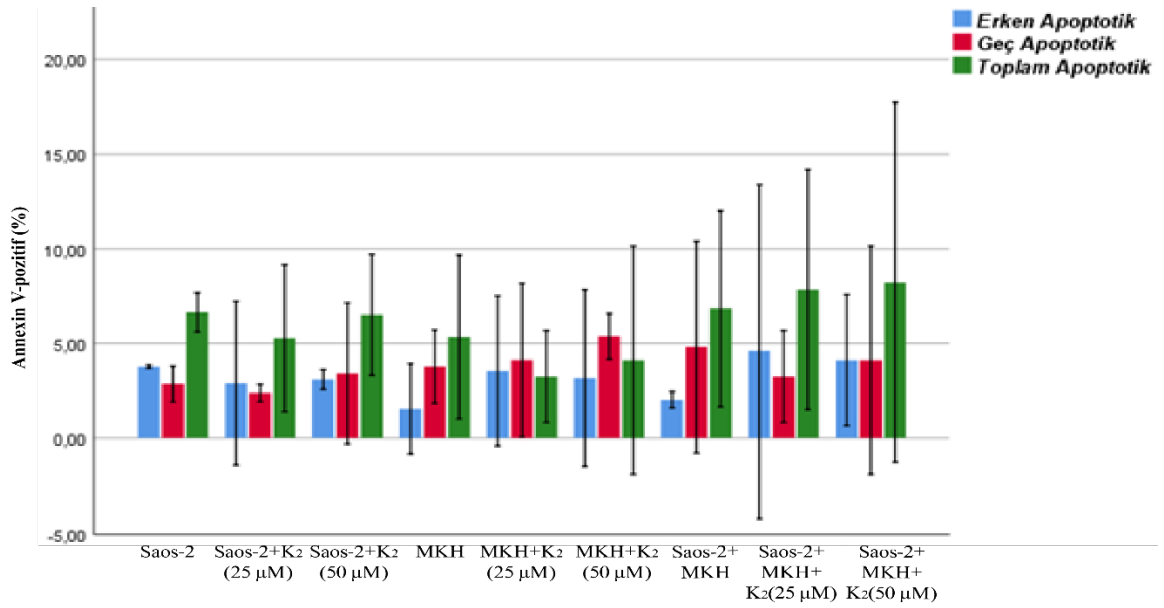
		Sum Squares	of df	Mean Square	F	Sig.
Canlı	Between Groups	22,952	8	2,869	,318	,939
	Within Groups	81,212	9	9,024		
	Total	104,164	17			
Erken	Between Groups	14,879	8	1,860	,442	,868
	Within Groups	37,844	9	4,205		
	Total	52,723	17			
Geç	Between Groups	14,093	8	1,762	,575	,776
	Within Groups	27,589	9	3,065		
	Total	41,682	17			
Toplam	Between Groups	43,722	8	5,465	,804	,615
	Within Groups	61,164	9	6,796		
	Total	104,886	17			

Elde edilen verilere göre canlı hücre oranlarının gruplar arası karşılaştırılmaları sonucu istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ( $p>0.05$ ) gözlenmedi (Şekil 4.8).



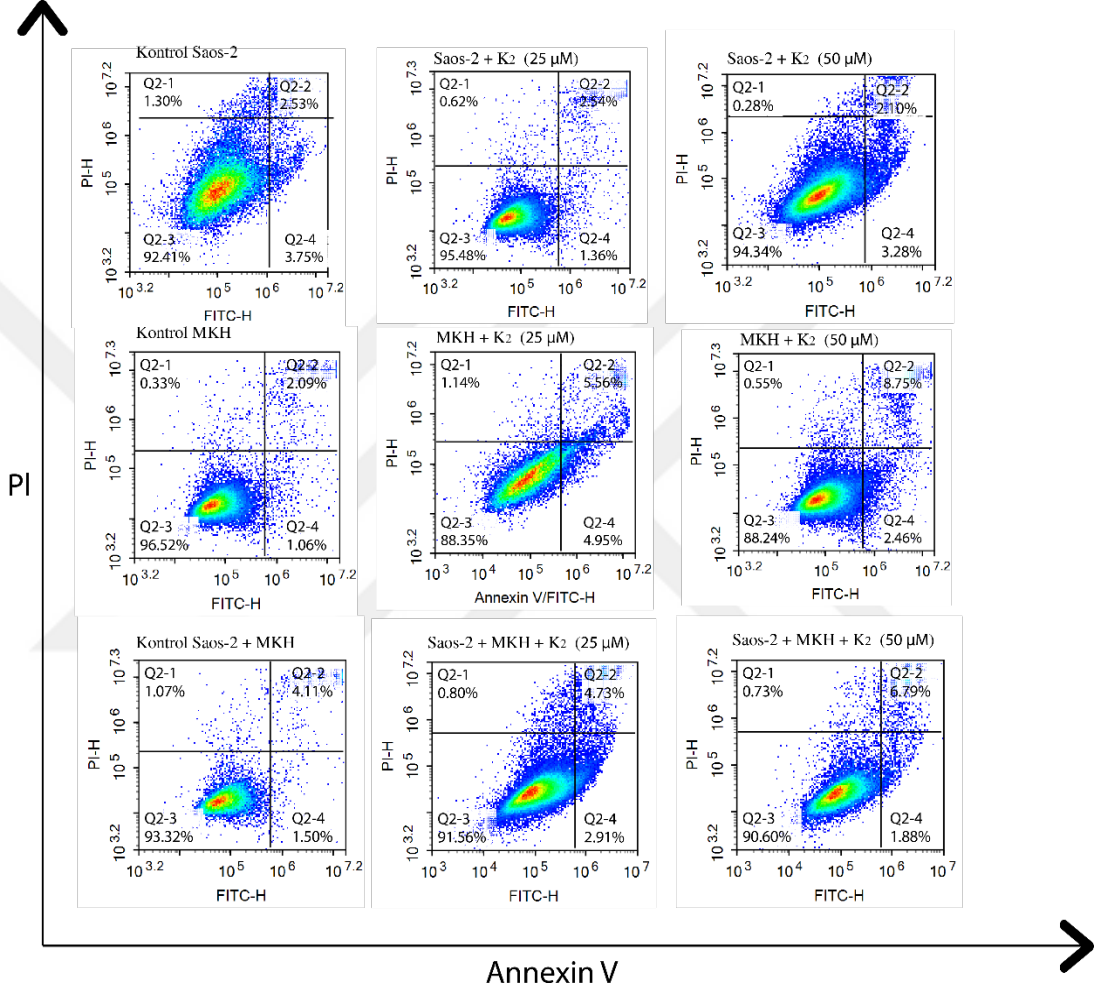
Şekil 4.8. Çalışma gruplarına ait 48. saatteki canlı hücre oranları.

Elde edilen verilere göre erken, geç ve toplam apoptotik hücre oranlarının gruplar arası karşılaştırılmaları sonucu istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ( $p > 0.05$ ) gözlenmedi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Çalışma gruplarına ait 48. saatteki apoptotik hücre oranları.

Bu sonuçlara göre Saos-2 hücreleri üzerinde hem MKH'lerin hem de uygulanan K2 vitamini dozlarının apoptozda belirgin bir etkisinin olmadığını gözlemledik.

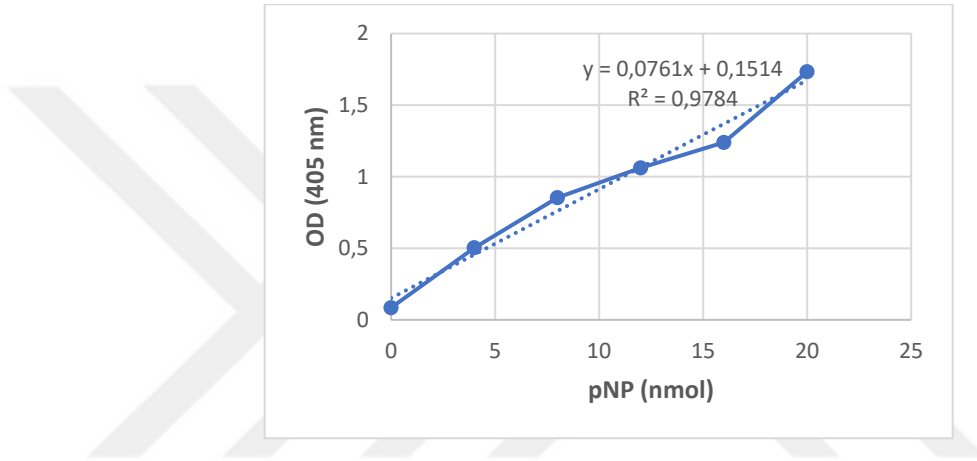


Şekil 4.10. Anneksin V/PI yöntemi ile apoptoz tayini sonuçları.

#### 4.3.2. Spektrofotometri ile Enzim (ALP) Aktivitesi Sonuçları

Kemik iliği MKH ve K2 vitamininin, Saos-2 hücrelerinde ALP aktivitesi üzerine olan etkilerini değerlendirmek için, 48 saat boyunca K2 vitaminin farklı dozları ve MKH ile muamele edilen Saos-2 hücrelerinin besiyerlerinde ALP kit protokolüne göre ölçüm yapıldı.

Kemik mineralizasyonunda ve kemik hücrelerinde aktif rol oynayan ALP enziminin, çalışma gruplarına ait hücrelerdeki aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. İlk olarak ALP enziminin bilinen konsantrasyonlardaki standart solüsyonları kullanılarak standart eğrisi (OD<sub>405</sub>/konsantrasyon) oluşturuldu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. pNP (p-Nitrofenol) standart kalibrasyon grafiği

Standart eğrisi formülüne göre çalışma gruplarına ait OD<sub>405</sub> değerlerine karşılık gelen pNP konsantrasyonları (nmol) hesaplandı. Sonuçlar K2 vitamini içermeyen ortamların kontrol olarak kullanılması ile normalize edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda çalışma gruplarının ALP aktiviteleri kontrol grupları ile kıyaslandığında azalma gözlenirse de (Şekil 4.12) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık değildir (p>0.05, Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** ALP enziminin gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

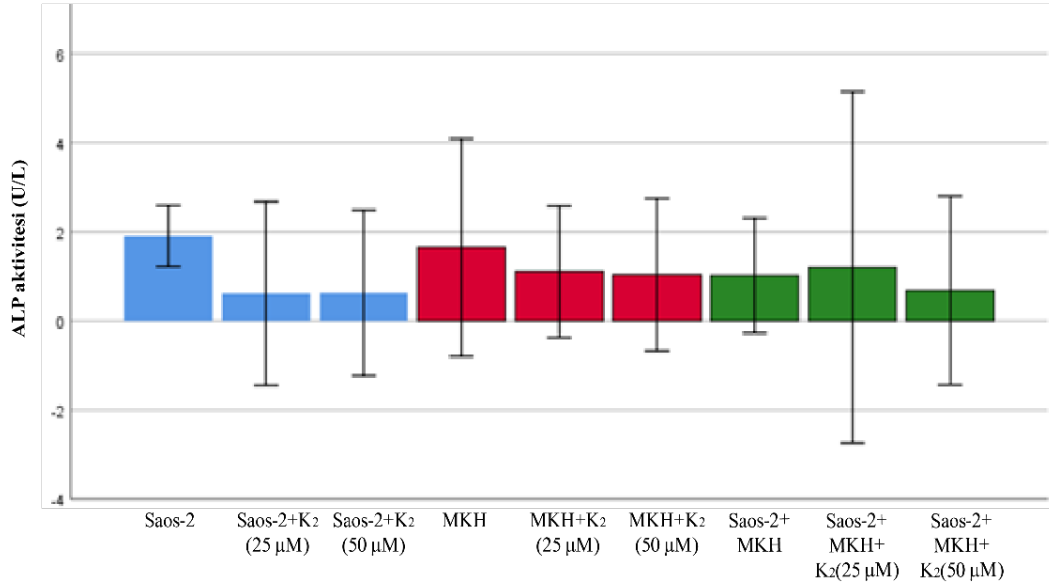
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,419	2	2,209	3,244	,087
Within Groups	6,129	9	,681		
Total	10,547	11			

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,903	2	,452	,489	,628
Within Groups	8,305	9	,923		
Total	9,208	11			

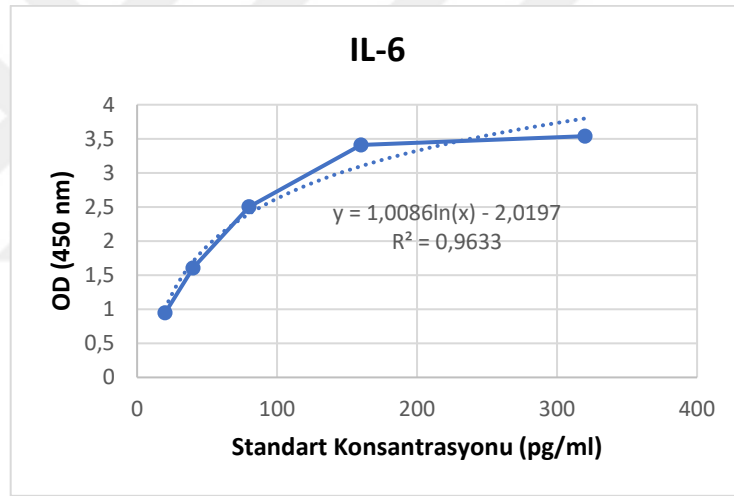
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,555	2	,278	,154	,860
Within Groups	16,264	9	1,807		
Total	16,819	11			



**Şekil 4.12.** Çalışma gruplarına ait 48. saatteki ALP konsantrasyonları.

### 4.3.3. ELİSA Yöntemi ile Sitokin (IL-6 ve TGF-β1) Tayini Bulguları

Ko-kültür deney sistemlerinin oluşturulmasıyla ortamda yer alan MKH'lerin, Saos-2 hücreleri üzerindeki parakrin etkileri araştırıldı. Oluşturulan gruplarda, MKH'lerden salınan sitokinler (IL-6 ve TGF-β1) ve K2 vitamininin Saos-2 hücreleri üzerindeki etkileri toplanan medyumlarda ELISA yöntemiyle araştırıldı. IL-6 sitokininin bilinen konsantrasyonlardaki standart solüsyonları kullanılarak ELİSA yöntemi sonucu IL-6 standart eğrisi (OD<sub>450</sub>/konsantrasyon) oluşturuldu (Şekil 4.13).

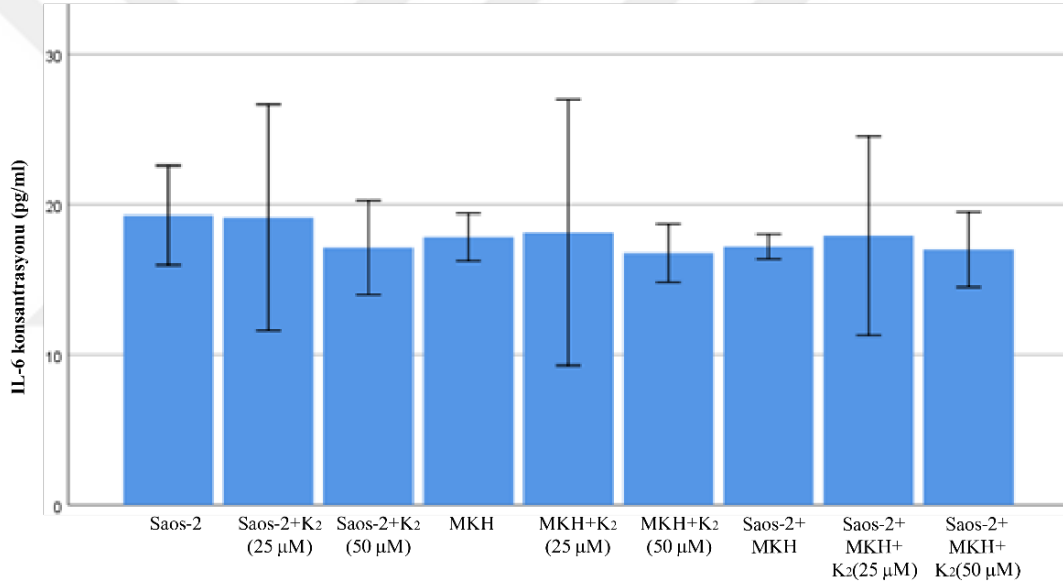


Şekil 4.13. IL-6 standart grafiği

Standart eğrisi formülüne göre çalışma gruplarına ait OD<sub>450</sub> değerlerine karşılık gelen IL-6 konsantrasyonları (pg/ml) hesaplandı ve gruplar arasında IL-6 sitokini açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığı gözlemlendi ( $p > 0.05$ , Tablo 4.4, Şekil 4.14).

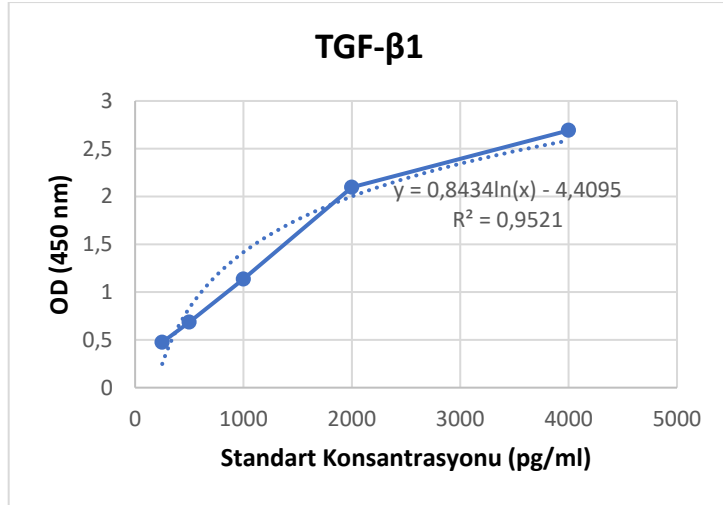
**Tablo 4.4.** IL-6'nın gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39,995	8	4,999	,846	,568
Within Groups	266,010	45	5,911		
Total	306,006	53			



**Şekil 4.14.** Çalışma gruplarına ait 48. saatteki IL-6 konsantrasyonları.

TGF- $\beta$ 1 sitokininin bilinen konsantrasyonlardaki standart solüsyonları kullanılarak ELİSA yöntemi sonucu TGF- $\beta$ 1 standart eğrisi (OD450/konsantrasyon) oluşturuldu (Şekil 4.15).

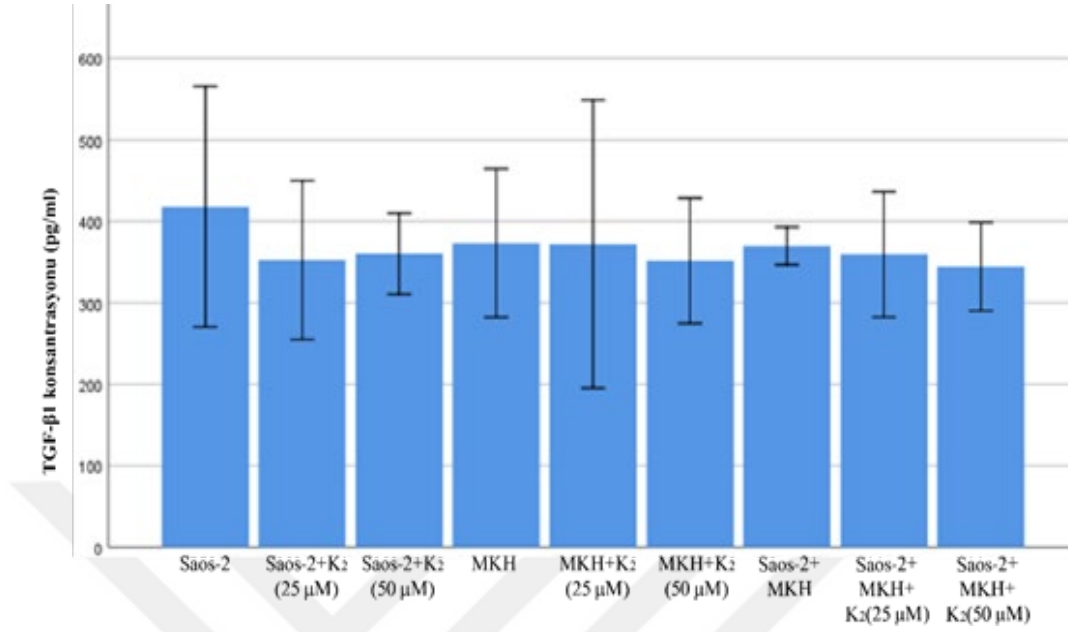


Şekil 4.15. TGF-β1 standart grafiği

Standart eğrisi formülüne göre çalışma gruplarına ait OD<sub>450</sub> değerlerine karşılık gelen TGF-β1 konsantrasyonları (pg/ml) hesaplandı ve gruplar arasında TGF-β1 sitokini açısından anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlendi ( $p > 0,05$ , Tablo 4.5, Şekil 4.16).

**Tablo 4.5.** TGF-β1'in gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22375,998	8	2797,000	1,136	,358
Within Groups	110755,076	45	2461,224		
Total	133131,074	53			

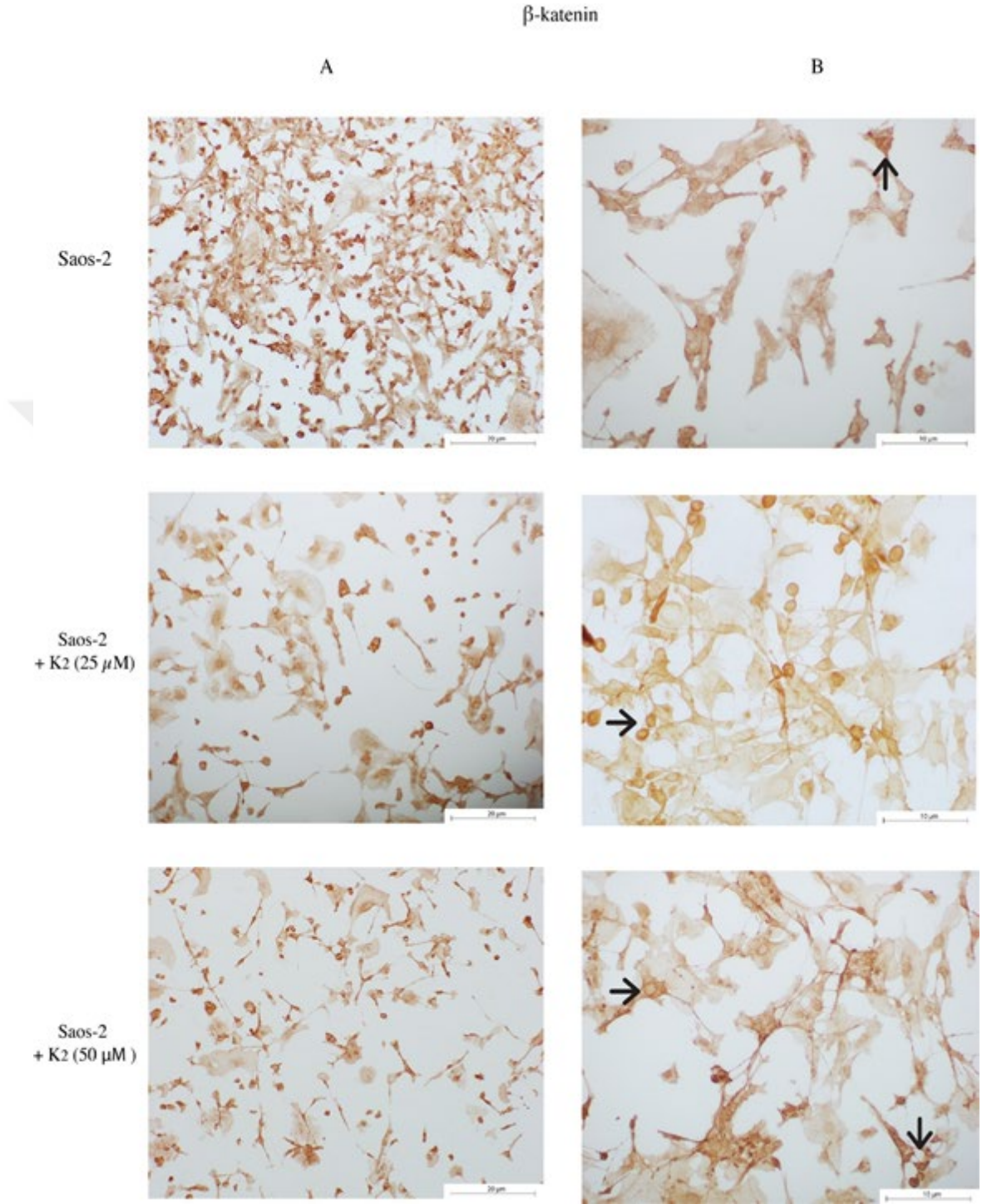


**Şekil 4.16.** Çalışma gruplarına ait 48. saatteki TGF-β1 konsantrasyonları.

#### 4.3.4. İmmünohistokimya Yöntemi Bulguları

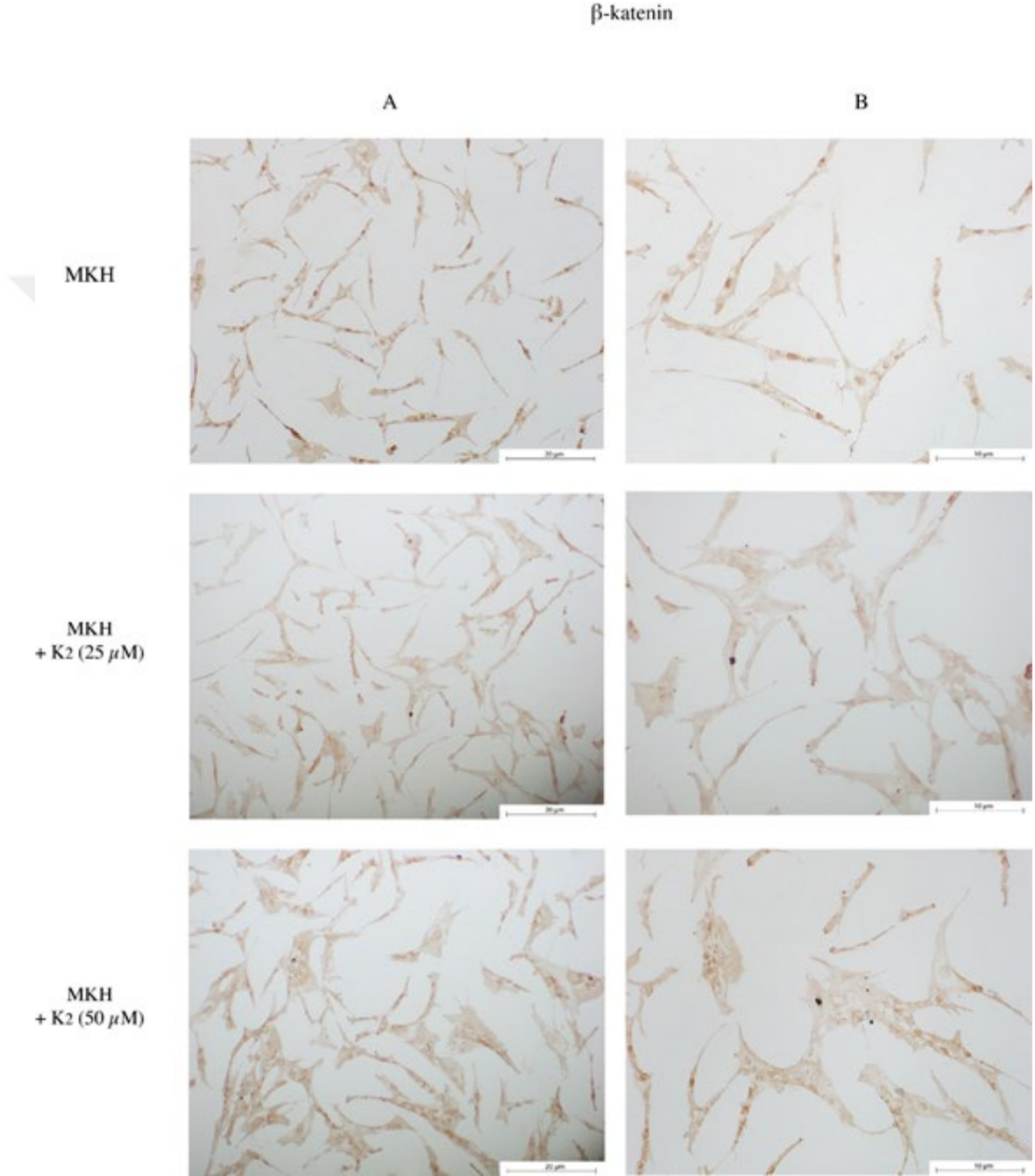
Membranlı olarak ko-kültüre edilen Saos-2 hücreleri β-katenin ekspresyonu açısından değerlendirildi. Sitoplazmada veya hücre membranında bulunması gereken β-katenin, Wnt sinyal yolağının aktif olması durumunda nükleusa geçer.

K2 vitamininin 25 μM ve 50 μM uygulandığı Saos-2 hücrelerinde β-katenin'in sitoplazmada düşük, çekirdekte orta yoğunlukta ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.17).



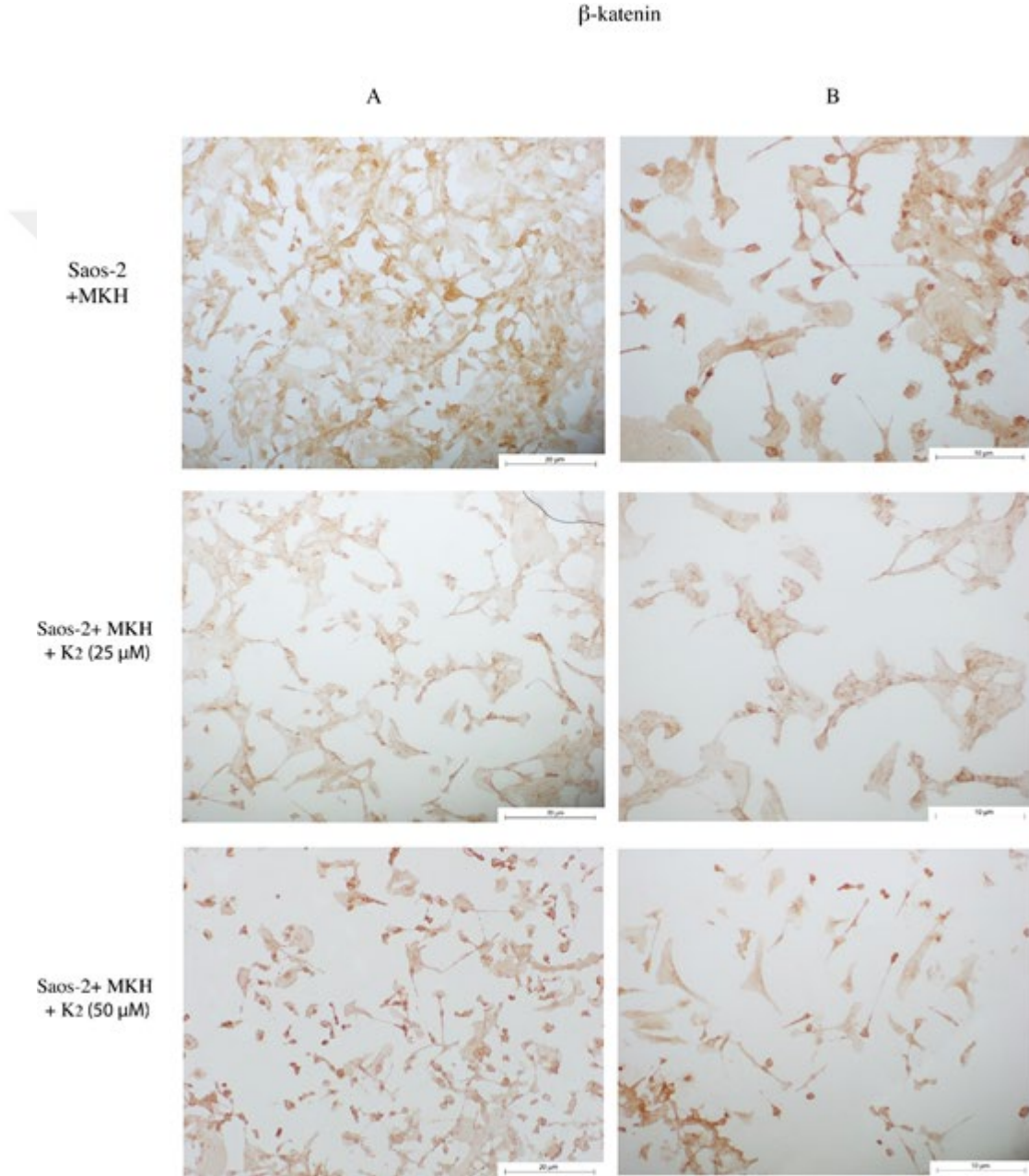
**Şekil 4.17.** K2 vitamini uygulanan ve uygulanmayan (Kontrol 1) Saos-2 hücrelerinde  $\beta$ -katenin'in immunositokimyasal yöntemle boyandığı invert mikroskop görüntüleri, x100 ve x200. **Ok:** İmmün-pozitif alanlar. **Boya:** DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojeni.

K2 vitamininin 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M uygulandığı MKH gruplarında  $\beta$ -katenin'in çekirdekte düşük yoğunlukta ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** K2 vitamini uygulanan ve uygulanmayan (Kontrol 2) MKH'lerde  $\beta$ -katenin'in immünohistokimyasal yöntemle boyandığı invert mikroskop görüntüleri, x100 ve x200. **Boya:** DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojeni.

Ko-kültür gruplarında  $\beta$ -katenin'in nükleusta düşük yoğunlukta ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.19). Ko-kültüre edilen bu gruplarda 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M K2 vitamini uygulaması sonrası  $\beta$ -katenin'in hem sitoplazmada hem de çekirdekte daha az ekspresyonu olduğu gözlemlendi.



**Şekil 4.19.** K2 vitamini uygulanan ve uygulanmayan (Kontrol 3) Saos-2 hücrelerinde  $\beta$ -katenin'in immünohistokimyasal yöntemle boyandığı invert mikroskop görüntüleri, x100 ve x200. **Boya:** DAB (3,3'-diaminobenzidine) kromojeni.

Grupların immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde her bir gruba ait preparatta x400 büyütmede rastgele beş alanda ışık mikroskobu (Olympus BX43) ile görüntüler alındı. İmmünreaktivite, Image J programında IHC Profiler (sitoplazmik protein) ve IHC Profiler Macro (nükleer protein) eklentisi ile analiz edildi. Rastgele seçilen bölgelerin skorlanması; yüksek pozitif bölgelere 4, pozitif bölgelere 3, düşük pozitif bölgelere 2 ve negatif bölgelere 1 verilerek hesaplandı (154). Görüntülerin skorlanmasında kullanılan formül;

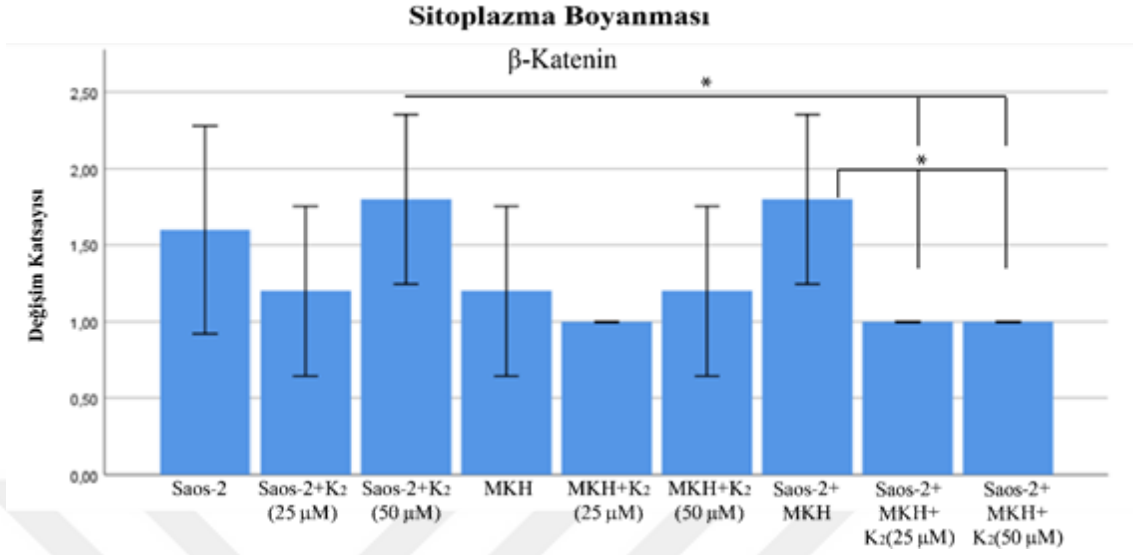
$$\text{Skor} = (\text{Bir bölgedeki piksel sayısı} \times \text{Bölgenin skoru}) / \text{Görüntüdeki toplam piksel sayısı}$$

İmmünohistokimya analizleri hücrelerin sitoplazma ve nükleus (çekirdek) boyanma özelliklerine göre yapıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi,  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

**Tablo 4.6.**  $\beta$ -katenin'in sitoplazmik ekspresyonunun gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,444	8	,556	3,846	,002
Within Groups	5,200	36	,144		
Total	9,644	44			

Anova sonuçlarına göre sitoplazmik  $\beta$ -katenin ekspresyonları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ( $p = 0.05 > 0.002$ ) (Tablo 4.6). Hangi gruplar arasında fark olduğunu belirlemek için Post Hoc Tukey testi yapıldı.



**Şekil 4.20.** Çalışma gruplarına ait sitoplazmik β-katenin ekspresyonlarının immünohistokimya sonrası istatistiksel olarak karşılaştırılması.

İkili karşılaştırmalara baktığımızda Saos-2+MKH grubu (Kontrol 3) ile 25 μM ve 50 μM K2 vitamini uygulanan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ).

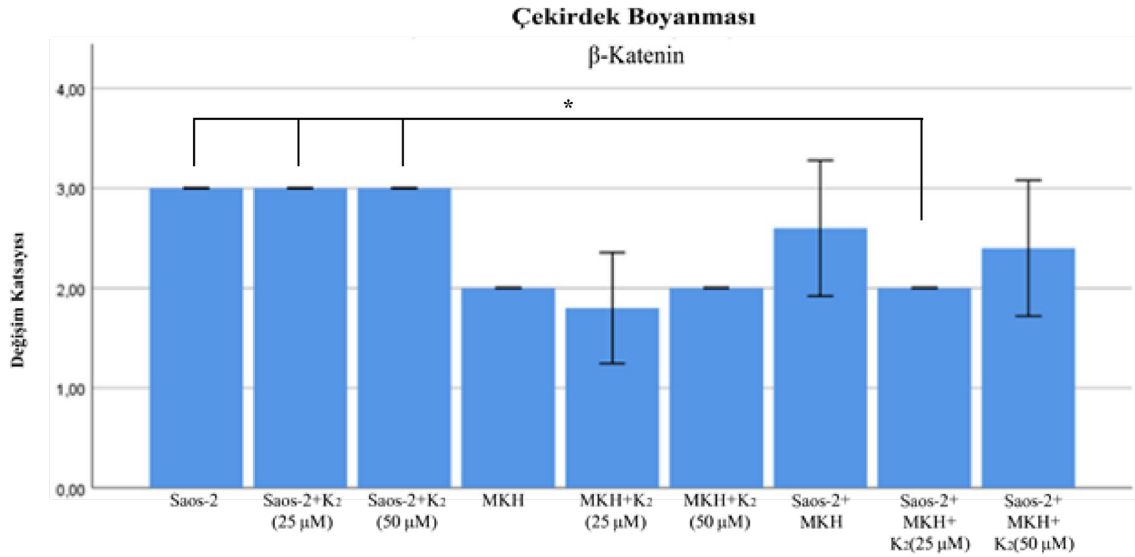
**Tablo 4.7.** β-katenin'in nükleer ekspresyonunun gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9,778	8	1,222	13,750	,000
Within Groups	3,200	36	,089		
Total	12,978	44			

Anova sonuçlarına göre nükleer β-katenin ekspresyonları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ( $p = 0.05 > 0.00$ ) (Tablo 4.7). Hangi gruplar arasında fark olduğunu belirlemek için Post Hoc Tukey testi yapıldı (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.**  $\beta$ -katenin'in nükleer ekspresyonunun gruplar arasındaki farklılıklarını belirlemek için yapılan Post Hoc Tukey sonuçları.

(I) Gruplar	(J) Gruplar	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Saos-2	MKH	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217
	MKH + K2(25 $\mu$ M)	1,20000*	,18856	,000	,5783	1,8217
	MKH + K2(50 $\mu$ M)	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217
	Saos-2 + MKH + K2(25 $\mu$ M)	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217
Saos-2 + K2 (25 $\mu$ M)	MKH	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217
	MKH + K2(25 $\mu$ M)	1,20000*	,18856	,000	,5783	1,8217
	MKH + K2(50 $\mu$ M)	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217
	Saos-2 + MKH + K2(25 $\mu$ M)	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217
Saos-2 + K2 (50 $\mu$ M)	MKH	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217
	MKH + K2(25 $\mu$ M)	1,20000*	,18856	,000	,5783	1,8217
	MKH + K2(50 $\mu$ M)	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217
	Saos-2 + MKH + K2(25 $\mu$ M)	1,00000*	,18856	,000	,3783	1,6217



**Şekil 4.21.** Çalışma gruplarına ait nükleer  $\beta$ -katenin ekspresyonlarının immünohistokimya sonrası istatistiksel olarak karşılaştırılması.

## 5. TARTIŞMA

Osteosarkom, çocukluk çağının en sık görülen primer malign kemik tümörüdür. Kombine tedaviler uygulanmakla birlikte yan etkilerin ciddiyeti ve tedavi seçeneklerinin hastaya özgünlüğü amaçlanarak alternatif kemoterapiler denenmektedir (38,39). Metastatik tümörler daha agresif olmaları sebebiyle geleneksel kanser tedavilerine oldukça dirençlidir. Kanser hücrelerinin moleküler patogenezinin aydınlatılması yeni terapötik yaklaşımlara, tanısal ve prognostik belirteçlerin geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır (18).

Kanserin ilerlemesinde kanser hücrelerinin kendilerinin değil mikroçevrenin önemi vurgulanmaktadır. Kanser hücreleri bu mikroçevre ile otokrin ağlar kurarak hastalığın patogenezinde kritik rol oynamaktadır (155). Çalışmaların çoğu, primer malign tümör olması sebebiyle OS'nin biyolojik özelliklerine odaklandığından OS'nin mikroçevresi ile ilgili çalışmalar daha azdır (155). Bu sebeple, osteosarkom tedavisine ilişkin mevcut araştırmalarda büyük bir boşluk vardır (68). Son zamanlarda tedaviye yönelik araştırmaları desteklemek için özellikle mikroçevrenin ana elemanlarından olan mezenkimal kök hücrelerin tümör mikroçevresindeki rolüne odaklanmıştır (156,157).

MKH'ler ve OS hücreleri, sitokinler, büyüme faktörleri, kemokinler ve hücre dışı veziküllerin (EV) aracılık ettiği parakrin sinyalleme yoluyla karşılıklı olarak birbirleriyle iletişim kurmaktadır (58). Bu iletişim MKH'lerin, apoptoz inhibisyonu, tümörle ilişkili fibroblastlara dönüşüm, bağışıklık sisteminin baskılanması, EMT'nin uyarımı, tümör metastazı ve anjiyogenezi teşvik ile tümörü desteklemesine veya apoptoz uyarımı, inflamatuvar infiltrasyon indüksiyonu, hücre döngüsünün ve hücresel sinyalin düzenlenmesi ile tümörü baskılamasına neden olmaktadır (158). Ayrıca MKH'lerin immün hücrelerle etkileşime girerek immünomodülasyonda, sitokin ve çözünebilir faktörler salgılayarak immün yanıtı modüle etmede önemli bir rol oynadığı da bilinmektedir (159).

Çalışmamızda sağlıklı kemik iliği MKH'lerin Saos-2 hücreleri ile hücre-hücre kontağı olmadan membranlı ko-kültürü yapılarak Saos-2 hücrelerinin sağkalımı

üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık. Literatürdeki çalışmalarda MKH'lerin birçok tümörde pro-tümör faktör olarak rol aldığı belirtilmiştir (160–162). İnsan kemik iliği MKH'lerden türetilen mikroveziküllerin *in vitro* hipoksi altında U2OS hücreleri üzerinde proliferasyonu ve anti-apoptozu indüklediği gösterilmiştir (163). Bir başka çalışma kemik iliği MKH'lerden türetilen eksozomal miR-21-5p'in PIK3R1 ekspresyonunu baskılayarak PI3K/Akt/mTOR yolunu aktive ettiğini ve bununda osteosarkom proliferasyonunu ve istilasını arttırdığını göstermiştir (164). MKH'den türetilen eksozomların, Hedgehog sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla MG63 hücrelerinin proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir (165). Buna karşılık MKH'lerden türetilen mikroveziküllerin farklı tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği çalışmalarda vardır (166). MKH ekstraktlarının, glioma hücreleri üzerinde spesifik anti-tümör özellikleri indükleyebildiği ve bu etkinin G1 fazında hücre döngüsü durmasına aracılık gösterilmiştir (167). MKH koşullu ortam (Conditioned Medium/CM) ile akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinin kültüre edildiği çalışmada hücre proliferasyonunun ve metastazının aşağı regülasyonu gösterilmiştir (168). Dolayısıyla MKH'lerin tümör progresyonunu destekleyip desteklemediği hala tartışmalı bir konudur (157). Çalışmamız sonuçları doğrultusunda MKH'lerin kontakt olmadan salgıladığı sitokin, kemokin veya ekstrasellüler veziküllerin OS hücre sağkalımında ve apoptozunda tek başına yeterli olmadığı görülmüş apoptotik hücre sayısında anlamlı değişiklikler görülmemiştir.

*In vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalar, K vitaminlerinin inflamasyon, oksidatif stres ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir (169–171). Jiang ve ark.ları, K4 vitamini ile indüklenen PC-3 (prostat kanseri) hücrelerinin S fazında durduğunu göstererek, K4 vitamininin (20.94 µM) prostat kanseri hücrelerinde antikanser aktivitesini bildirmiştir (105). Li ve ark.ları, hepatosellüler karsinom hücrelerinde K2 vitamininin (9.73 µM) hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir (172). Zenmyo ve ark.ları, MG-63 osteosarkom hücrelerine 48 saat boyunca 5 µM K2 vitamini uygulayarak bunun osteoz diferansiyasyonuna yol açtığı ve hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği göstermiştir (173). Di ve ark.ları, K4 vitamininin (25 µM ve 35 µM) U2-OS hücrelerini S fazında durduğunu ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (10). Kanser hücresi olmayan hücrelere yüksek konsantrasyonda verilen K2 vitamini (100 µM) sonrası hücrelerin minimum düzeyde

etkilendiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar K2 vitamininin kanser hücresi olmayan hücrelerde düşük sitotoksik etki gösterirken farklı kanser hücrelerinde antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (104). Matsuda ve ark., IL-1 $\beta$ 'nin insan osteoblastik (SaM-1) ve osteosarkom (MG-63) hücrelerinde  $\gamma$ -karboksiglutamik asit içeren osteokalsin sentezini inhibe ettiği göstermiştir. Azalmış  $\gamma$ -karboksiglutamik asit sentezinin,  $\gamma$ -karboksilaz için kofaktör olan K2 vitamininin tarafından baskılandığı belirterek, K2 vitamininin insan osteoblast hücrelerinde IL-1 $\beta$  ile uyarılması sonucu proliferasyon üzerinde inhibitör etki gösterdiği sonucuna varmıştır (98). Çalışmamızda kemik metabolizmasında önemli rollere hizmet eden K2 vitamininin XTT sitotoksisite testi ile Saos-2 hücreleri sağkalımına etkisi araştırılmış ve IC<sub>50</sub> değerleri 48 saat için 50.62  $\mu$ M, 72 saat için 37.54  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M K2 vitamini uygulanan çalışma grupları, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında apoptoza gitme açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. K2 vitamininin OS hücreleri üzerindeki antikanser etkilerine yönelik çalışmaların nadir olması sebebiyle daha etkili ve doğru sonuçlara ulaşmak için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kanser tedavisine yönelik son çalışmalar doğrudan kök hücre yerine salgıladıkları sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerine odaklanmıştır. Tümör mikroçevresinde var olan makrofajlar, fibroblastlar, endotel hücreleri ve mezenkimal kök hücreler dahil olmak üzere birçok hücre tarafından salınan sitokinlerin kanser hücreleri üzerinde çoğalmasını baskılayarak tümörde gerilemeye sebep olduğu düşünülmektedir (174). MKH koşullu ortamlarının kanser hücreleri üzerindeki veya kanser hücresi koşullu ortamlarının MKH hücreleri üzerindeki etkilerine yönelik çalışmalar ivme kazanmıştır. Pietrovito ve ark.ları, yaptığı çalışmada kemik iliği MKH'lerinin, OS hücreleriyle etkileştikten sonra kanserle ilişkili fibroblastlara farklılaşarak, tümör mikroçevresinde GRO- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 ve IL-8 seviyelerini artırdığını göstermiştir (175). Lin ve ark.ları, U2-OS-CM'nin, MKH'lerde, karsinomla ilişkili fibroblastlara dönüşümü indüklediğini ve MKH'lerin çoğalmasını, göçünü, istilasını desteklediğini göstermiştir. Ayrıca STAT3'ün fosforilasyonunu artırarak IL-6 ekspresyonunda artış sağladığını gözlemişlerdir (176). Tu ve ark.ları, Saos-2 ve U2-OS hücrelerini, MKH-CM'ye maruz bırakarak IL-6 sitokininin ekspresyonun arttığını bu durumun da STAT3 sinyal yolunu daha fazla aktive ederek tümör proliferasyonuna neden olduğunu bildirmiştir (7). Tu ve ark.ları, MKH'nin IL-6/STAT3 sinyal yoluyla OS'de

proliferasyonu ve metastazı yönlendirdiğini göstermiştir (77). Kemik iliği MKH'lerinin CAF'lere geçişini indüklemeye IL-6/STAT3'ün sinyal yolağına ek olarak, Notch ve Akt sinyal yolunun da bu farklılaşmada çok önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (177). Hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar etkiye sahip olan IL-6 sitokini birçok hücre tarafından sentezlenir. Tümör varlığında bağışıklık hücrelerini infiltre ederek, tümör hücreleri ve stromal hücreler tarafından da üretilir. Serumda yüksek seviyede bulunması kanser riski ile ilişkilidir. Prognostik bir belirteç olması sebebiyle mevcut anti-kanser tedavileri IL-6 aktivitesini hedef alır (178,179). Osteosarkom hücreleri, TGF- $\beta$ /Smad2/3 yoluyla MKH'lerin osteojenik farklılaşmalarını inhibe ederek pro-tümör sitokinlerin üretimini indükler. Bu durum MKH'lerde IL-6 ve VEGF'nin salınımını artırarak tümörde proliferasyonu ve metastazı destekler (180,181). Zhang ve ark.ları, IL-6 salınımının azalmasının *in vitro* ve *in vivo* osteosarkom proliferasyonunu ve metastazı engellediğini bildirmiştir (74). Bizim çalışmamızda membranlı olarak ko-kültüre edilen gruplarda IL-6 seviyelerinin azaldığı tespit edilse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, gruplardaki örnek sayısının artırılarak çalışmanın genişletilmesinin faydalı olacağı düşünülmüştür.

Kanserin ilk evrelerinde hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu teşvik ederek tümör baskılayıcı rol alan TGF- $\beta$ , ileri evrelerinde fibrozis, inflamasyon ve anjiyogenezi destekleyerek tümör hücresi proliferasyonuna ve EMT'ye neden olur (82–84). Bu sebeple TGF- $\beta$  ekspresyonunun salınımının artması, ileri evre tümörleri olan hastalarda kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (182). TGF- $\beta$ , osteosarkom hücreleri tarafından salgılanan en önemli sitokinlerden biridir (87). OS hücrelerinde TGF- $\beta$  sinyal yolunun bloke edilmesinin, tümör büyümesi ve buna bağlı olarak tümör ilerlemesi ile bağlantılı kemik osteolizisini azalttığı gösterilmiştir (85). Ek olarak, TGF- $\beta$  sinyal yolunun bloke edilmesinin, akciğer metastazının azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (31). Bizim çalışmamızda ise membranlı olarak ko-kültüre edilen gruplarda TGF- $\beta$ 1 seviyelerinin azaldığı tespit edilse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, gruplardaki örnek sayısının artırılarak çalışmanın genişletilmesi planlanmıştır.

Alkalen fosfataz (ALP), alkali ortamda monofosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen ve birçok dokuda (karaciğer, böbrek, plasenta, kemik) hücreler tarafından sentezlenen, zara bağlı bir metalloenzimdir (183–185). Osteosarkom vakalarında yapılan çalışmalarda serumdaki alkalen fosfataz düzeyi ile tümör hacmi arasında pozitif bir korelasyon olduğu, metastatik hastaların serumlarında ise önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir (184). Ayrıca insan osteosarkom hücre hatlarının da yüksek miktarda ALP ürettiği gösterilmiştir (186). ALP'nin osteosarkomda prognostik bir faktör olduğu kanıtlanmasına rağmen artan ALP üretiminin osteoblastik tümör hücrelerinden mi yoksa tümörün osteolizisine yanıt olarak reaktif kemikten mi oluştuğu hala net değildir (153,185). Çalışmamızda K2 vitamininin farklı konsantrasyonlarının (25 µM ve 50 µM) gruplar arasındaki ALP aktivitesi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla spektrofotometrik ölçümler yapıldı. ALP aktivitesi kültür ortamında intraselüler ve ekstraselüler olarak ölçülebilmektedir (187). Kültür sonrası süpernatantların toplanması ile ekstraselüler olarak ölçtüğümüz sonuçları değerlendirdiğimizde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grupları ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ko-kültür grupları ile ilgili kontrol (kontrol 1,2,3) grupları karşılaştırıldığında K2 vitamininin kültür ortamındaki ALP aktivitesinin genellikle azalttığı tespit edilse de bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kemik mineralizasyonunda önemli rolleri olan ALP enziminin tayininde elde ettiğimiz bu sonuçların daha güvenilir olması için kültür sürelerinin uzatılarak test edilmesini öngörmekteyiz. Çalışmamız esnasında daha uzun inkübasyon süreleri için ön çalışmalar denenmiş olup laboratuvar ortamında yaşanan kontaminasyon sorunları nedeniyle devam edilememiştir.

Wnt/β-katenin sinyal yolağının düzensiz aktivasyonu, pek çok tümörün gelişmesine sebep olmaktadır (51). β-katenin'in, inflamatuvar mikroçevrelerde MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını düzenlemede merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir. β-katenin'in aşırı ekspresyonunun, Wnt yolunu bloke ederek MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (188). Osteosarkom vakalarında yapılan çalışmalarda ise β-katenin'in aşırı ekspresyonu uzak metastaz riski ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (189–191). Wnt/β-katenin sinyal yolağı aktivasyonunun MKH'lerde osteojenik farklılaşmaya etkisi belirsizliğini korumaktadır (181). Dolayısıyla MKH'lerin

osteoblast farklılaşmasını değişime uğratan moleküler mekanizmalarını aydınlatmak OS tedavisine katkı sağlayacaktır (18). Kemik iliği MKH'lerinden türetilen ekstraselüler veziküllerin, MALAT1/miR-143/NRSN2/Wnt/ $\beta$ -katenin eksenini yoluyla OS hücrelerinde proliferasyon, invazyon ve metastazı desteklediği gösterilmiştir (192). Ayrıca, TGF- $\beta$  ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolları arasındaki etkileşimin, belirli gelişimsel olayların düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (193). Osteosarkom hücrelerinin TGF- $\beta$  salgılayarak MKH'lerde  $\beta$ -katenin yolunu aktive ettiği gösterilmiştir (181). Başka bir çalışma ise TGF- $\beta$ 1 ve  $\beta$ -katenin sinyalleşmesi arasındaki iş birliğinin insan MKH'lerinde osteogenezi/osteoblastogenezi inhibe ettiğini ileri sürülmüştür (194). Çalışmamızda kemik iliği MKH'lerin ve K2 vitamininin, Saos-2 hücreleri üzerinde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı aracılı bir etkisi olup olmadığını belirlemek için  $\beta$ -katenin ile immunositokimya çalışmaları yapıldı. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının C ve D vitamini aracılığıyla regülasyonunun değiştiiğini gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır (195–198). Kolorektal kanser hücrelerinde K3 vitamininin etkisine bakılan bir araştırmada K3 vitamininin Wnt sinyal yolunu baskıladığı gösterilmiştir (199). Ancak, osteosarkomda K2 vitamininin etkisinde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun araştırıldığı bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu anlamda çalışmamızda tüm gruplar arasında nükleer  $\beta$ -katenin'in ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde sağlıklı MKH'lerde  $\beta$ -katenin'in nükleer ekspresyonunun Saos-2 hücrelerine oranla daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum kanser hücrelerinde ve osteosarkom da  $\beta$ -katenin'in ekspresyonunun arttığı ve sinyal yolağı ifadesinin değiştiiğini gösteren çalışmaları destekler niteliktedir. Saos-2 hücreleri, MKH ve K2 vitamini ile ko-kültüre edildiğinde  $\beta$ -katenin ekspresyonunda değişiklik olduğu, nükleer ekspresyonun anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. 25  $\mu$ M K2 vitamini uygulanan ko-kültür grubundaki anlamlı azalış K2 vitamininin Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolunun aktivasyonunu bozarak  $\beta$ -katenin ekspresyonunu inhibe edebileceğini göstermiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin kanser modülasyonundaki rollerinde salgılanan sitokinlerin, kemokinlerin veya ekstraselüler veziküllerin kanser progresyonundaki çelişkili sonuçları görülmektedir. Bu farklılıkların oluşmasında hücre hatlarına uygulanan ilaçların yanıtları, etki mekanizmaları, uygulama dozları, hücrelerin köken aldığı doku, kanser hücre hatlarının karakteristik özellikleri de oldukça önemlidir (186). MKH'lerin

tümör destekleyici veya tümör baskılayıcı moleküler mekanizmaları ile ilgili olarak daha kapsamlı araştırmalar yapılması kanser tedavisinde bu hücrelerin rolüne ışık tutacaktır. Elde edilen sonuçlara göre tek başına K2 vitamininin hastalık patogeneğinde düzenleyici rol oynamadığı tespit edilmiş olup, kemoterapiye ek olarak tedavide kullanılabileceği düşünülmüştür. Bunun için, K2 vitamini ile ilişkili çalışmaların *in vitro* ve *in vivo* da yapılan ileri araştırmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında aşağıda sıralanan sonuçlara varılmıştır.

- ✓ Tümör mikroçevresinin ana elemanlarında olan mezenkimal kök hücrelerin laboratuvar ortamında üretimi gerçekleştirildi. Bu amaca uygun olarak geliştirilen hücreler *in vitro ortamda* çoğaltıldı. Hücrelerin karakterizasyonu için morfolojik özellikleri ve farklılaşma kapasiteleri incelendi. Ayrıca mezenkimal kök hücrelere özgü yüzey belirteçlerinin tayini akım sitometri ile yapılarak bu hücrelerin MKH olduğu kanıtlandı.
- ✓ Çalışmamızda K2 vitaminin sitotoksosite analizleri sonucunda Saos-2 hücreleri için optimum doz 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M, optimum süre 48 saat olarak belirlenmiştir.
- ✓ Apoptozis tayini için yapılan akım sitometri analizleri sonucunda Saos-2 hücrelerinin apoptoz oranları ve canlı kalma oranları belirlendi. K2 vitaminin ve MKH'lerin Saos-2 hücreleri üzerinde anti-apoptotik/apoptotik etkileri ile ilgili mekanizmaların aydınlatılabilmesi yeni çalışmaların yapılması gerekliliğini doğurmaktadır. Ayrıca K vitaminlerinin uygulanan doz ve sürelerde anlamlı bir etki göstermediği görüldüğünden Xcelligence gibi gerçek zamanlı cihazlarla farklı süre ve dozlarda etkinliğinin araştırılması hedeflenmektedir.
- ✓ Spektrofotometrik olarak ölçülen ALP enzim aktivitesi değerlendirildiğinde Saos-2 ile ko-kültür grupları karşılaştırıldığında azalma görülse de bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kemik mineralizasyonunda önemli olan ALP enziminin aktivitesinde daha uzun kültür süreleri uygulanması öngörmekteyiz.
- ✓ Elisa yöntemi ile IL-6 ve TGF- $\beta$ 1 sitokinlerinin konsantrasyonları ölçülerek Saos-2 ile ko-kültür grupları arasında anlamlı farklılıklar bulunmadı. Bundan sonraki çalışmalarımızda ko-kültür gruplarında sitokin profili yanısıra moleküler ilaçlar ve gen taşıyıcılar olarak salınan ekstraselüler veziküllerin (ekzosomlar) mikroçevredeki rolü çalışılarak MKH'lerin OS patogenezindeki yerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

- ✓ İmmünohistokimya analizleri ile  $\beta$ -katenin protein ekspresyonunu belirlemek için yapılan çalışmalar sonucunda Saos-2 hücreleri ile ko-kültür edilen gruplar arasında proteinin ekspresyonu açısından fark bulundu. Sağlıklı hücreler olan MKH'lerde  $\beta$ -katenin'in nükleer ekspresyonunun düşük olduğu, Saos-2'lerde ise  $\beta$ -katenin'in nükleer ekspresyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir. 25  $\mu$ M K2 vitamini ile ko-kültüre edilen grupta  $\beta$ -katenin'in nükleer ekspresyonundaki anlamlı azalma, MKH'lerin ve K2 vitamininin Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı hedeflenerek yapılacak çalışmalarda osteosarkom tedavisine potansiyel bir terapotik olarak katkı sağlayacağı düşünüldü. Osteosarkom tedavisinde terapotik ajan olarak mezenkimal kök hücrelerin tek başına uygulanmasının tümör hücrelerinin apoptoza gitmesinde anlamlı bir sonuç oluşturmadığı ancak ko-kültür ortamlarına eklenen K2 vitamini ile additif etki gösterdiği immün çalışmalar ile gösterildi.
- ✓ Elde ettiğimiz tüm bu sonuçlara göre, mezenkimal kök hücrelerin kanser tedavisindeki kullanım etkinliği tam olarak netlik kazanmadan klinik uygulamalara geçilmemelidir. Kanserde kullanılan standart tedavilerin yan etkilerinin olması alternatif tedavi seçeneklerini gerektirmektedir. Bu nedenle radyoterapi ve diğer kemoterapötiklerle kombinasyon halinde yeni tümör mikro-çevre hedefli ajanların geliştirilmesi tedaviye katkı sağlayacaktır. Hedeflerimiz doğrultusunda yapacağımız ileriki çalışmalar kanser hastalığında alternatif hücresel tedavilere ışık tutacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Yang C, Tian Y, Zhao F, Chen Z, Su P, Li Y, et al. Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020,21(19), 6985.
2. Jaffe N. Osteosarcoma: Review of the past, impact on the future. The American experience, *Pediatric and adolescent osteosarcoma*, 2009,239-262.
3. Ehnman M, Chaabane W, Haglund F, Tsagkozis P. The tumor microenvironment of pediatric sarcoma: mesenchymal mechanisms regulating cell migration and metastasis, *Current Oncology Reports*, 2019,21.
4. Zheng Y, Wang G, Chen R, Hua Y, Cai Z. Mesenchymal stem cells in the osteosarcoma microenvironment: Their biological properties, influence on tumor growth, and therapeutic implications, *Stem Cell Research and Therapy*, 2018,9(1):22.
5. Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation, *Experimental & Molecular Medicine*, 2013,45(1):1-10.
6. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: Do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?, *Stem Cells*, 2011,29(1):11–19.
7. Tu B, Zhu J, Liu S, Wang L, Fan Q, Hao Y, et al. Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3, *Oncotarget*, 2016,7(30):48296–308.
8. Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, Iwasaki T, Tsumura H. Interaction between human osteosarcoma and mesenchymal stem cells via an interleukin-8 signaling loop in the tumor microenvironment, *Cell Communication and Signaling*, 2018,16(1):13.
9. Razeghian E, Margiana R, Chupradit S, Bokov DO, Abdelbasset WK, Marofi F, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells as a Vehicle for Cytokine Delivery: An Emerging Approach for Tumor Immunotherapy, *Frontiers in Medicine*, 2021,27:8.

10. Di W, Khan M, Gao Y, Cui J, Wang D, Qu M, et al. Vitamin K4 inhibits the proliferation and induces apoptosis of U2OS osteosarcoma cells via mitochondrial dysfunction, *Molecular Medicine Reports*, 2017,15(1).
11. Taran SJ, Taran R, Malipatil NB. Pediatric osteosarcoma: An updated review, *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 2017,38(1):33-43.
12. Ritter J, Bielack SS. Osteosarcoma, *Annals of Oncology*, 2010,21:320–5.
13. Misaghi A, Goldin A, Awad M, Kulidjian AA. Osteosarcoma: A comprehensive review, *Sicot-j*, 2018,4.
14. Zhang Y, Hu H, Song L, Cai L, Wei R, Jin W. Epirubicin-mediated expression of miR-302b is involved in osteosarcoma apoptosis and cell cycle regulation, *Toxicology Letters*, 2013,222(1):1-9.
15. Troisi R, Masters MN, Joshipura K, Douglass C, Cole BF, Hoover RN, et al. Perinatal factors, growth and development, and osteosarcoma risk, *British Journal of Cancer*, 2006,95(11).
16. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons, *International Journal of Cancer*, 2009,125(1):229-234.
17. Durfee RA, Mohammed M, Luu HH. Review of Osteosarcoma and Current Management, *Rheumatology and Therapy*, 2016,3(2):221-43.
18. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2008,466(9):2114-30.
19. Picci P. Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma), *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2007,2(1):1-4.
20. Lee MW, Ryu S, Kim DS, Lee JW, Sung KW, Koo HH, et al. Mesenchymal stem cells in suppression or progression of hematologic malignancy: current status and challenges, *Leukemia*, 2019,33(3):597-611.

21. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma, *The Oncologist*, 2004;9(4):422-441.
22. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the surveillance, epidemiology, and end results program, *Cancer*, 2009,115(7).
23. Jeffree GM, Price CHG, Sissons HA. The metastatic patterns of osteosarcoma, *British Journal of Cancer*, 1975,32(1):87-107.
24. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: An analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols, *Journal of Clinical Oncology*, 2002,20(3):776-790.
25. Whelan JS, Bielack SS, Marina N, Smeland S, Jovic G, Hook JM, et al. EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: Results from pre-randomisation treatment, *Annals of Oncology*, 2015,26(2):407-414.
26. Fox M, Trotta B. Osteosarcoma: Review of the various types with emphasis on recent advancements in imaging, *Seminars in Musculoskeletal Radiology*, 2013;17(2):123-136.
27. Fletcher C, Bridge J, Hogendoorn P, Mertens F. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone, *WHO Classification*, 2013,5.
28. Scully SP, Ghert MA, Zurakowski D, Thompson RC, Gebhardt MC. Pathologic fracture in osteosarcoma: Prognostic importance and treatment implications, *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2002;84(1):49-57.
29. Dadia S, Grimer R. Characteristics, diagnosis and treatment of bone and soft tissue sarcomas, *British Journal of Hospital Medicine*, 2007,68(11):589-593.
30. Marais LC, Bertie J, Rodseth R, Sartorius B, Ferreira N. Pre-treatment serum lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase as predictors of metastases in extremity osteosarcoma, *Journal of Bone Oncology*, 2015,4(3):80-84.

31. Lilienthal I, Herold N. Targeting molecular mechanisms underlying treatment efficacy and resistance in osteosarcoma: A review of current and future strategies, *International Journal of Molecular Sciences*. 2020,21(18):6885.
32. Fu Z, Deng B, Liao Y, Shan L, Yin F, Wang Z, et al. The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis, *BMC Cancer*, 2013,13:580.
33. Roberts RD, Lizardo MM, Reed DR, Hingorani P, Glover J, Allen-Rhoades W, et al. Provocative questions in osteosarcoma basic and translational biology: A report from the Children's Oncology Group, *Cancer*, 2019,125(20):3514-3525.
34. Kaste SC, Pratt CB, Cain AM, Jones-Wallace DJ, Rao BN. Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: Imaging features, *Cancer*, 1999,86(8):1602-8.
35. Meyers PA, Healey JH, Chou AJ, Wexler LH, Merola PR, Morris CD, et al. Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer*. 2011,117(8):1736-44.
36. Sakamoto A, Iwamoto Y. Current Status and Perspectives Regarding the Treatment of Osteosarcoma: Chemotherapy. *Reviews on Recent Clinical Trials*. 2008,3(3):228-31.
37. Kansara M, Teng MW, Smyth MJ, Thomas DM. Translational biology of osteosarcoma, *Nature Reviews Cancer*, 2014,14:722-735.
38. Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: Current challenges and future directions, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2006,6(7):1075-85.
39. Szewczyk M, Lechowski R, Zabielska K. What do we know about canine osteosarcoma treatment?—review, *Veterinary Research Communications*, 2015,39(1):61-7.
40. Spina V, Montanari N, Romagnoli R. Malignant tumors of the osteogenic matrix, *European Journal of Radiology*, 1998,27:98-109.
41. Klein MJ, Siegal GP. Osteosarcoma: Anatomic and histologic variants, *American Journal of Clinical Pathology*, 2006,125:555-81.

42. Eble JA, Niland S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis, *Clinical and Experimental Metastasis*, 2019,36(3):171-198.
43. Ye J, Wu D, Wu P, Chen Z, Huang J. The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment, *Tumor Biology*, 2014,35(5):3945–51.
44. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy, *Nature Medicine*, 2018,24(5):541-550.
45. Danieau G, Morice S, Rédini F, Verrecchia F, Royer BB le. New insights about the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in primary bone tumors and their microenvironment: A promising target to develop therapeutic strategies?, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019,20:3751.
46. Alfranca A, Martinez-Cruzado L, Tornin J, Abarrategi A, Amaral T, de Alava E, et al. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015,72:3097-3113.
47. Patel H, Nilendu P, Jahagirdar D, Pal JK, Sharma NK. Modulating secreted components of tumor microenvironment: A masterstroke in tumor therapeutics, *Cancer Biology and Therapy*, 2018,19(1):3-12.
48. Monteiro CF, Custódio CA, Mano JF. Three-Dimensional Osteosarcoma Models for Advancing Drug Discovery and Development, *Advanced Therapeutics*, 2019,2(3).
49. Friedenstein AJ, Gorskaja UF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs, *Experimental Hematology*, 1976,4(5).
50. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue, *Stem Cells*, 2006,24(5):1294-1301.
51. Stamatopoulos A, Stamatopoulos T, Gamie Z, Kenanidis E, Ribeiro RDC, Rankin KS, et al. Mesenchymal stromal cells for bone sarcoma treatment: Roadmap to clinical practice, *Journal of Bone Oncology*, 2019,16.

52. Macrin D, Joseph JP, Pillai AA, Devi A. Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence, *Stem Cell Reviews and Reports*, 2017,13(6):741–56.
53. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature, *Cytotherapy*, 2019,21(10):1019-1024.
54. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 2006,8(4):315-7.
55. Sensebé L. Clinical grade production of mesenchymal stem cells, *Bio-Med Mat Eng*, 2008,18(1):3-10
56. Yang Y, Yang R, Roth M, Piperdi S, Zhang W, Dorfman H, et al. Genetically transforming human osteoblasts to sarcoma: development of an osteosarcoma model, *Genes & Cancer*, 2017,8:484–94.
57. Mutsaers AJ, Walkley CR. Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells?, *Bone*, 2014,62:56–63.
58. Sarhadi VK, Daddali R, Seppänen-Kajjansinkko R. Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles in Osteosarcoma Pathogenesis and Therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 2021:22(20):11035.
59. Li L, Tian H, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo, *Journal of Cellular Physiology*, 2011,226(7):1860–7.
60. Wong RSY. Mesenchymal stem cells: Angels or demons?, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
61. Bian ZY, Fan QM, Li G, Xu WT, Tang TT. Human mesenchymal stem cells promote growth of osteosarcoma: Involvement of interleukin-6 in the interaction between human mesenchymal stem cells and Saos-2, *Cancer Science*, 2010,101(12):2554–60.

62. Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis, *Cancer Letters*, 2009,281(1):32-41.
63. Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B, Marini FC. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: Be it friend or foe, *Cytotherapy*, 2008,10(7):657-67.
64. Tsukamoto S, Honoki K, Fuji H, Tohma Y, Kido A, Mori T, et al. Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model, *International Journal of Oncology*, 2012,40(1):163-69.
65. Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA, de Bont ESJM. Bone marrow-derived cells and tumor growth: Contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2009,69(3),187-198.
66. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, McDermott MF, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: On-line databases, *Genes and Immunity*, 1999,1(1),3-19.
67. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy, *Nature Reviews Cancer*, 2004,4(1),11-22.
68. Chang X, Ma Z, Zhu G, Lu Y, Yang J. New perspective into mesenchymal stem cells: Molecular mechanisms regulating osteosarcoma, *Journal of Bone Oncology*, 2021,29:100372.
69. Huang WH, Chang MC, Tsai KS, Hung MC, Chen HL, Hung SC. Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice, *Oncogene*, 2013,32(37):4343-4354.
70. Yenilmez EN, Genc D, Farooqi AA, Tunoglu S, Zeybek U, Akkoc T, et al. Mesenchymal stem cells combined with IFN $\gamma$  induce apoptosis of breast cancer cells partially through TRAIL, *Anticancer Research*, 2020,40(10):5641-5647.
71. Loebinger MR, Janes SM. Stem cells as vectors for antitumour therapy, *Thorax*, 2010,65(4):362-9.
72. Cortini M, Avnet S, Baldini N. Mesenchymal stroma: Role in osteosarcoma progression, *Cancer Letters*, 2017,405,90-99.

73. Kishimoto T. Interleukin-6: Discovery of a pleiotropic cytokine, *Arthritis Research and Therapy*, 2006,8(2),1-6.
74. Zhang Y, Ma Q, Liu T, Guan G, Zhang K, Chen J, et al. Interleukin-6 suppression reduces tumour self-seeding by circulating tumour cells in a human osteosarcoma nude mouse model, *Oncotarget*, 2016,7(1):446–458.
75. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: Implications for translational therapeutics, *Cancer*, 2007,110(9),1911-1928.
76. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Richardson DR, Morris DL. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6), *Journal of Clinical Pathology*, 2014,67(11),932-937.
77. Tu B, Du L, Fan QM, Tang Z, Tang TT. STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma, *Cancer Letters*, 2012,325(1):80–8.
78. Eickelberg O, Pansky A, Mussmann R, Bihl M, Tamm M, Hildebrand P, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts, *Journal of Biological Chemistry*, 1999,274(18):12933–12938.
79. Zhao Y, Young SL. Requirement of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) type II receptor for TGF- $\beta$ -induced proliferation and growth inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 1996,271(5):2369-72.
80. Vural P. Transforming Growth Factor- $\beta$ 'nın Kanserde Baskılayıcı Rolü. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 2010,8(1):35-42.
81. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression, *Trends in Immunology*, 2010, 31(6), 220-227.
82. Goulet CR, Pouliot F. TGF $\beta$  signaling in the tumor microenvironment. *Tumor Microenvironment*, 2021,89-105.
83. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression, *Nature Genetics*, 2001,29(2):117-29.

84. Caja F, Vannucci L. TGF $\beta$ : A player on multiple fronts in the tumor microenvironment, *Journal of Immunotoxicology*, 2015,12(3),300-7.
85. Verrecchia F, R dini F. Transforming growth factor- $\beta$  signaling plays a pivotal role in the interplay between osteosarcoma cells and their microenvironment, *Frontiers in Oncology*, 2018,8,133.
86. Fuxe J, Vincent T, de Herreros AG. Transcriptional crosstalk between TGF $\beta$  and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes, *Cell Cycle*, 2010, 9(12), 2363-2374.
87. Broadhead ML, Clark JC, Myers DE, Dass CR, Choong PF. The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review, *Sarcoma*, 2011.
88. Lamora A, Talbot J, Mullard M, Brounais-Le Royer B, Redini F, Verrecchia F. TGF- $\beta$  signaling in bone remodeling and Osteosarcoma progression, *Journal of Clinical Medicine*, 2016,5(11),96.
89. Dam H. The antihaemorrhagic vitamin of the chick, *Biochemical Journal*. 1935;29(6).
90. Ek i Alp E. Term ve Preterm Yenidoğanlarda K Vitamini  ncesi Ve Sonrası Serum Growth Arrest Specific-6 (Gas-6) Protein D zeyleri, Tıp Fakültesi,  ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul:Maltepe Üniversitesi, 2013.
91. Demirtaş F, Evim MS, Baytan B, G neş AM. Vitamin K ve hemostaz, *G ncel Pediatri*, 2010,8.
92. Tabb MM, Sun A, Zhou C, Gr n F, Errandi J, Romero K, et al. Vitamin K2 Regulation of Bone Homeostasis Is Mediated by the Steroid and Xenobiotic Receptor SXR, *Journal of Biological Chemistry*, 2003,278(45),43919-27.
93. Hassan GS. Menadione. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, 2013,38:227-313.
94. Chatron N, Hammed A, Benoît E, Lattard V. Structural insights into phylloquinone (Vitamin K1), menaquinone (MK4, MK7), and menadione (vitamin K3) binding to VKORC1, *Nutrients*, 2019,11(1):67.

95. El Asmar MS, Naoum JJ, Arbid EJ. Vitamin K dependent proteins and the role of vitamin K2 in the modulation of vascular calcification: A review, *Oman Medical Journal*, 2014,29(3):172-177.
96. Hamidi MS, Gajic-Veljanoski O, Cheung AM. Vitamin K and Bone Health, *Journal of Clinical Densitometry*, 2013,16(4):409-413.
97. Jinghe X. Vitamin K and hepatocellular carcinoma: The basic and clinic, *World Journal of Clinical Cases*, 2015,3(9):757.
98. Matsuda T, Kondo A, Tsunashima Y, Togari A. Inhibitory effect of vitamin K2 on interleukin-1 $\beta$ -stimulated proliferation of human osteoblasts, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2010,33(5):804-8.
99. Mandatori D, Penolazzi L, Pipino C, di Tomo P, di Silvestre S, di Pietro N, et al. Menaquinone-4 enhances osteogenic potential of human amniotic fluid mesenchymal stem cells cultured in 2D and 3D dynamic culture systems. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018,12(2):447-459.
100. Owen R, Bahmaee H, Claeysens F, Reilly GC. Comparison of the anabolic effects of reported osteogenic compounds on human mesenchymal progenitor-derived osteoblasts, *Bioengineering*, 2020;7(1):12.
101. Alireza Rasouli-Ghahroudi A, Akbari S, Najafi-Alishah M, Bohlooli M. The Effect of Vitamin K2 on Osteogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells: An In Vitro Study, *Journal of "Regeneration, Reconstruction & Restoration"(Triple R)*, 2017,2(1), 26-29.
102. Hoyt M, Reger M, Marley A, Fan H, Liu Z, Zhang J. Vitamin kintake and prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and Ovarian cancer (PLCO) screening trial, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2019,109(2):392-401.
103. Xia J, Ozaki I, Matsushashi S, Kuwashiro T, Takahashi H, Anzai K, et al. Mechanisms of pkc-mediated enhancement of hif-1 $\alpha$  activity and its inhibition by vitamin k2 in hepatocellular carcinoma cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019;20(5):1022.

104. Duan F, Yu Y, Guan R, Xu Z, Liang H, Hong L. Vitamin K2 induces mitochondria-related apoptosis in human bladder cancer cells via ROS and JNK/p38 MAPK signal pathways, *PLoS ONE*, 2016,11(8):1-20.
105. Jiang Y, Yang J, Yang C, Meng F, Zhou Y, Yu B, et al. Vitamin K4 induces tumor cytotoxicity in human prostate carcinoma PC-3 cells via the mitochondria-related apoptotic pathway, *Pharmazie*, 2013,68(6).
106. Baran I, Ganea C, Scordino A, Musumeci F, Barresi V, Tudisco S, et al. Effects of Menadione, Hydrogen Peroxide, and Quercetin on Apoptosis and Delayed Luminescence of Human Leukemia Jurkat T-Cells, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2010,58(3).
107. Akiyoshi T, Matzno S, Sakai M, Okamura N, Matsuyama K. The potential of vitamin K3 as an anticancer agent against breast cancer that acts via the mitochondria-related apoptotic pathway, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2009,65(1).
108. Clarke PGH. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms, *Anatomy and Embryology*, 1990,181.
109. Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs, *Anti-Cancer Drugs*, 1994,5.
110. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 1972,26(4).
111. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*, 2001,2(1):91-5.
112. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous nuclease activation, *Nature*, 1980,284:555–6.
113. Öztürk F. Apoptoz. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 2002,9(2).
114. Tomatir AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2003,23(6):499-508.
115. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, 1995;267(5203): 1456-62.

116. Farber E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis, *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, 1994,7(5),605-9.
117. Akşit H, Bildik A. Apoptozis, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008,19(1):55–63.
118. Ross MH, Pawlina W. Histology. Lippincott Williams. 2006.
119. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates, *Cell Death & Differentiation*, 2017,24(8):1380–9.
120. Verbrugge I, Johnstone RW, Smyth MJ. SnapShot: Extrinsic apoptosis pathways, *Cell*, 2010,143(7):1192-1192.
121. Kuan NK. Apoptosis: Programmed Cell Death, *Archives of Surgery*, 1998,133(7):773.
122. Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji, Atlas Kitap. Nobel Tıp Kitabevleri. 2015.
123. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease, *The Lancet*, 1993,341(8855):1251–4.
124. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2008,19(2):73-78.
125. Dinçel GÇ, Kul O. Patolojik Apoptozis Ve Tanı Yöntemleri, *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2016,5(1):86-108.
126. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy, *Nature Cell Biology*, 2013,15(7):713-720.
127. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the Integrated Stress Response, *Molecular Cell*, 2010,40(2),280-293.
128. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis, *Molecular Cancer*, 2015,14(1),1-14.
129. Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: Targeting apoptosis, necroptosis and autophagy, *Oncogene*, 2012,31(49),5045-5060.

130. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 2012,12(6),401-410.
131. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 2013,13:11–26.
132. Dönmez HG, Demirezen Ş, Beksaç MS. WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2011,25(3),189-199.
133. Rubio C, Rosiles-Abonce A, Trejo-Solis C, Rubio-Osornio M, Mendoza C, Custodio V, et al. Increase Signaling of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway and Presence of Apoptosis in Cerebellum of Kindled Rats, *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 2017,16(7).
134. Singla A, Wang J, Yang R, Geller DS, Loeb DM, Hoang BH. Wnt signaling in osteosarcoma, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020:125-139.
135. Vilchez V, Turcios L, Marti F, Gedaly R. Targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment, *World Journal of Gastroenterology*, 2016,22(2):823.
136. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: Complexity at the surface, *Journal of Cell Science*, 2006,119(3):395-402.
137. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: Processing, secretion and reception, *Oncogene*, 2006,25(57):7461-8.
138. Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: The good and the bad, *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008,40(7):577-94.
139. Altınok B, Sunguroğlu A. Wnt sinyal yolağı ve kanser, *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 2016,15(2), 27-38.
140. Teo JL, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010,62(12):1149-1155.
141. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon: Functions and mechanisms of  $\beta$ -catenin-independent Wnt signaling, *Developmental Cell*, 2003,5(3):367–377.

142. Fang F, VanCleave A, Helmuth R, Torres H, Rickel K, Wollenzien H, et al. Targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human osteosarcoma cells, *Oncotarget*, 2018,9(95):36780-92.
143. Onyido EK, Sweeney E, Nateri AS. Wnt-signalling pathways and microRNAs network in carcinogenesis: Experimental and bioinformatics approaches, *Molecular Cancer*, 2016,15(1).
144. Stratford Wessel E, Daffinrud J, Munthe E, Castro R, Waaler J, Krauss S, et al. The tankyrase-specific inhibitor JW74 affects cell cycle progression and induces apoptosis and differentiation in osteosarcoma cell lines, *Cancer Med*, 2014,3(1):36-46.
145. Xie X, Li Y, Zhu H, Kuang Z, Chen D, Fan T. Prognostic significance of  $\beta$ -catenin expression in osteosarcoma: A meta-analysis, *Frontiers in Oncology*, 2020,10(402):1-7.
146. Aslantürk ÖS. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages, *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*, 2018,2:64-80.
147. Sánchez-Palencia DM, Bigger-Allen A, Saint-Geniez M, Arboleda-Velásquez JF, D'Amore PA. Coculture assays for endothelial cells-mural cells interactions, *Methods in Molecular Biology*, 2016:35-47.
148. Paschos NK, Brown WE, Eswaramoorthy R, Hu JC, Athanasiou KA. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015,9(5),488-503.
149. Taneli F. "Flow" Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2007;5(2):75–82.
150. Gelmez MY, Deniz G. Akan Hücre Ölçer ve Kullanım Alanları, *Ürolojik Cerrahi Derneği Güncelleme Serileri*, 2020,9(2):9–13.
151. Kanev M, Gökalp Muranlı F. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, *SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2015,20(1):33-38.
152. Topaloğlu U, Ketani MA, Saruhan BG. Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2017,10(1):62-71.

153. Kim SH, Shin KH, Moon SH, Jang J, Kim HS, Suh JS, et al. Reassessment of alkaline phosphatase as serum tumor marker with high specificity in osteosarcoma, *Cancer Medicine*, 2017,6(6):1311-22.
154. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples, *PLoS ONE*, 2014,9(5):e96801.
155. Wang Y, Chu Y, Yue B, Ma X, Zhang G, Xiang H, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote osteosarcoma proliferation and metastasis by activating the STAT3 pathway, *Oncotarget*, 2017,8(14):23803.
156. Gwendal L, Paula Y L. Recent discoveries concerning the tumor - mesenchymal stem cell interactions, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2016,1866(2),290-299.
157. Barcellos-de-Souza P, Gori V, Bambi F, Chiarugi P. Tumor microenvironment: Bone marrow-mesenchymal stem cells as key players, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2013,1836(2),321-335.
158. Rhee KJ, Lee JI, Eom YW. Mesenchymal stem cell-mediated effects of tumor support or suppression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(12).
159. le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of Human Mesenchymal Stem Cells and Future Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2005,11(5):321–34.
160. Farahmand L, Esmaeili R, Eini L, Majidzadeh-A K. The effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on proliferation and apoptosis of breast cancer cell line, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2018,14(2):341.
161. Liu C, Billet S, Choudhury D, Cheng R, Haldar S, Fernandez A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells interact with head and neck squamous cell carcinoma cells to promote cancer progression and drug resistance, *Neoplasia (United States)*, 2021,23(1):118-28.
162. Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy JM, Curran C, et al. Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: Stimulation of

- epithelial to mesenchymal transition (EMT), *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010,124(2),317-326.
163. Lin S, Zhu B, Huang G, Zeng Q, Wang C. Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote U2OS cell growth under hypoxia: the role of PI3K/AKT and HIF-1 $\alpha$ , *Human Cel.*. 2019,32(1):64–74.
164. Qi J, Zhang R, Wang Y. Exosomal miR-21-5p derived from bone marrow mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting PIK3R1, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021,25(23):11016–30.
165. Qi J, Zhou Y, Jiao Z, Wang X, Zhao Y, Li Y, et al. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Tumor Growth Through Hedgehog Signaling Pathway, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017,42(6):2242–54.
166. Bruno S, Collino F, Deregibus MC, Grange C, Tetta C, Camussi G. Microvesicles Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit Tumor Growth, *Stem Cells and Development*, 2013,22(5):758–71.
167. Aslam N, Abusharieh E, Abuarqoub D, Alhattab D, Jafar H, Alshaer W, et al. An In Vitro Comparison of Anti-Tumoral Potential of Wharton’s Jelly and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Exhibited by Cell Cycle Arrest in Glioma Cells (U87MG), *Pathology and Oncology Research*, 2021,27.
168. Attar-Schneider O, Zismanov V, Drucker L, Gottfried M. Secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells: an emerging player in lung cancer progression and mechanisms of translation initiation, *Tumor Biology*, 2016,37(4), 4755-4765.
169. Prasad KN, Edwards-Prasad J, Sakamoto A. Vitamin K3 (menadione) inhibits the growth of mammalian tumor cells in culture, *Life Sciences*, 1981,29(13):1387-1392.
170. Su WC, Sun TP, Wu FYH. The in vitro and in vivo cytotoxicity of menadione (vitamin K3) against rat transplantable hepatoma induced by 3’-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene, *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 1991,7(9), 454-459.
171. Suttie JW, Booth SL. Vitamin K, *Advances in Nutrition*, 2011,2(5):440–1.

172. Li L, Qi Z, Qian J, Bi F, Lv J, Xu L, et al. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma Smmc-7721 cells by vitamin K2 is associated with p53 and independent of the intrinsic apoptotic pathway, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010,342(1–2).
173. Zenmyo M, Komiya S, Hamada T, Hiraoka K, Kato S, Fujii T, et al. Transcriptional activation of p21 by vitamin D3 or vitamin K2 leads to differentiation of p53-deficient MG-63 osteosarcoma cells, *Human Pathology*, 2001,32(4):410–6.
174. Akdoğan M, Yöntem M. Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2018;3(1),36-45.
175. Pietrovito L, Leo A, Gori V, Lulli M, Parri M, Becherucci V, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote invasiveness and transendothelial migration of osteosarcoma cells via a mesenchymal to amoeboid transition, *Molecular Oncology*, 2018,12(5):659–76.
176. Lin L, Huang K, Guo W, Zhou C, Wang G, Zhao Q. Conditioned medium of the osteosarcoma cell line U2OS induces hBMSCs to exhibit characteristics of carcinoma-associated fibroblasts via activation of IL-6/STAT3 signalling, *Journal of Biochemistry*, 2020,168(3):265-271.
177. Wang YM, Wang W, Qiu ED. Osteosarcoma cells induce differentiation of mesenchymal stem cells into cancer associated fibroblasts through Notch and Akt signaling pathway, *Int J Clin Exp Pathol*, 2017,10(8):8479–86.
178. Johnson DE, O’Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018,15(4),234-248.
179. Zarogoulidis P, Yarmus L, Darwiche K, Walter R, Huang H, Li Z, et al. Interleukin-6 cytokine: A multifunctional glycoprotein for cancer, *Immunome Research*, 2013,9(62),16535.
180. Cortini M, Massa A, Avnet S, Bonuccelli G, Baldini N. Tumor-activated mesenchymal stromal cells promote osteosarcoma stemness and migratory potential via IL-6 secretion, *PLoS ONE*, 2016,11(11): e0166500.
181. Tu B, Peng ZX, Fan QM, Du L, Yan W, Tang TT. Osteosarcoma cells promote the production of pro-tumor cytokines in mesenchymal stem cells by inhibiting their osteogenic

- differentiation through the TGF- $\beta$ /Smad2/3 pathway, *Experimental Cell Research*, 2014,320(1):164-173.
182. Luo J, Chen XQ, Li P. The Role of TGF- $\beta$  and Its Receptors in Gastrointestinal Cancers, *Translational Oncology*, 2019,12(3),475-484.
183. Barger A, Graca R, Bailey K, Messick J, de Lorimier LP, Fan T, et al. Use of alkaline phosphatase staining to differentiate canine osteosarcoma from other vimentin-positive tumors, *Veterinary Pathology*, 2005,42(2):161-65.
184. Sternberg RA, Pondenis HC, Yang X, Mitchell MA, O'Brien RT, Garrett LD, et al. Association between Absolute Tumor Burden and Serum Bone-Specific Alkaline Phosphatase in Canine Appendicular Osteosarcoma, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2013,27(4):955-963.
185. Ekren Aşıcı GS. Zoledronik Asidin D-17 Köpek Osteosarkoma Hücre Hattında Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Veteriner) Programı, Doktora Tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2019.
186. Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, et al. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U2OS in comparison to human osteoblasts, *Anticancer Res*, 2004,24(6):3743–8.
187. Kim EJ, Bu SY, Sung MK, Choi MK. Effects of Silicon on Osteoblast Activity and Bone Mineralization of MC3T3-E1 Cells, *Biological Trace Element Research*, 2013,152(1):105–12.
188. Liu N, Shi S, Deng M, Tang L, Zhang G, Liu N, et al. High levels of  $\beta$ -catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway, *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011,26(9).
189. Chen Z, He X, Jia M, Liu Y, Qu D, Wu D, et al.  $\beta$ -catenin Overexpression in the Nucleus Predicts Progress Disease and Unfavourable Survival in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis, *PLoS ONE*, 2013,8(5).

190. Haydon RC, Deyrup A, Ishikawa A, Heck R, Jiang W, Zhou L, et al. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the  $\beta$ -catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma, *International Journal of Cancer*, 2002,102(4):338–42.
191. Wu XY, Hao CP, Guo CH, Ma W. Expressions of ADM and  $\beta$ -catenin in human osteosarcoma and their clinical significance, *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2016,37(2):268–72
192. Li F, Chen X, Shang C, Ying Q, Zhou X, Zhu R, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-Derived Extracellular Vesicles Promote Proliferation, Invasion and Migration of Osteosarcoma Cells via the lncRNA MALAT1/miR-143/NRSN2/Wnt/ $\beta$ -Catenin Axis, *OncoTargets and Therapy*, 2021,14:737–49.
193. Letamendia A, Labbé E, Attisano L. Transcriptional regulation by smads: Crosstalk between the TGF- $\beta$  and Wnt pathways, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 2001,83:31-39.
194. Zhou S. TGF- $\beta$  regulates  $\beta$ -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011,112(6).
195. Choi HK, Kim GJ, Yoo HS, Song DH, Chung KH, Lee KJ, et al. Vitamin C activates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis via Wnt/ $\beta$ -catenin/ATF4 signaling pathways, *Nutrients*, 2019,11(3):506.
196. Muralidhar S, Filia A, Nsengimana J, Pozniak J, O'Shea SJ, Diaz JM, et al. Vitamin D–VDR signaling inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin–mediated melanoma progression and promotes antitumor immunity, *Cancer Research*, 2019,79(23):5986-5998.
197. Al-Hendy A, Diamond MP, Boyer TG, Halder SK. Vitamin D3 inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin and mTOR signaling pathways in human uterine fibroid cells, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2016,101(4):1542-51.
198. Nejak-Bowen KN, Zeng G, Tan X, Cieply B, Monga SP.  $\beta$ -catenin regulates vitamin C biosynthesis and cell survival in murine liver, *Journal of Biological Chemistry*, 2009,284(41):28115-27.
199. Kishore C, Sundaram S, Karunagaran D. Vitamin K3 (menadione) suppresses epithelial-mesenchymal-transition and Wnt signaling pathway in human colorectal cancer cells, *Chemico-Biological Interactions*, 2019,309:108725.