

**KAN DOLAŞIMINDAKİ TÜMÖR HÜCRELERİNİN
UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN LEKTİN BAĞLI
KRIYOJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF LECTIN BOUND CRYOGELS FOR
REMOVAL OF BLOOD CIRCULATING TUMOR CELLS**

Ayşe Feyza KELEŞ

DOÇ. DR. IŞIK PERÇİN DEMİRÇELİK

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

i

ÖZET

KAN DOLAŞIMINDAKİ TÜMÖR HÜCRELERİNİN UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN LEKTİN BAĞLI KRİYOJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Ayşe Feyza KELEŞ

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Işık Perçin Demirçelik

Mayıs 2022, 128 sayfa

Kanser, ölüm nedenleri sıralamasında ikinci sırada yer alan, buna bağlı olarak erken tanı ve tedavinin hayati önem taşıdığı bir hastalık grubudur. Klinikte gelecek vaad eden, bir yöntem olan sıvı biyopsi ile hastadan alınan basit bir kan örneği üzerinden, etkin bir şekilde gerçekleştirilen dolaşan tümör hücreleri (DTH) saptama, yakalama ve ayrıştırması yapılabildiği takdirde, kanserin profilendirilmesinin ve gidişat takibinin yapılabilmesini mümkün kılabilir. Bu hedef doğrultusunda, pek çok farklı prensiplere sahip DTH ayrıştırma tekniği denenmiş ve teknolojiler geliştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında, buldukları birincil tümör bölgesinden ayrılarak dolaşıma karışan ve dolaşımda taşınarak uzak organ metastazına sebep olabilen DTH'lerini yakalayıp ayrıştırmak amacı ile; Concanavalin A (Con A) lektinini ligand olarak içeren, poli(2-hidroksietil metakrilat) PHEMA-BSA (sığır seum albümin) kriyojellerin kullanımına dayalı affinite sistemi geliştirilmiştir. Con A lektininin, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin, normal hücrelerden farklı olarak, değişen yüzey moleküllerini ve artan şeker yapısını etkin bir şekilde tanıma ve bağlanma özellikleri, bu çalışmadaki affinite kromatografisinin temelini oluşturmaktadır. Hedeflenen sistemin etkin bir şekilde

çalışabilmesi adına, ideal kriyojel materyalinin seçilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla; içeriğinde değişen BSA konsantrasyonları içermesi ve BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan glutraldehiti bulundurup bulundurmaması gibi değişkenlere bağlı olarak, farklı özelliklere sahip kriyojel grupları oluşturulmuştur. Söz konusu değişkenlerin kriyojellerin üzerinde yaptığı etkiler; çeşitli karakterizasyon analizleri olan şişme deneyleri, Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleme, Mikro bilgisayarlı tomografi (Mikro-CT) ve Fourier dönüşümlü transform kızılötesi (FTIR) ve *in-vitro* hücre deneyleri olan tripan boyası ile hücre sayımı, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve hücreli örneklerde SEM görüntülemesi sonucunda elde edilen veriler ışığında, kriyojel gruplarının başarılarının birbirleri ile kıyaslanması yoluyla değerlendirilmiştir. Yapılan tüm deneysel çalışmaların ve analiz çalışmalarının sonunda (% 681.4 şişme oranı, % 77.6 makrogözenek miktarı, 1 gram polimer başına 4.478 mg Con A lektini bağlaması ve *in-vitro* deneylerde inkübasyon sürelerinde ortalama en fazla % canlılık oranına sahip), en başarılı kriyojel grubunun: yapısında en yüksek konsantrasyonda BSA'yı ve onun çapraz bağlayıcısı glutraldehiti içeren, Con A bağlı, PHEMA-G-BSA100-ConA olduğu ortaya çıkmıştır. Geliştirilen bu sistem, özellikle metastatik karakterdeki bir meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerini canlı bir şekilde başarıyla tutuklaması sayesinde, söz konusu kanser grupları ile kanser profillendirmesi, kanserin gidişatının belirlenmesi gibi çeşitli tanı ve tedavi çalışmalarında kullanım potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Dolaşan Tümör Hücreleri, DTH, MCF-7, MDA-MB-231, Poli (2-hidroksietil-metakrilat), PHEMA, Sığır Serum Albümin, BSA, Lektin, Concanavalin A, Con A, Affinite Kromatografisi, Lektin Affinite Kromatografisi.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF LECTIN BOUND CRYOGELS FOR REMOVAL OF BLOOD CIRCULATING TUMOR CELLS

Ayşe Feyza KELEŞ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Işık PERÇİN DEMİRÇELİK

Mayıs 2022, 128 pages

Cancer is a group of diseases that ranks second in the list of causes of death and therefore early diagnosis and treatment are of vital importance. Liquid biopsy, which is a promising method in the clinic, makes it possible to profile the cancer and following its prognosis, if effective detection, capture and separation of circulating tumor cells (CTCs) can be performed on a simple blood sample taken from the patient. Cause of this goal, many different principles of CTC separation techniques have been tried and technologies have been developed. In this thesis study, with the aim of catching and separating CTCs that leave the primary tumor region, carried in the blood stream and cause metastasis: An affinity system based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) PHEMA cryogel containing Concanavalin A (Con A) lectin as ligand has been developed. The ability of Con A lectin, MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells to effectively recognize and bind thanks

to their changing surface molecules and increasing sugar structure, unlike normal cells, is the basis of the affinity chromatography in this study. In order for the affinity system to work effectively, the selection of the ideal cryogel material is great importance. For this purpose: Cryogel groups with different properties were created depending on variables such as varying bovine serum albumin (BSA) concentrations in its content and whether it contains glutaraldehyde, which is the crosslinker of BSA. The effects of these variables on cryogels; Comparison of the success of cryogel groups with each other in the light of data obtained as a result of various characterization analyzes (Swelling experiments, SEM imaging, Micro-CT and FTIR) and in-vitro cell experiments (cell counting with Trypan blue, MTT and SEM imaging in cellular samples). Evaluated through at the end of all experimental and analysis studies, the most successful cryogel group, so the ideal material is: PHEMA-G-BSA100-ConA with Con A bound, containing the highest concentration of BSA and its crosslinker glutaraldehyde in its structure. (Swelling rate of 681.4%, macropore amount of 77.6%, binding of 4.478 mg Con A lectin per 1 gram polymer, and having the highest average % viability in in-vitro experiments in incubation times). This developed system has the potential to be used in various diagnostic and therapeutic studies such as cancer profiling with these cancer groups.

Keywords: Cancer, Circulating Tumor Cells, CTCs, MCF-7, MDA-MB-231, Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), PHEMA, Bovine Serum Albumin, BSA, Lectin, Concanavalin A, Con A, Affinity Chromatography, Lectin Affinity Chromatography.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleri ile tez çalışmamda bana destek olup, yol gösteren danışmanım Doç. Dr. Işık Perçin Demirçelik'e,

Bana laboratuvarını açan, tez çalışmam boyunca fikir ve önerilerini sunarak çalışmama şekil vermeme katkı sağlayan Doç Dr. Aysun Kılıç Süloğlu'na,

Yoğunluğunun arasında bana vakit ayıran, bilgilerini cömertçe paylaşan ve sorularımı cevapsız bırakmayan Op. Dr. Ömer Yazıcıoğlu hocama,

Yüksek lisans dönemim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan ve desteğini eksik etmeyen kıdemlim Gülsen Bayrak'a,

Tez çalışmamda, yoğun çalışma temposuna rağmen bana yardım eden ve desteğini eksik etmeyen Merve Demir'e,

Yüksek lisansta ve öncesindeki lisans döneminde kendilerinden aldığım derslerle bilime olan merakımı arttıran, bilgilerinden yararlandığım Molekür Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma,

Bana bilimi sevdiren, her zaman örnek aldığım babama, farklı bakış açıları ve fikirleri ile hayatımı güzelleştiren annem ve kardeşime, benden sevgilerini ve desteklerini bir an olsun esirgemedikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamıza FYL-2021-19083 no'lu proje kapsamında destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Hidrojeller	5
2.2. Kriyojeller.....	6
2.2.1. Kriyojellerin Sınıflandırılması.....	7
2.2.1.1. Polimer Kaynaklarına Göre Kriyojeller.....	7
2.2.1.1.1. Doğal Polimerler İle Sentezlenen Kriyojeller.....	7
2.2.1.1.2. Sentetik Polimerler İle Sentezlenen Kriyojeller...8	
2.2.1.2. Polimer İçeriklerine Göre Kriyojeller.....	10
2.2.1.3. Çapraz Bağlanma Türüne Göre Kriyojeller.....	10
2.2.1.3.1. Fiziksel Çapraz Bağlanma.....	10
2.2.1.3.2. Kimyasal Çapraz Bağlanma.....	11
2.2.1.4. Fiziksel Görünümlerine Göre Kriyojeller.....	11
2.2.1.5. Mekanik Özelliklerine Göre Kriyojeller.....	12
2.2.2. Kriyojellerin Sentezi.....	12
2.3. PHEMA Temelli Kriyojeller.....	16
2.4. Albümin Temelli Kriyojeller.....	16

2.5. Biyoayrım Aracı Olarak Kriyojeller.....	17
2.6. Kromatografi.....	17
2.6.1. Kromatografik Alanda Kriyojellerin Kullanım Avantajları.....	19
2.6.2. Kromatografik Uygulamalar İçin Kriyojellerin Fonksiyonlandırılması.....	20
2.7. Affinite Kromatografisi.....	21
2.7.1. Affinite Kromatografisi İle Protein Ayırıştırma Uygulamaları.....	23
2.7.2. Affinite Kromatografisi İle Hücre Ayırıştırma Uygulamaları.....	24
2.8. Lektinler.....	28
2.8.1. Concanavalin A (Con A).....	30
2.9. Lektin Affinite Kromatografisi.....	31
2.10. Kanser.....	32
2.10.1. Meme Kanseri.....	34
2.10.1.2. Meme Kanserinin Moleküler Alt Tipleri ve Klinik Gidişatı.....	35
2.10.1.2.1. Lüminal Alt Tipler.....	37
2.10.1.2.2. HER2'den Zengin Alt Tipler.....	37
2.10.1.2.3. Bazal Alt Tipler.....	37
2.10.1.3. Meme Kanseri Alt Tiplerinin Tedavisi.....	37
2.10.1.4. Meme Kanserinin Evrelemesi.....	38
2.10.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri.....	38
2.10.3. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücreleri.....	39
2.10.4. Dolaşan Tümör Hücreleri (DTH).....	40
2.11. Tam Kan Örneklerinden DTH'ni Saptama, Yakalama ve Ayırıştırma.....	41
2.11.2. İmmünoaffinite Temelli Ayırıştırma Teknikleri.....	46

2.11.2.1. İmmünoaffinitede Pozitif Zenginleştirme Teknikleri.....	47
2.11.2.1.1. Mikrofluidik Sistemler.....	48
2.11.2.1.1.1. Nanomateryaller İle Mikrofluidik Sistemler.....	48
2.11.2.1.2. İmmünomanyetik ile Pozitif Zenginleştirme.....	49
2.11.2.2. İmmünoaffinitede Negatif Zenginleştirme Teknikleri.....	50
2.11.2.2.1. İmmünomanyetik İle Negatif Zenginleştirme....	50
2.11.3. İmmünoaffinite Temelli Tekniklerin Avantaj Ve Dezavantajları....	51
2.11.4. Boyut Temelli Ayırıştırma Teknikleri.....	52
2.11.4.1. Mikrofiltre İle DTH Ayırıştırma Teknikleri.....	53
2.11.4.2. Yoğunluk Temelli DTH Ayırıştırma Teknikleri.....	54
2.11.5. Boyut Temelli Tekniklerin Avantaj Ve Dezavantajları.....	54
2.12. DTH'ni Saptama, Yakalama ve Ayırıştırmanın Gelecek Potansiyelleri...55	
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	56
3.1. Kullanılan Materyaller.....	56
3.2. PHEMA-BSA Kriyojellerin Sentezlenmesi Ve Con A Bağlanması.....	57
3.2.1. PHEMA-BSA Kriyojellerin Sentezi.....	58
3.2.2. PHEMA-BSA Kriyojellerin Yüzey Aktifleştirilmesi.....	60
3.2.3. PHEMA-BSA Kriyojellere Con A Bağlanması.....	61
3.3. PHEMA-BSA Kriyojellerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	61
3.3.1. Şişme Deneyleri.....	61
3.3.1.1. Jelleşme Verimi (%).....	61
3.3.1.2. Şişme Oranı (%).....	62
3.3.1.3. Makrogözenek Miktarı (%).....	62
3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	62
3.3.2.1. SEM Görüntülemeleri İçin Kriyojel Örneklerinin Hazırlanması....	63

3.3.3. Mikro Bilgisayarlı Tomografi (Mikro-CT).....	63
3.3.4. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektrofotometresi İle Yapı Analizi..	64
3.3.5. Bradford Deneyi İle Kriyojellerin Yapısına Katılan BSA'nın Analizi.....	64
3.3.6. PHEMA-BSA Kriyojellerin Con A Bağlama Başarı Analizi.....	64
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	65
3.4.1. MCF-7 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Çoğaltılması.....	66
3.5. PHEMA-BSA Kriyojeller İle In-Vitro Hücre Kültürü Deneyleri.....	66
3.5.1. Sterilizasyon.....	66
3.5.2. Kriyojellerin Hücre Süspansiyonu İle Muamele Edilmesi.....	67
3.5.3. Tripan Mavisini İle Canlılık Testi Ve Hücre Sayımı.....	70
3.5.3.1. PHEMA-BSA Kriyojelin Hücre Süspansiyonundan MCF-7 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerini Bağlama Kapasitelerinin Araştırılması.....	70
3.5.4. 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) Hücre Canlılık Analizi.....	71
3.5.5. SEM Analizi.....	73
3.5.5.1. Hücreli Kriyojel Örneklerinin SEM İçin Hazırlanması.....	73
3.6. İstatistiksel Analiz.....	74
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	75
4.1. PHEMA-BSA Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	75
4.1.1. PHEMA-BSA Kriyojellerin Şişme Davranışları.....	77
4.1.1.1. Jelleşme Verimi (%) Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	78
4.1.1.2. Şişme Oranı (%) Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	79
4.1.1.3. Makrogözenek Miktarı (%) Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	80

4.1.2. PHEMA-BSA Kriyojellerin SEM İle Yüzey Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	81
4.1.3. PHEMA-BSA Kriyojellerin Mikro-CT Sonuçları.....	85
4.1.4. PHEMA-BSA Kriyojellerin FTIR İle Yapı Analizi Sonuçları.....	87
4.1.5. Bradford Deneyi İle Kriyojel Yapısına Katılan Kimyasalların Analiz Sonuçları.....	90
4.1.6. Con A Bağlanmasının Değerlendirilmesi	91
4.2. Hücre Kültür Çalışmaları.....	92
4.2.1. MCF-7 Ve MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinin Morfolojik Görüntüleri.....	92
4.3. PHEMA-BSA Kriyojeller İle In-Vitro Hücre Kültürü Deneyleri Sonuçları.....	93
4.3.1. Tripan Mavisı Boyası İle Hücre Sayımı Sonuçları.....	93
4.3.1.2. PHEMA-BSA Kriyojellerin Hücre Bağlayabilme Başarılarının Değerlendirilmesi.....	95
4.3.2. MTT İle Canlılık Analizi Sonuçları.....	97
4.3.2.1. Con A'nın Kanser Hücreсі Yakalama Başarısının MTT Analizi İle Değerlendirilmesi Analizi.....	97
4.3.2.2. PHEMA-BSA Kriyojel Affinite Sisteminde MCF-7 Ve MDA-MB-231 Hücrelerinin Bağlanma Başarısının Değerlendirilmesi İçin MTT Analizi.....	99
5. YORUM.....	101
6. KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kriyojellerin, hidrojellere karşı sahip olduğu avantajlar.....	6
Şekil 2.2. Kriyojellerin bazı kullanım alanları.....	7
Şekil 2.3. Kriyojellerin sentezlenme basamakları.....	12
Şekil 2.4. Affinite kromatografisi.....	21
Şekil 2.5. Lektinlerin kullanım alanları.....	29
Şekil 2.6. Lektin affinite kromatografisi.....	31
Şekil 2.7. Kanser hücrelerinin değişen yüzey özellikleri.....	33
Şekil 2.8. Tümör kitlesinden yeni damar oluşumu ve metastaz ile uzak organlara yayılımı.....	33
Şekil 2.9. Sağlıklı meme kanseri hücresi ve tümör hücresinin karşılaştırılması.....	34
Şekil 2.10. Meme kanseri alt tipleri.....	36
Şekil 2.11. Dolaşan tümör hücresinin uzak organ metastazı.....	40
Şekil 2.12. Sıvı biyopsi ve geleneksel biyopsinin karşılaştırılması.....	41
Şekil 2.13. DTH saptama, yakalama ve ayırıştırma teknikleri.....	42
Şekil 2.14. DTH yakalama teknolojilerinin karşılaştırılmasında yararlanılan parametreler.....	44
Şekil 2.15. İmmünoaffinite tekniklerinden pozitif ve negatif zenginleştirmenin karşılaştırılması.....	46
Şekil 2.16. Boyut temelli ayırıştırma teknikleri.....	52
Şekil 3.1. Karakterizasyon çalışmalarının genel özeti: 1) ve 2) PHEMA temelli kriyojellerin sentezlenmesi; 3) Kriyojellerin yüzey aktivasyonu ve Con A bağlanması; 4) Kriyojellerin karakterizasyon analizleri.....	57
Şekil 3.2. Kriyojel sentezine katılan kimyasal materyaller.....	59
Şekil 3.3. Hücre kültürü çalışmalarının özeti: MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğaltılması, hücre süspansiyonu hazırlanarak kriyojellerle muamele	

edilmesi ve hücre süspansiyonundan kanser hücrelerinin bağlanması amacı ile kriyojellerin kullanılabilirliğinin kontrolü amaçlı test ve analizler.....	65
Şekil 3.4. Sterilizasyon amaçlı kriyojel gruplarının UV'de bekletilmesi.....	67
Şekil 3.5. a) Devamlı sistemde kullanılacak kartuş sisteminin hazırlanması; b) Kartuş sistemine çalışacak kriyojel grubunun yerleştirilmesi.....	68
Şekil 3.6. a) Devamlı sistem için kartuş ve peristaltik pompanın kurulması; b) Deney düzeneğinin kurularak hücre süspansiyonunun kartuştan geçirilmesi.....	69
Şekil 3.7. Farklı kriyojel gruplarının, bağladıkları meme kanseri hücrelerinin canlılıklarının bir göstergesi olarak mor renkte formazan kristalleri oluşturması sonucunda mor/kahve renklere boyanması.....	72
Şekil 3.8. % Canlılık analizi için örneklerin, 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarında, mikropalak okuyucuda spektrofotometrik ölçüme hazır hale getirilmesi.....	72
Şekil 4.1. PHEMA kriyojel gruplarının, a) su alarak şişmiş; b) sıkılmış; c) kuru görüntüleri.....	76
Şekil 4.2. Kriyojel gruplarının jelleşme verimi (%) grafiği.....	78
Şekil 4.3. Kriyojel gruplarının şişme oranı (%) grafiği.....	79
Şekil 4.4. Kriyojel gruplarının makrogözenek miktarı (%) grafiği.....	80
Şekil 4.5. a) PHEMA, b) PHEMA-BSA25, c) PHEMA-BSA50, d) PHEMA-BSA75, e) PHEMA-BSA100 kriyojel gruplarının SEM görüntüleri: 200 µm.....	82
Şekil 4.6. a) PHEMA-G; b) PHEMA-G-BSA25; c) PHEMA-G-BSA50; d) PHEMA-G-BSA75; e) PHEMA-G-BSA100 kriyojel gruplarının SEM görüntüleri: 200 µm.....	83
Şekil 4.7. SEM görüntüleri: a) MDA-MB-231, PHEMA-G (100 µm); b,c) MCF-7, PHEMA-G (100,10 µm); d,e) MDA-MB-231, PHEMA-G-BSA100-ConA (100,10 µm); f,g) MCF-7, PHEMA-G-BSA100-ConA (50, 10 µm).....	84
Şekil 4.8. a) PHEMA-G; b) PHEMA-G-BSA100 kriyojellerinin Mikro-CT görüntüleri.....	85
Şekil 4.9. PHEMA-G kriyojelinin Mikro-CT analiz sonuçlarına bağlı gözenek boyut/dağılım analizi.....	86

Şekil 4.10. PHEMA-G-BSA100 kriyojelinin Mikro-CT analiz sonuçlarına bağlı gözenek boyut/dağılım analizi.....	86
Şekil 4.11. PHEMA kriyojelin FTIR analizi sonucu.....	88
Şekil 4.12. PHEMA-BSA kriyojelin FTIR analizi sonucu.....	88
Şekil 4.13. PHEMA-G-BSA kriyojelin FTIR analizi sonucu.....	89
Şekil 4.14. BSA'nın FTIR analizi sonucu.....	89
Şekil 4.15. Kriyojel gruplarının BSA sızıntısı sonuçları.....	90
Şekil 4.16. Kriyojellerin ConA'yı Yapılarına Katma Başarıları.....	91
Şekil 4.17. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü.....	92
Şekil 4.18. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü.....	93
Şekil 4.19. Tripan mavisi boyası ile hücre süspansiyonundan MCF-7 meme kanseri hücrelerinin sayımı.....	94
Şekil 4.20. Tripan mavisi boyası ile hücre süspansiyonundan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin sayımı.....	94
Şekil 4.21. a) MCF-7, b) MDA-MB-231 hücrelerinin kriyojel grupları tarafından bağlanma başarıları.....	96
Şekil 4.22. Kriyojel gruplarının değişen inkübasyon süresine bağlı % canlılık analizi sonuçları.....	98
Şekil 4.23. PHEMA-G ve PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel gruplarına bağlanan MCF-7 hücrelerinin, değişen inkübasyon sürelerine bağlı % canlılık analizi sonuçları.....	100
Şekil 4.24. PHEMA-G ve PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel gruplarına bağlanan MDA-MB-231 hücrelerinin, değişen inkübasyon sürelerine bağlı % canlılık analizi sonuçları.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Doğal ve sentetik polimerler.....	9
Çizelge 2.2. Kriyojel sentezi teknikleri.....	13
Çizelge 2.3. Kriyojellerin sentez koşullarında yapılan değişiklikler ve bunların kriyojeller üzerindeki etkisi.....	15
Çizelge 2.4. Kromatografik tekniklerin bazı avantaj ve dezavantajları.....	18
Çizelge 2.5. Affinite temelli ayırıştırma sistemlerinde kullanılan ligandlar ve hedef molekülleri.....	22
Çizelge 2.6. DTH saptama, yakalama ve ayırıştırma amacıyla geliştirilen teknolojiler....	43
Çizelge 3.1. Sentezlenen kriyojel gruplarının içerikleri.....	60
Çizelge 3.2. SEM analizi için kullanılan hücrelerin ve kriyojellerin tipleri.....	73
Çizelge 4.1. Şişme deneyleri sonuçları.....	77
Çizelge 4.2. Kriyojel grupları.....	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
g	Gram
mg	Miligram
cm	Santimetre
mm	Milimetre
μ	Mikro
kDa	Kilo dalton
μm	Mikro molar
mL	Mililitre
μL	Mikro litre
μg	Mikro gram
M	Molar
m _t	Polimer çözeltisindeki monomerlerin toplam kütlesi
m _{ıslak}	Islak durumdaki kriyojelin ağırlığı
m _{şışmış}	Şişmiş durumdaki kriyojelin ağırlığı
m _{sıkılmış}	Sıkılmış durumdaki kriyojelin ağırlığı
(v/v)	Hacim/Hacim oranı
(w/v)	Ağırlık/Hacim oranı
(w/w)	Ağırlık/Ağırlık oranı

Kısaltmalar

DTH	Dolaşan Tümör Hücreleri
BSA	Sığır Serum Albümin
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	Meme kanseri hücre hattı
Con A	Concanavalin A
UPS	Ultra saf su
APS	Amonyum Per Sülfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilen Diamin
ECM	Ekstraselüler Matriks
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FSS	Fetal Sığır Serum
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HEMA	2 -Hidroksietil metakrilat
PHEMA	Poli (2-hidroksietil-metakrilat)
PEGDA	Poli Etilen Glikol Diakrilat
FTIR	Fourier dönüşümlü transform kızılötesi
Mikro-CT	Mikro bilgisayarlı tomografi
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımına göre, kanser; vücutta herhangi bir organ veya dokudan başlayabilen, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak, komşu yapılara veya uzak organlara yayılımı (metastaz) ile karakterize, tedavi edilmez ise ölümle sonuçlanabilen geniş bir hastalık grubudur. Kanser tüm dünyadaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. 2018 yılındaki verilere göre, her altı ölümden birinin nedeni olarak, toplam 9.6 milyon kişinin hayatını kaybetmesine neden olan bir hastalıktır [1]. Bu nedenle toplum sağlığı ve sağlık harcamaları üzerine etkisi çok büyüktür. Kanser tedavisindeki en önemli problemler; tanının yeterince erken konamaması, kanser tiplendirilebilmesi için birçok detaylı testlerin gerekliliği ve risk altındaki kişiler için uygun tarama testlerinin olmamasıdır. Dolayısıyla günümüzde, bu kısıtlılıkların giderilerek, kanserin erken tanısını koymada, risk altındaki özel grupları taramada, kanser tiplerini ve tedavi duyarlılıklarını belirlemede, tedavi edilmiş kişilerde nüksleri saptamada hasta için herhangi bir risk taşımayan, yeterince duyarlı ve özgül laboratuvar testlerine büyük bir ihtiyaç vardır.

DTH, tümör kitlelerinden kan dolaşımına geçen hücrelerdir. Tümörden dolaşıma geçtikten sonra DTH, çok kısa bir süre içerisinde (1-2,5 saat) mekanik etkiler veya immün sistemin etkisiyle yok olurlar [2]. Bununla birlikte DTH'nin küçük bir bölümü canlılığını devam ettirir ve uzak organ metastazlarına neden olur. Günümüz teknolojisi moleküler ve fonksiyonel düzeyde DTH'nin saptanmasına olanak veren metodlar geliştirmiştir [3]. Önplana çıkan metodlar; hücre zenginleştirilmesi, izolasyonu ve analizi ile ilişkilidir [4]. Bu metodlar kanser biyolojisi ile ilgili bilgileri geliştirmeye yardım etmektedir. DTH'nin dolaşımdaki diğer hücreler arasından yakalanıp saptanmasıyla ilgili pek çok farklı teknik vardır. Örneğin; araştırmalarda kullanılan, kısmen standartlaşmış DTH tespit tekniklerinden CellSearch, AdnaTest ve ISET teknikleri tümör hücrelerinde ekspresyonu artan moleküllerden EpCAM (epitelyal selüler adezyon molekülü) aracılığıyla DTH izole etmektedir [5]. Bu nedenle bu testler EpCAM bağımlıdır ve EpCAM eksprese etmeyen hücreleri saptayamaz. Bu da bu yöntemlerin kısıtlılığıdır. Biyofiziksel özelliklere dayalı olan diğer testlerin de sadece hücre morfolojisindeki farklılıklara dayalı izolasyon yaptığı için düşük özgüllük, yüksek kontaminasyon riski ve DTH kaybı gibi birçok kısıtlılıkları

vardır. Literatürde meme kanserinde, prostat kanserinde ve kolorektal kanserlerde DTH saptanmasıyla ilgili çalışmalar mevcuttur [6]. DTH'nin doğru ve duyarlı bir biçimde saptanabilmesi; kanserin erken tanınmasında, hızlı ve kolayca karakterize edilmesinde, tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde, klinik gidişatı belirlemede ve nükslerin öngörülmesinde büyük potansiyele sahiptir. Fakat yeterli duyarlılığa sahip bir metodun henüz bulunamamış olması, rutin pratiğe girmesini engellemekte ve halen çalışma konusu olmaktan öteye gidememesine neden olmaktadır [7].

Metastatik kanseri olan bir hastada 7.5 mL kanda 5-50 adet DTH bulunmaktadır [8]. DTH'nin dolaşımında bu kadar düşük düzeyde bulunmaları nedeniyle milyarlara periferik kan hücresi arasından saptanmaları çok zor olmaktadır. Bu düşük sayılar, DTH'nin klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bu kadar çok sayıdaki kan hücresi içerisinden, çok az sayıdaki DTH'nin özgül bir şekilde ayrıştırılarak izole edilmesini sağlayacak yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla kan gibi viskoz vücut sıvılarıyla çalışma imkanı sunan geniş gözeneklere sahip kriyojeller, potansiyel bir kullanım alanı sağlayabilir.

Hidrojel sınıfının üyelerinden olan kriyojel; birbirleriyle bağlantılı geniş gözenekli, hidrofilik yapıda, elastik fakat mekanik olarak dayanıklı, şekil hafızasına sahip jellerdir [9]. Bu özellikleri sayesinde kromatografi, biyomedikal terapi, doku mühendisliği gibi pek çok farklı alanda kullanım olanağına sahiptir. Kriyojellerin fiziksel özellikleri (yapımında kullanılan polimerler, çözücü seçimi, çapraz bağlayıcı mekanizması, sıcaklığı ve dondurma süresi/hızı gibi çeşitli parametreleri) değiştirilerek kullanılacak alana ve hedeflenen amaca uygun hale getirilebilmeleri mümkündür [10].

Kriyojellerin yapısına katılan polimerler; doğal ve sentetik polimerler olarak ikiye ayrılır. Doğal Polimerler; bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilir. Ekstraselüler matriksin fiziksel ve kimyasal özelliklerine benzer oluşuyla kullanım avantajı sağlar. Kollajen, jelatin, kitosan, alginat, nişasta, ipek fibroini doğal polimerlere örnektir. Sentetik Polimerler; laboratuvar ortamında sentezlenir. Fiziksel özelliklerinin ayarlanabilir oluşu en büyük avantajlarından. Poli (2-Hidroksietil-Metakrilat)

(PHEMA), Poli Vinil Alkol (PVA), Poliglikolitik Asit (PGA) sentetik polimerlere örnektir [9, 10].

PHEMA Kriyojel; elastik olmasının yanında mekanik olarak da sağlam ve biyouyumlu oluşu ile birçok alanda (implantlar, kontak lens yapımı gibi) tercih edilen bir malzemedir. Literatürdeki çeşitli çalışmalarda, PHEMA kriyojel, birbiriyle bağlantılı geniş gözenekleri ve ince polimer duvarlı elastik yapısı sayesinde, kan hücrelerinin ve kan proteinlerinin kolayca geçişine izin veren bir malzeme olup, ligand olarak kullanılan çeşitli moleküllerle fonksiyonlandırılarak kandaki çeşitli maddelerin kandan izole edilmesinde kullanılmıştır. Örneğin; insan plazmasından bilirubinin adsorbe edilerek temizlenmesinde [11] ve yine insan plazmasından immunoglobulin G'nin ayrıştırılmasında PHEMA kriyojel başarıyla kullanılmıştır [12].

Lektin, Latince'de seçmek, ayırmak anlamına gelen "legere" kelimesinden köken almaktadır [13]. Lektinler, hücre yüzey moleküllerini özgül bir şekilde tanıma ve onlara bağlanma potansiyeline sahip glikoproteinlerdir [14]. Bu özellikleri sayesinde lektinler, bu hücrelerin kümelenmesine neden olurlar. Tüm canlı türlerinde (hayvan, bitki, bakteri, virüs) birçok farklı lektin tipleri bulunmaktadır. Çok geniş bir aralıktaki biyolojik aktiviteler ile lektinleri ilişkilendiren çalışmalar vardır [14]. Bunlardan bazıları; savunma mekanizmaları, hücre çoğalma/kontrollü hücre ölümü, hücre tanınması, hücre farklılaşması ve hücre-hücre etkileşimleridir.

Lektinlerin insan diyetindeki ana kaynağı bitkilerdir. Çoğu lektin sindirilmeye dirençli olup, gastrointestinal sistem yüzeyindeki hücrelere bağlanarak dolaşıma girer. Lektinlerin, dolaşım sisteminde lenfosit, eritrosit, trombosit, bakteri ve tümör hücrelerinin özgül kümeleşmesi gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir [15]. Bu nedenle, bazı bitki lektinlerinin farklı kanser hücre tiplerine karşı, sahip olduğu kendine özgü karakteristik özelliklerinden ötürü, normal ve değişime uğramış hücreleri ayırt edebilmektedir. Ayrıca bazı lektin tipleri, tümör hücrelerinin, birlikte bulunduğu diğer hücrelerden ayırt edilerek izole edilmesinde kullanıldığına dair literatürde örnek çalışmalar da mevcuttur.

Tez çalışması kapsamında, lektinlerin kanser hücrelerini ayırt edebilme özelliğinden yararlanılarak, kriyojel temelli bir affinite sisteminin geliştirilmesi planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; değişen BSA konsantrasyonlarında hazırladığımız PHEMA temelli kriyojel gruplarına, Concanavalin A (Con A) adlı lektini bağlanmış ve bunu takip eden *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile kriyojellerin, kanser hücrelerini, buldukları ortamdan tutuklayarak uzaklaştırmasını sağlayan bir sistemin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hidrojeller

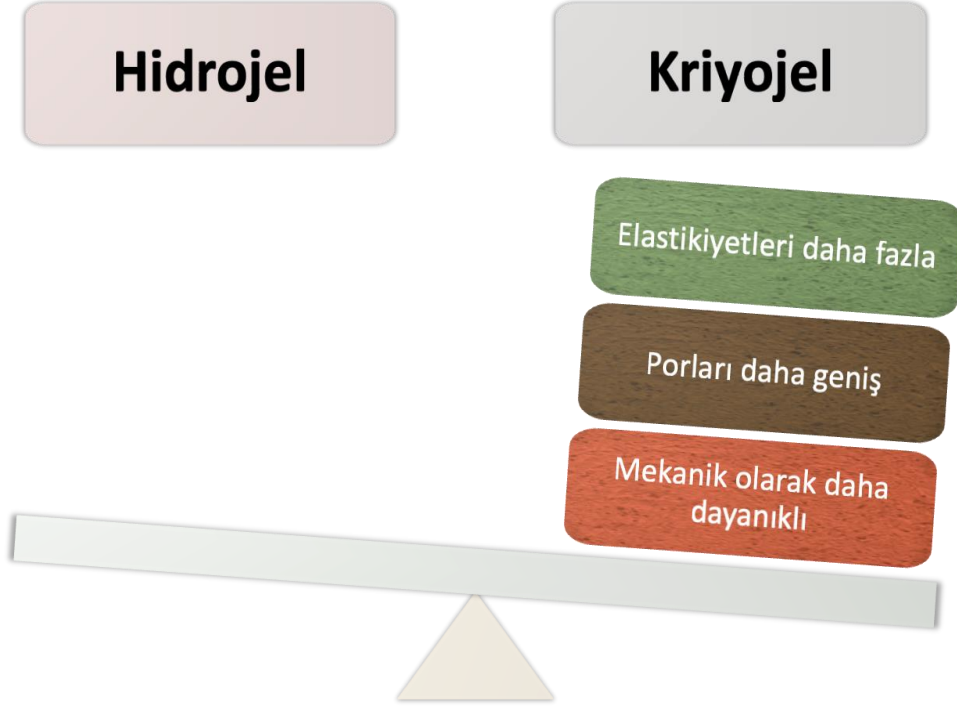
Hidrofilik yapıdaki jeller olan hidrojeller, en basit anlatımla, su ile şişen polimer ağ yapılarıdır. Hidrojeller için yapılan en yaygın tanım: “Bir veya birden fazla monomerin basit reaksiyonu sonucunda oluşan çapraz bağlı ve üç boyutlu polimerik ağ yapısı” şeklindedir. Hidrojeller, her ne kadar bünyesinde önemli miktarda suyu hapsederek şişme özelliğine sahip olsalar da suda erimezler [16]. Ayrıca hidrojellerin kimyasal yapıları, mekanik kuvvetlerini belirlemenin yanında, hücre içi ve hücre dışı taşıma özelliklerini belirlemede etkin bir rol oynar [17].

İdeal bir hidrojel materyalinin, yüksek absorpsiyon yani su tutma kapasitesine sahip olmasının yanında, kullanım alanına bağlı olarak arzu edilen absorpsiyon hızını da gösterebilmesi beklenmektedir. Ayrıca ucuz, mekanik olarak dayanıklı, renksiz, kokusuz, nötral pH olmalı ve toksik olmamalıdır [18]. Fakat ne yazık ki, herhangi bir hidrojel örneğinin bu ideal özelliklerin hepsine aynı anda ve tam olarak sahip olması mümkün değildir. Bu yüzden değişkenlerin uygun bir dengeyi sağlayacak şekilde optimize edilmesi gerekir, fakat bu da oldukça zorlu bir süreçtir. Bir örnek üzerinden açıklanacak olursa; bir hidrojinin, çok yüksek oranda emici özelliğe sahip olması beklenirken aynı zamanda absorbe ettiği solüsyonu da bünyesinden salmaksızın hapsedebilmelidir. Oysa ilaç salımı amacı ile kullanılan hidrojellerin gözenekli olması ve pH, ısı gibi uyarılara da yanıt vererek salım gerçekleştirmesi gerekmektedir.

Porozite ve partikül ağ tipi, hidrojellerin sınıflandırılmasında önde gelen kriterlerden ikisidir. Bu açıdan bakıldığında, hidrojellerin gözeneklerinin boyutları, gerek kesintisiz bir akıma izin vermesi, gerek de biyomoleküller ile etkileşimlerini mümkün kılması açısından oldukça önem taşımaktadır [10]. Fakat hidrojellerin birbirleriyle bağlantılı makrogözeneklerinin olmaması ve elastikiyetleri, onların birçok farklı biyomedikal alanda kullanımını engellemektedir [19].

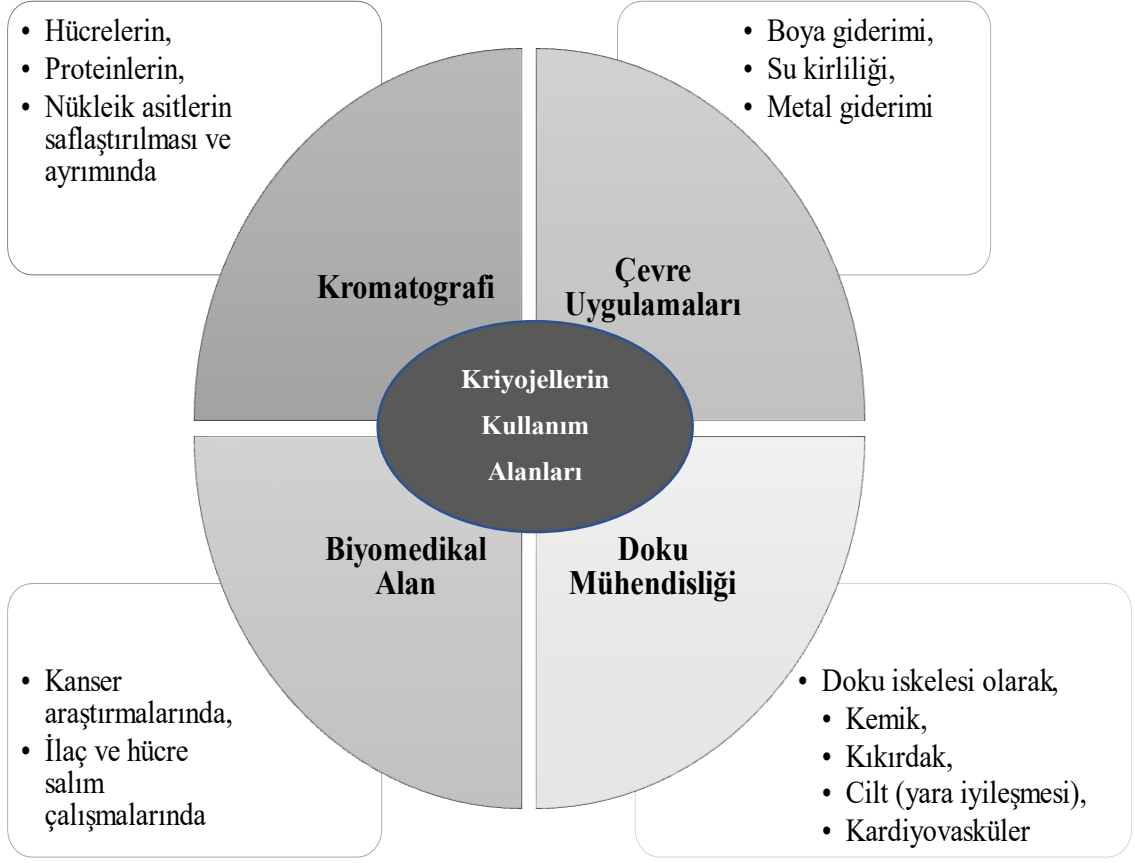
2.2. Krijojeller

Hidrojellerin alt sınıfı olan, kriyojellere duyulan ilgi 1980'li yıllarda artmaya başlamış olup, o zamandan bu yana da kriyojeller sayesinde pek çok farklı çalışma alanında önemli gelişmeler sağlanmıştır. Aşağıdaki görselde kriyojellerin, hidrojellere kıyasla sahip oldukları avantajlar gösterilmiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kriyojellerin, hidrojellere karşı sahip olduğu avantajlar [20,21].

Kriyojeller; birbirleri ile bağlantılı geniş gözeneklere sahip, hidrofilik yapıda, yüksek su tutma kapasitesine sahip, yumuşak/elastik yapıda, mekanik olarak dayanıklı, şekil hafızasına sahip olma özelliklerinin yanı sıra, yüksek biyoyumlulukları ve ekstraselüler matriks (ECM) yapısına benzerlikleri nedeniyle de oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptirler [9, 20, 21]. Kriyojellerin bazı kullanım alanları aşağıda şema haline getirilmiştir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Kriyojellerin bazı kullanım alanları [21].

2.2.1. Kriyojellerin Sınıflandırılması

2.2.1.1. Polimer kaynaklarına göre kriyojeller

Doğal ve sentetik polimerler kullanılarak sentezlenen kriyojeller olmak üzere ikiye ayrılırlar. Çizelge 2.1.'de doğal ve sentetik polimerler ve kullanım alanları özetlenmiştir.

2.2.1.1.1. Doğal polimerler ile sentezlenen kriyojeller

Bitkiler ve hayvanlar gibi doğal kaynaklardan elde edilen polimerler; biyouyumlu, biyobozunur ve ekstraselüler matriksi (ECM) taklit edebilme özelliklerinden ötürü doku mühendisliği gibi alanlarda oldukça dikkat çekmektedir [22-26]. Jelatin, agaroz, pektin çalışmalarda sıklıkla kullanılan doğal polimerlere örnektir.

2.2.1.1.2. Sentetik polimerler ile sentezlenen kriyojeller

Doğal polimerlerin sınırlı kaynakları, kolayca denatüre olabilmeleri, yetersiz mekanik özellikleri ve kontrol edilebilirliklerinin düşük olması gibi kısıtlılıkların üstesinden gelecek yeni materyal arayışları başlamıştır. Böylece 1960'lı yıllardan itibaren, sentetik polimerler ilgiyi üzerlerine çekmeyi başarmıştır [27-29]. Bu durum kriyojellerin tamamen sentetik polimerlerle ya da doğal polimerlerle birlikte sentezlenebilmesini mümkün kılmıştır. Sentetik kriyojeller, ayarlanabilir fiziksel ve parçalanma özelliklerine sahip olmalarının yanında, artan su tutma kapasitesileri ve yüksek jel kuvvetine sahip olmaları sayesinde ortam sıcaklığındaki ani ve belirgin dalgalanmalara karşı da dayanıklı materyallerdir [30]. Bu sebeplerden ötürü biyomedikal alanda büyük bir ilgi görmüştür. Fakat kullanımlarına dair kısıtlılıklar mevcuttur. Bunlardan en bariz olanı; biyoadeziv ve biyoaktivite özelliklerinin olmayışı ve iskele amaçlı kullanımlarda doku reddi gibi sorunlarla karşılaşılma riskidir [31, 32]. Poli (2-hidroksietil-metakrilat) (PHEMA) ve Poli etilen glikol diakrilat (PEGDA) çalışmalarda sıklıkla kullanılan sentetik polimerlere örnektir.

Çizelge 2.1. Doğal ve sentetik polimerler [22, 23, 33-49].

Polimer Tipi	Temel Özellikleri	Kullanım Alanları
Doğal Polimerler		
Protein ve Peptit Temelli		
Kolajen	ECM'nin ana bileşenidir. ECM'yi taklit edebilir, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarabilir. Asidik solüsyonlarda eriyebilir. Doğal olarak parçalanabilir.	Doku mühendisliği (kemik, sinir, kırık) ve Yara örtüsü materyali
Jelatin	Denatüre bir kollajen analogudur. Kollajene kıyasla düşük maliyet, stabilite, eriyebilirlik, saflık, kararlılık ve daha az immunojenik özellik gibi avantajları vardır.	Doku mühendisliği (kemik, kırık, kalp, cilt), İlaç salım sistemleri ve Bivoreaktör.
Platelet Lizat	Kandan elde edilen otolog bir üründür. Yeni damar oluşumu ve yara iyileştirmesinde faydalı olabilen önemli miktarda büyüme faktörü ve sitokin içerir. Hemostatik ve antibakteriyel özelliktedir.	Yara örtüsü materyali
İpek Fibrini	İpek, esas olarak serisin ve fibrin materyallerini içerir.	Kemik doku mühendisliği
Albumin	Elastik, biyouyumlu, hücrelerin tutuklanmasını destekler nitelikte ve nispeten ucuz olması ile de tercih edilen bir materyaldir.	Hücre kültürü, Moleküler biyoloji ve Saptama teknikleri
Polisakkarit Temelli		
Agaroz	Lineer bir polisakkarittir. 65 santigrat derecenin üzerinde suda erir, 17-40 derece arasında jelleşebilir. Biyouyumlu bir materyaldir.	Doku mühendisliği (kırık, sinir) ve İlaç taşıma materyali
Korragenan	Kalınlaştırıcı ve jelleştirici özelliklerinin yanında aynı zamanda antimikrobiyal bir materyaldir.	Yara örtüsü materyali ve Kemik doku yenilenmesi
Kitosan	Kırık ECM'sinde bulunan glikozaminoglikanların analogudur, bu nedenle ECM'yi taklit edebilir. Yüksek biyouyumluluk ve absorpsiyon özelliklerine sahiptir. Lizozomlar tarafından kolayca parçalanabilir.	Doku mühendisliği (kemik, sinir, cilt), Affinite sistemleri, Yara örtüsü ve Kontakt lens
Dekstran	Suda eriyebilen, bakteriyel kökenli bir polisakkarittir. Diğer polimerler için toksik olmayan özelliktedir.	Besin endüstrisi, Biyotıp ve Nanotıp
Pektin	Suda eriyebilen ve pek çok bitkinin hücre duvarı yapısında bulunan bir polisakkarittir. Düşük toksisite ve yüksek biyouyumluluğa sahiptir.	Besin endüstrisi ve Biyomedikal

Glikozamin Temelli		
Kondroitin Sülfat	Eklem kıkırdağının önemli bir bileşeni olup sıkıştırmaya direnç özelliğinin önemli miktarından sorumludur. Jelatin ve kitosan gibi polimerlerle bir arada kullanılabilir.	Kıkırdak doku iskelesi
Hyalüronik Asit	Cilt ve göz lensindeki bağ dokusunun ana bileşenlerinden biridir. Yüksek adsorbsiyon kapasitesine sahip ve dayanıklıdır.	Doku mühendisliği (sinir, kalp, cilt, kemik, kıkırdak) ve Biyomedikal
Sentetik Polimerler		
PEGDA	Yüksek biyouyumluluk, makrogözeneklere sahip olma ve kuvvetli mekanik elastisite nedeniyle enjekte edilebilir uygulama sistemleri olarak uygundur	Doku mühendisliği (kıkırdak, kemik, cilt, sinir) ve İlaç taşıma
PHEMA	Yüksek biyouyumluluk ve su tutabilme kapasitesine sahiptir. Toksik olmaması önemli bir avantajıdır. Ligand olarak çeşitli moleküllerle fonksiyonlandırılabilir.	Doku mühendisliği (kıkırdak, kemik) ve Affinite sistemleri

2.2.1.2. Polimerik içeriklerine göre kriyojeller

Homopolimerik (tek bir monomer türünden üretilen polimer ağına sahip), Kopolimerik (en az biri hidrofilik karakterde olan iki veya daha fazla farklı monomer türünden üretilen polimer ağına sahip) ve Multipolimerik (iki bağımsız çapraz bağlı sentetik veya doğal polimer içeriğinden üretilen polimer ağına sahip) kriyojeller olarak üçe ayrılırlar [50-52].

2.2.1.3. Çapraz bağlanma türüne göre kriyojeller

Kimyasal çapraz bağlı ağ yapısına sahip (kalıcı bağlantılar içeren) ve Fiziksel çapraz bağlı ağ yapısına sahip (geçici bağlantılar içeren) kriyojeller olarak ikiye ayrılırlar [50].

2.2.1.3.1. Fiziksel çapraz bağlanma

Hidrojen bağları, protein etkileşimleri, hidrofobik polisakkaritler, iyonik etkileşimler, kristalizasyon gibi zayıf etkileşimlerle oluşturulurlar. Bu şekilde oluşturulan polimer ağı yapısı, tamamen fiziksel olduğu için, bu jeller geri dönüşümlüdür [53]. Fiziksel kriyojellerin sentezi için polimer seçiminde dikkat edilmesi gereken başlıca kriterler: Polimer ağ yapısının arasında kurulacak kuvvetli fakat kovalent olmayan etkileşimler ve önemli miktar su absorblayarak bünyesinde tutabilen, kararlı yapıda, 3 boyutlu hidrofilik jel yapısının oluşturulabilmesidir [50].

Fiziksel kriyojellerin sentezinde, buz kristalleri oluşumunu takiben fiziksel çapraz bağlanma veya önceden oluşturulmuş fiziksel çapraz bağlı hidrojelini dondurulup eritilmesi yöntemlerine başvurulur [10]. Her ne kadar kriyojel iskeleler, fiziksel çapraz bağlanma aracılığı ile

oluşturulabilse de, genellikle gözenek boyutları 10 mikrondan daha küçük olacağından, bu şekilde sentezlenen jellerin doku mühendisliğinde kullanımları sınırlıdır.

2.2.1.3.2. Kimyasal çapraz bağlanma

Her ne kadar fiziksel çapraz bağlanma, kriyojel üretimi için oldukça basit ve hızlı bir işlem olsa da, fiziksel kriyojellerin jel özellikleri zayıf ve güvenilmez olduğundan bazı kullanım kısıtlılıkları vardır. Bunun aksine kimyasal çapraz bağlı kriyojeller, genellikle fiziksel olarak daha kararlı olmalarının yanı sıra, daha öngörülebilir özelliklere de sahiptirler.

Mevcut olan farklı metodların arasından, serbest polimer radikalizasyonu son yıllarda en çok dikkat çeken metoddur [54]. Bu yöntem, öncü polimer veya monomerlerin reaksiyonuna yol açarak, buz kristallerinin çevresinde sürekli bir polimer ağı gelişimini sağlayan serbest radikallerin oluşturulmasını esas alır [10]. Foto-polimerizasyon bir diğer radikal polimerizasyon yolu ile kriyojel sentezi yöntemidir. Bu yöntemde, başlatıcı ışığa maruz kaldığında yapısı bozulur [55]. Fakat kompleks ve zahmetli bir deney ortamına ihtiyaç duyulur, öyle ki 0'ın altındaki sıcaklıklarda bir ışık kaynağı kullanmak gerekir. Bu kısıtlılıktan ötürü olmalıdır ki, bu yöntem ile kriyojel sentezine dair literatürde yeterli miktarda doküman bulunmamaktadır [56].

Kimyasal çapraz bağlanma mekanizması için bahsedilecek son yöntem, Michael tip reaksiyonlarını esas alır [57]. Bu yöntem kullanılarak sentezlenen kriyojeller oldukça elastik ve dayanıklı olmalarının yanı sıra, pH bağımlı olarak şişip parçalanabilirler. Ayrıca farklı sıcaklıklarda depo ve salım amaçlı kullanılabilirler [57-59]. Tüm bu özellikler, bu kriyojelleri, doku mühendisliği ve ilaç salımı için uygun seçenekler haline getirmektedir.

2.2.1.4. Fiziksel görünümlerine göre kriyojeller

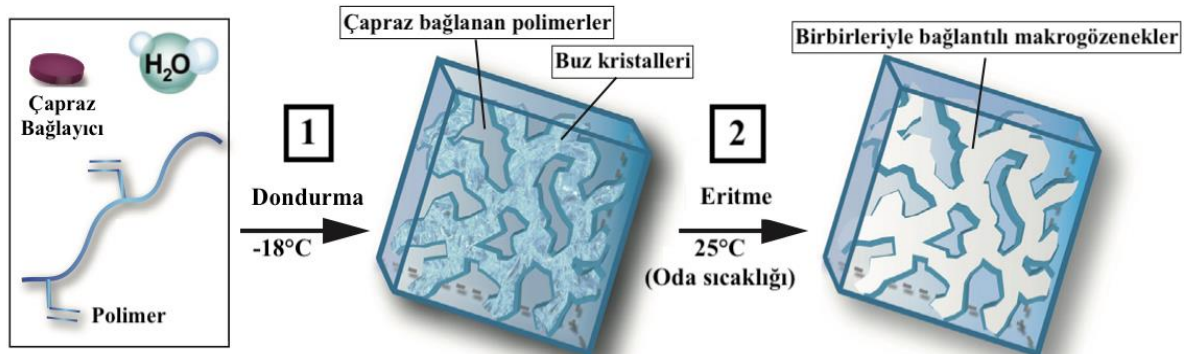
Kriyojeller polimerizasyon ve sentezlenme süreçlerine bağlı olarak hedeflenen kullanım alanlarına göre farklı şekil ve boyutlarda oluşturulabilirler: Çubuk, matriks, film, disk, mikroküre bunlara örnektir.

2.2.1.5. Mekanik özelliklerine göre kriyojeller

Kriyojelin hedeflenen alanda kullanımında mekanik özellikleri de büyük önem taşır. Örneğin; Doku mühendisliği uygulamalarında iskele materyali olarak kullanılacak ideal kriyojelin, sıkıştırıcı kuvvetlere karşı dayanıklılığının yüksek olması arzu edilir. Damarsal doku mühendisliği gibi alanlarda kriyojellerin elastikiyet özellikleri büyük önem taşır [54].

2.2.2. Kriyojellerin Sentezi

Aslında “kriyojel” kelimesinin bizzat kendi köküne ve anlamına bakmak, bizlere kriyojellerin sentezi hakkında bir tanım sunabilmektedir. Öyle ki, “kryos” Yunanca’da “donmuş” anlamına gelirken, “jel” ise “yarı-katı materyal oluşturmada kullanılan madde” anlamına gelmektedir. Yani kriyojeller, 0’ın altındaki sıcaklıklarda, kontrollü polimerizasyon yolu ile birbirleriyle bağlantılı makrogözenekler ağı oluşturarak sentezlenen jellerdir [16, 60, 61].



Şekil 2.3. Kriyojellerin sentezlenme basamakları [61].

Makrogözenekli kriyojellerin farklı teknikler kullanılarak sentezlenebilmeleri mümkündür. Bunlar arasında en sık kullanılanlar: Gaz Köpürtme, Tuz/Gözenek Oluşturucu, Dondurma-Kurutma, Dondurma-Eritme teknikleridir. Bu teknikler, aşağıda verilen Çizelge 2.2.'de özetlenmiştir.

Kriyojel Sentezleme Teknikleri	Genel Bilgi
Gaz Köpürtme Tekniği	<ul style="list-style-type: none">- Makrogözenekli jellerin üretiminde kullanılan yöntemlerden biridir.- Yöntem, gaz baloncukları etrafında polimer ağı oluşturulmasına dayanır.- En sık kullanılan gaz oluşturan ajan, asidik ortamda karbondioksit oluşumunu sağlayan, sodyum bikarbonattır.- Bu yöntemin kısıtlılığı; kontrolsüz, düzensiz ve birbirleri ile bağlantıları zayıf gözenekler oluşturmasıdır.
Tuz/Gözenek Oluşturucu Teknik	<ul style="list-style-type: none">- Gerek basitliği gerek de düşük maliyetli oluşu nedeniyle iskele hazırlamada yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir.- Yöntem, uygun bir çözücüye daldırılarak çözdürülen tuz partiküllerinin ve polimerik mikrokürelerin, mikro veya makro boyuttaki gözenekli ağ yapısının oluşturulmasına dayanır.
Dondurma-Kurutma Tekniği	<ul style="list-style-type: none">- Yöntem, önceden oluşturulmuş hidrojele, birden fazla dondurma-kurutma döngüsü uygulanmasına dayanır.- Dondurulma sıcaklıkları, gözeneklerin boyut ve şeklini belirlemede büyük önem taşır.- Bu yöntem ile oluşturulan kriyojeller, genellikle katıdır, mekanik olarak zayıf olmasının yanında şekil değiştirememekte ve yapısal bütünlüğünü de kolayca kaybedebilmektedir.

Dondurma- Eritme Teknikleri	<p>- Yöntem, başlangıçtaki çözelti karışımı önce dondurulup ardından oluşan çözücü kristallerin eritilmesine dayanır. Bu yöntem ile oluşturulan çapraz bağlı polimer duvarları sayesinde bu işlemin sonucunda, elastik ve şekil hafızasına sahip sünger benzeri yapıdaki kriyojeller oluşturulur. Formülasyonu iyi ayarlanabilirse bu kriyojeller, herhangi bir kalıcı hasara uğramaksızın büyük hacimsel deformasyonlara karşı oldukça dayanıklıdırlar. Bu özellikleri sayesinde de enjekte edilebilmeleri mümkündür.</p> <p>- Bir başka dondurma-eritme yöntemi, her bir dondurma basamağından sonra yüksek ve düşük sıcaklıkların tekrarlanmasını esas alan döngüsel kriyojelasyondur. Bu yöntemde her bir döngü, polimer ağı içerisinde hidrojen bağlarının artışına neden olmasının sonucunda, mekanik olarak daha kuvvetli, ısı iletebilen, homojen polimer ağına sahip kriyojeller oluşturulabilmesini mümkün kılar.</p> <p>- Son dondurma-eritime yöntemi ise, kriyojelasyon içinde kriyojelasyon tekniği olup önceden oluşturulan kriyojel materyalinin gözenekleri içerisinde kriyojelasyonun gerçekleştirilmesini esas alır. Bu yöntemin kullanılması sonucunda ise, mekanik olarak daha kuvvetli kriyojeller üretilmektedir.</p>
--	--

Kriyojelasyon, jel solüsyonun dondurulduktan sonra çözücü kristallerin eritilme veya kurutulma yolları ile ayrıştırılması işlemini tarif eder. Kriyojelasyon işlemi (0'ın altındaki sıcaklıklarda jelleşme) için çözücü kristaller kullanılır ve bu donmuş kristallerin çözünmesiyle geniş ve birbirleriyle bağlantılı geniş gözenekler oluşur. Diğer sentez yöntemleri ile kıyaslandığı takdirde kriyojelasyon, farklı özellikteki kriyojel materyallerin sentezine olanak sağlayan kolay, zaman ve kaynakların kullanımı açısından da oldukça avantajlı bir yöntemdir [67]. Gözenek boyutları ve aralarındaki bağlantılar, özellikle doku mühendisliğinde kriyojellerin kullanımı açısından önemli iki özelliktir. Bu özellikler; jelden, metabolit ve oksijen transportunu kolaylaştırırken, hücrelerin jel materyale yerleşmesini ve kan damarlarının oluşumunu da destekler [54, 65, 68].

Dahası, kriyojelin sentezlenme aşamasında, bazı parametreler değiştirilerek kriyojellere farklı özellikler kazandırılabilmesi de mümkündür. Örneğin: Çapraz bağlama teknikleri değiştirilerek jelin gözenek yapıları, başlangıç polimer solüsyonu değiştirilerek jelin gözenek boyut ve bağlantıları, kriyojelasyon sıcaklığı değiştirilerek jelin gözenek boyutları, dağılımı, oryantasyonu, gözeneklerin birbirleriyle bağlantıları ve duvar yapıları, polimer molekül ağırlığının viskoziteye etkisinden ötürü, değiştirilmesi ile jelin fiziksel özellikleri, kriyokonsantrasyonun değiştirilmesi ile jelin fiziksel özellikleri, soğutma hızı değiştirilerek

jelin gözenek boyutları ve dağılımı gibi değişkenler sayesinde kriyojeller, hedeflenen alana ve kullanıma uygun modifiye edilebilmektedirler [54, 69-75]. Yukarıda bahsedilen değişkenlerin, kriyojeller üzerindeki etkileri, Çizelge 2.3.'te özetlenmektedir.

Kriyojelasyon tekniklerinin bir diğer gelecek vaad eden önemli özelliği ise, bu şekilde sentezlenen iskelelerin, 64 mm³ hacmine kadar standart bir şırıngadan enjeksiyonunun mümkün olmasıdır. Tüm bu nedenler, kriyojelasyon tekniğini, pek çok biyomedikal uygulama için sıklıkla tercih edilen bir sentez tekniği kılmaktadır [10].

Değişkenler	Kriyojellere Etkisi
Çapraz bağlama tekniği	<ul style="list-style-type: none"> - Fiziksel çapraz bağlantılar, çok büyük olmayan ve yüksek erime hızıyla ters orantılı olan gözeneklere sahip jeller oluşturur. - Kimyasal çapraz bağlantılar, oldukça geniş gözenekli fakat potansiyel sitotoksositeye sahip jeller oluşturur.
Başlangıç polimer solüsyonu	<ul style="list-style-type: none"> - Çözücünün kompozisyonu değiştirilebilir. Suyun yanında farklı çözücüler veya az miktarda tuz eklenerek solüsyonun donma noktası ayarlanabilir. - Polimerin tipi değiştirilebilir.
Kriyojelasyon sıcaklığı	<ul style="list-style-type: none"> - Kriyojelasyon sıcaklığı arttırılırsa; gözenek boyutu, gözeneklerin duvar kalınlığı ve yoğunluğu artar. - Kriyojelasyon sıcaklığı azaltılırsa; gözenek boyutu, gözeneklerin duvar kalınlığı ve yoğunluğu azalır.
Polimerin molekül ağırlığı	<ul style="list-style-type: none"> - Polimer molekül ağırlığı arttırılırsa; solüsyondaki serbest su içeriği azalacağından daha kalın duvarlı, sert ve küçük gözenek yapısına sahip bir jel oluşumu gözlenecektir. - Polimer molekül ağırlığı azaltılırsa; solüsyondaki serbest su içeriği artacağından daha esnek ve büyük gözenek yapısına sahip bir jel oluşumu gözlenecektir.
Kriyokonsantrasyon	<ul style="list-style-type: none"> - Kriyokonsantrasyon arttırılırsa; elastisite artar. - Kriyokonsantrasyon azaltılırsa; jelasyon zamanı uzar.
Soğutma hızı	<ul style="list-style-type: none"> - Soğutma hızı arttırılırsa; polimerizasyon, porojen ya da buz kristali henüz yokken ya da yetersizken gerçekleşeceği için gözenek boyutları azalacaktır. - Soğulma hızı azaltılırsa; daha büyük porojen yani buz kristali oluşumunu sağlayarak daha geniş ve birbirleri

Çizelge 2.3. Kriyojellerin sentez koşullarında yapılan değişiklikler ve bunların kriyojeller üzerindeki etkisi [54, 69-75].

	ile bağlantılı gözenekler ve elastik bir jel yapısı oluşacaktır.
--	--

2.3. PHEMA temelli kriyojeller

PHEMA kriyojeller, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin çapraz bağlanması yolu ile elde edilen sentetik polimer temelli materyallerdir. Elastik olmasının yanında mekanik olarak da sağlam oluşu, yüksek miktarda suyu bünyesinde hapsederek şişebilmesi, biyouyumlu ve kararlı yapıda olması sebebiyle biyomedikal alan başta olmak üzere (örneğin; kontakt lens, kontrollü ilaç salımı, estetik cerrahi operasyonları, diş implantı) pek çok alanda tercih edilen bir materyaldir [76-78]. Literatürde, PHEMA kriyojellerin, birbiri ile bağlantılı geniş gözenekleri ve ince polimer duvarlı elastik yapısı sayesinde, kan hücrelerinin ve kan proteinlerinin kolayca geçişine izin veren bir malzeme olduğuna ve ligand olarak kullanılan çeşitli moleküllerle fonksiyonlandırılarak kandaki çeşitli maddelerin kandan izole edilmesi amacıyla kullanıldığına dair pek çok çalışmaya rastlamak mümkündür [79]. Örneğin; İnsan plazmasından bilirubinin adsorbe edilerek temizlenmesinde [11], yine insan plazmasından immunoglobulin G'nin ayrıştırılmasında, PHEMA kriyojeller başarıyla kullanılmıştır [12].

2.4. Albümin temelli kriyojeller

Albümin, esas olarak karaciğerde hepatositler tarafından sentezlenen endojen bir proteindir. 585 amino asitten oluşur. Molekül ağırlığı 60.4 kDa'dır. Albümin, vücutta oldukça kararlı bir moleküldür. Çünkü metabolize olmaz, immünojenik değildir ve böbrek glomerüllerinden de çok az süzülür. Bu sayede, albümin, 19 gün gibi bir yarılanma ömrüne sahip olup diğer önemli proteinleri, hormonları, metal iyonlarını, nanopartikülleri ve ilaçları stabilize edebilme özelliğine sahip olan çekici bir biyomateryaldir [80].

Biyomedikal araştırmalarda albümin temelli jellerin kullanımı gittikçe artmaktadır. Doğal bir polimer olan albümin kullanılarak sentezlenen, albümin temelli jeller ile yapılmış çalışmaların

önemli bir kısmında sığır serum albümini (BSA) kullanılmaktadır [81]. BSA, sığır kanından elde edilen bir plazma proteini olup çeşitli enzimlerin stabilizatörü olarak etki etmektedir. Bu özelliği sayesinde hücre kültürü, moleküler biyoloji ve saptama teknikleri gibi alanlarda kullanılmıştır [82-85]. Ayrıca BSA içeren jeller, oldukça elastik oluşlarının yanında, biyouyumlu, hücrelerin tutuklanmasını destekler nitelikte ve nispeten ucuz olması ile de tercih edilebilir bir materyaldir.

2.5. Biyoayırım aracı olarak kriyojeller

Tıp, biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve biyokimya gibi pek çok alanda biyomoleküllerin ayrıştırılması adına etkili, güvenilir ve maliyet-etkin teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır. Kriyojeller sergiledikleri yüksek kararlılıkları, geniş ve birbirleri ile bağlantılı gözenekleri ile üstün transport potansiyeline sahiptirler [19]. Şimdiye kadar sağlanan ilerlemeler, kriyojelleri, ticari olarak kullanılabilir hale getirmiş ve ona aktif çalışma alanları sağlamıştır. Örneğin; affinite kromatografi ve moleküler işaretleme gibi alanlarda, kriyojellerin; nanopartikülleri (plazmitleri, hücre organellerini, virüsleri) ve mikropartikülleri (proteinleri, bakteriyel hücreleri, memeli hücrelerini) içeren oldukça geniş bir biyomolekül spektrumunu ayrıştırmada kullanım potansiyelleri taşıdıkları bilinmektedir [86].

2.6. Kromatografi

1903'te botanik alanında çalışan Mikhail Tsvet adlı bilim insanı tarafından geliştirilen, “renk” anlamına gelen “chroma” ve “yazmak” anlamına gelen “graphein” kelimelerinin birleşiminden oluşan kromatografi, ilk olarak renkli bitki pigmentlerini ayırmak amacıyla kullanılmıştır. Ardından hedeflenen örneğin saflaştırılmasına ve analizine olanak sağladığı keşfedilerek biyokimya alanında, biyomolekülleri ayrıştırma amacıyla yaygın olarak kullanılan tekniklerinden biri olmuştur [87].

Kromatografi, biyoayırım amacı ile gözenekli partiküller içeren ve durağan fazı kullanan bir teknik olup, farklı hücre moleküllerin ortamdan ayrıştırılması amacı ile kullanımının pek çok avantajı vardır [88]. Fakat bu teknik, içerdiği bazı kısıtlılıklardan ötürü sahip olduğu potansiyele rağmen, geniş bir kullanım alanı bulamamıştır. Söz konusu kısıtlılıklardan bazıları: Etkin bir kromatografik ayrıştırma işlemi için gerekli özelliklere sahip adsorbanların yokluğu;

Moleküllerin, gözenekler içerisine difüze olmasıyla, ortamın difüzyon direnci göstermeye başlaması ve buna bağlı düşen ayrıştırma hızı; Partiküller arası boşlukların ayrıştırma etkinliğini azaltmasıdır [60, 89]. Çizelge 2.4.'te bazı kromatografik teknikler, onların kullanım avantaj ve dezavantajları kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Kromatografik tekniklerin bazı avantaj ve dezavantajları [90, 91].

Tekniğin Adı	Uygulama Biçimi	Ayrırma Prensibi	Avantaj	Dezavantaj
Affinite Kromatografisi	Kolon Kromatografisi	Affinite için ligand kullanımı	- Yüksek seçicilik - Yüksek saflaştırma kapasitesi - Hızlı ayırım	- Maliyetli olabilen ligandlar
İyon Değişim Kromatografisi	Kolon Kromatografisi	Elektrostatik bağlantılara bağlı değişen pH	- Düşük maliyet - Görece yüksek saflaştırma kapasitesi	- Tampona ihtiyaç duyar - Yalnızca yüklü molekülleri ayırabilir - Tekrar kullanımlarda kısıtlılıklar olabilir
Jel Filtrasyon	Kolon Kromatografisi	Boyut	- Moleküllerde bozunma ya da değişikliğe neden olmaz - Büyük miktarlarda	- Yavaş ayırım - Düşük hassaslık

			karışımla çalışılabilir	
İnce Tabaka Kromatografisi	Düzlemsel Kromatografi	Polariteye bağlı adsorbsiyon	- Düşük maliyetli - Kolay örnek hazırlanımı	- Düşük hassaslık - Küçük miktarda karışımla çalışılabilir

2.6.1. Kromatografik alanda kriyojellerin kullanımının avantajları

Kriyojeller, 10 ile 100 mikron arasında değişen gözenek boyutlarına sahiptirler, bu da diğer jellere kıyasla 100 ile 1000 kat daha geniş bir boyut anlamına gelmektedir [92]. Bu nedenle kriyojellerin makrogözenekli yapıda olduklarını belirtmek mümkündür. Bu geniş gözenek boyutlarından ötürü, kriyojeller; plazma, kan, hayvan ve bitki özütleri gibi saf olmayan viskoz materyallerle de çalışılma potansiyeline sahiptir [31, 93, 94]. Oysa geleneksel kromatografi ortamlarının, bu gibi viskoz ortamlarla, yüksek basınç olmadan veya tıkanmadan çalışmaları beklenemez.

Kriyojellerin, kromatografik alandaki kullanımları ile ilgili olarak diğer önemli avantajları ise, oldukça elastik ve sıkıştırılabilir olmalarıdır. Bu durum, yüksek akım hızı ve düşük basınç altında, laboratuvar işlemlerinin daha kısa sürede gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır: Öyle ki kriyojeller sıkıştırıldığında gözenekler açık kalacağından geriye doğru basınç oluşumunu engellenmektedir [70]. Yapılan bir çalışmada poliakrilamid kriyojelin %60 oranında sıkıştırılıncaya dek çok küçük bir deformasyon gösterdiği, oysa ki klasik poliakrilamid hidrojinin %30'un altında bile deformasyona uğradığı görülmüştür [10]. Yine aynı çalışmada, poliakrilamid kriyojelin %50-60 oranında sıkıştırılıncaya kadar geriye doğru yansıyan bir basınç artışının oluşmadığı görülmüştür.

Daha öncede bahsedildiği üzere, kriyojellerin, polimerlerinin hidrofilik özelliklerinden ötürü, kimyasal olarak kararlı olma özellikleri sayesinde de istenmeyen etkileşimlerin gerçekleşme olasılığı düşüktür [93].

Kriyojellerin gözenek duvarlarındaki yüksek polimer konsantrasyonları, onları mekanik olarak daha kuvvetli kılmaktadır [94]. Bu sürecin işleyişi: Kriyojelasyon sırasında porojenin (çözücü olan suyun) donması ile polimerin gözeneklerin duvarlarına doğru itilmesi şeklindedir. Böylece gözenek duvarlarındaki polimer konsantrasyonunun artması ile doğru orantılı olarak, mekanik kuvvet de artmış olmaktadır [95].

Buna ek olarak, kromatografik ortamlar için gözenekli yapı ne kadar fazla ise gözenek duvarlarındaki yüzey alanı da o kadar artacağı bilinmektedir. Normal şartlarda kriyojeller, 0,9'a kadar gözenekliliğe sahip olabileceklerinden, fonksiyonel liganlarla etkileşimleri ve hedef moleküllerin adsorbsiyonunu gerçekleştirmeleri için sınırlı bir yüzey alanı mevcuttur [92, 96]. Bu nedenle, kriyojellerin hidrodinamik özellikleri değiştirilmeksizin, fonksiyonel yüzey alanını arttırabilmek adına, ideal bir solüsyonun hazırlanması büyük önem taşımaktadır [97-100]. Böylelikle kriyojellerin, hedef moleküllere bağlanma kapasiteleri de belirgin derecede arttırılmış olacaktır. Kriyojeller, yapılarında herhangi bir bozulma olmaksızın kurutulmuş olarak saklanabilmektedirler. Üstelik tekrar kullanımlar için zahmetli protokoller gerektirmeksizin, yalnızca kriyojellere su emdirilerek şişirilmesi yeterlidir [95]. Ayrıca kriyojeller, yeniden kullanıma da uygun materyallerdir [93]. Bazı çalışmalar göstermektedir ki, art arda 10 kez adsorbsiyon-desorbsiyon döngüsünden sonra bile kriyojellerin adsorbsiyon kapasitesinde herhangi bir kayıp yaşanmamaktadır [39, 98, 99, 101].

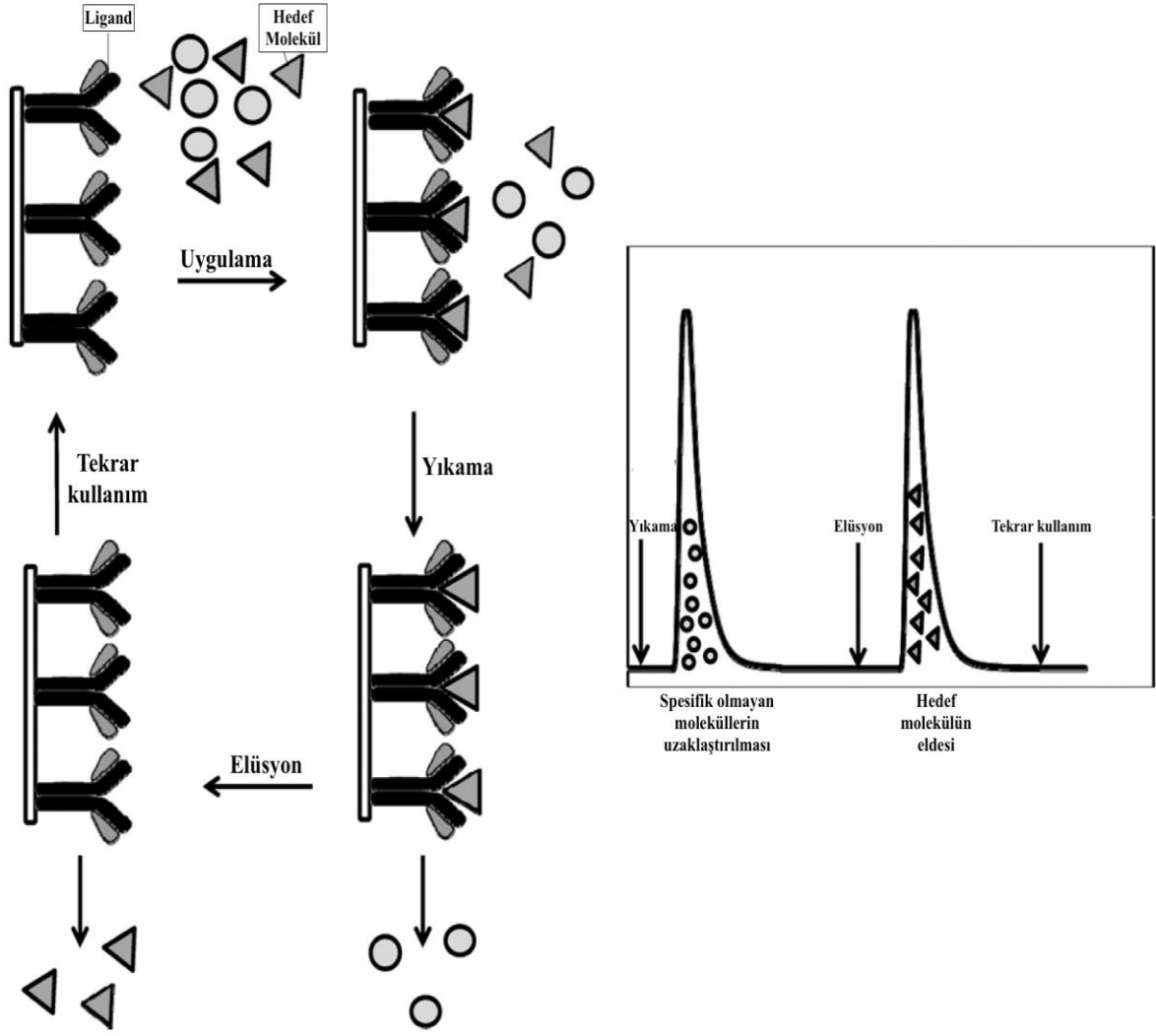
2.6.2. Kromatografik uygulamalar için kriyojellerin fonksiyonlandırılması

Kriyojeller, kimyasal olarak kararlı ve inert oldukları için özel kromatografik kullanımlar için fonksiyonel hale getirilmeleri şarttır [96]. Bu amaç ile genellikle, iki yöntem kullanılmaktadır: Bunlardan ilki, liganın fiziksel olarak hapsedilmesi iken; diğer yöntem ise, liganın, kriyojele (kimyasal olarak eklenmesi) kovalent olarak bağlanması yani immobilizasyonudur [93].

Fiziksel yöntemin bazı kısıtlılıkları mevcuttur: Öncelikle kriyojelasyon için uygun olan sınırlı sayıda fonksiyonel monomer mevcut olduğunu belirtmek gerekir. Ek olarak, bu yöntemle hazırlanan yüksek konsantrasyonlardaki fonksiyonel monomerlerin, elastik olmayan yani kırılğan yapıda kriyojellerin oluşumuna neden olduğu da bilinmektedir. Yöntemle ilişkili son kısıtlılık ise, sıvı, kriyojelden geçerken yani mobil fazda iken, tüm fonksiyonel gruplar ulaşılabilir durumda olamamaktadır [95].

2.7. Affinite kromatografisi

Herhangi bir biyospesifik veya affinite temelli ayırıştırmanın temel konsepti, adsorban yüzeye, hedeflenen molekülün, proteinin veya hücrenin adsorbsiyonu için bir biyolojik reseptör ile onun tamamlayıcı ligandının etkileşimini kullanmaktır [102]. Ardından, bağlanma gerçekleştikten sonra yıkama işlemi yapılarak, bağlanmamış, spesifik olmayan kısımlar uzaklaştırılmaktadır [103]. Böylece hedefe yönelik, seçici bir saflaştırma gerçekleştirilmektedir. Bahsedilen aşamalar Şekil 2.4.'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Affinite kromatografisi [103].

Bu ayırıştırmanın performansı tipik olarak üç parametre tarafından belirlenmekte olup, bunlar: Belli bir zamanda ne kadar fazla sayıda hedef molekülün ayırıştırılabildiği, ayırıştırma sonrası elde edilen örnekte hedef molekülün oranı ve başlangıç örneğinde mevcut olan hedef moleküle kıyasla, ayırıştırma sonrası elde edilen hedef molekülün oranı şeklindedir [104].

Affinite temelli ayırıştırma sistemlerinin çoğunda, hedef moleküllerin sistem tarafından adsorbe edilmesinin ardından, elüsyonu için iki ana yaklaşım mevcuttur. Biyospesifik elüsyonda; tutuklanan hedef molekülü serbestleştirmek adına, yarışmacı bir serbest ligand

kullanılmaktadır. (Çizelge 2.5.'te bu amaçla kullanılan bazı ligandlar ve hedef moleküller verilmiştir.) Biyospesifik olmayan elüsyonda ise; biyospesifik etkileşimi bozmak amacı ile ortam koşullarının değiştirilmekte ve bu amaçla değişen tuz konsantrasyonları, pH ve ısıdan yararlanılmaktadır [102].

Çizelge 2.5. Affinite temelli ayırıştırma sistemlerinde kullanılan ligandlar ve hedef molekülleri [102, 103].

Ligandlar	Hedef Molekülleri
Lektinler	Glikanlar, hücre yüzey proteinleri
Protein	Antikorlar
Antikorlar	Antijenler, virüsler, hücreler
Enzim	Substrat, inhibitör
Hormon ve Vitaminler	Taşıyan proteinler, reseptörler
Şekerler	Lektinler, enzimler
Hücre	Lektinler, hücre yüzeyi spesifik proteinler
Nükleik Asit	Tamamlayıcı sekanslar

2.7.1. Affinite kromatografisi ile protein ayırıştırma uygulamaları

Kriyojelleri kullanarak protein ve peptitleri ayırıştırma amacı ile bazı metodlar geliştirilmiştir. Fakat, anlaşılmıştır ki, kriyojellerin fonksiyonlandırılması, yüksek ayırıştırma verimliliğine ulaşmak için izlenecek en uygun yoldur. Bu amaçla, affinite kromatografisi gibi kriyojel fonksiyonelizasyonu temeline dayanan farklı yaklaşımlar, etkin protein saflaştırması amacı ile kullanılabilir.

Affinite kromatografisi, ilgi duyulan hedef biyomolekülleri (protein, nükleik asit), adsorbe edecek gözenekli bir destek yardımıyla (kriyojel) ve ligandın immobilizasyonu yolu ile selektif bir şekilde izole etmektedir [105].

Affinite kromatografisinde yaygın olarak kullanılan peptid ligandlar ile yapılan işlemlerin komplike olmasının yanında maliyetinin de yüksek olması, bilim insanlarını yeni alternatifler aramaya sevk etmiştir. Bu amaçla bulunan alternatiflerden biri de, hedef proteine selektif olarak bağlanmak için üretilen bakteriyofajlar olmuştur. Fakat bakteriyofajların, büyük boyutları (1 mikron) nedeniyle, standart geleneksel ortamlarda immobilize edilememeleri de bir başka problem olmuştur. Tüm bu problemleri çözmek adına, literatürde kriyojellere başvurulduğu görülmektedir [106]. Kriyojel temelli affinite ortamları, gerek maliyeti daha düşük, gerek de daha basit bir yaklaşım oluşlarından ötürü tercih edilir hale gelmiştir. Bu durumu bir örnek üzerinden açıklayacak olursak: Saf immunoglobulin G (Ig), çeşitli tanısal ve tedavi edici işlemler için ihtiyaç duyulan bir ajandır. İnsan plazmasından Ig saflaştırılması, ticari olarak etanol kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Fakat bunun selektivitesinin düşük olması ile birlikte denatürasyona da neden olması söz konusudur [107]. Buna alternatif bir metod olarak, yapılan çalışmada, protein A'yı PHEMA kriyojele, kovalent bağ ile bağlayarak %85 gibi çok daha yüksek bir adsorbsiyon kapasitesine ulaşmayı başarmışlardır [12].

2.7.2. Affinite kromatografisi ile hücre ayırıştırma uygulamaları

Hücre tanımlama ve sınıflandırma uygulamalarının büyük bir öneme sahip olmasından ötürü; ayırıştırma teknolojilerinin gelişimi; kök hücre, antijen-spesifik B ve T hücreleri ve az sayıda bulunan dolaşan tümör hücreleri (DTH) gibi nadir bulunan hücrelerin ayırıştırılmasına yönelik metodlara odaklanmıştır [108, 109]. Aslında bu oldukça zor bir işlemdir. Çünkü ayırıştırılmak istenen hedef hücreler, buldukları ortamlarda milyonda birden bile daha seyrek oranlarda

bulunmaktadırlar [110]. Örneğin; herhangi bir antijene spesifik olan B hücrelerinin sıklığı genellikle %1'den daha azdır [111].

Hücre ayırıştırma teknolojileri; hedeflenen belirli bir hücre popülasyonunun, analiz ve çoğaltılmasına olanak sağlayan, hücre biyolojisi, immünoloji, kök hücre araştırmaları ve kanser araştırmaları gibi yeni ve etkili klinik tanı ve tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyan, oldukça geniş bir çalışma alanında kullanım potansiyeli taşıyan metodlardır [112-115]. Örnekler üzerinden anlatılacak olursak: Doğum öncesi dönemde, bebek ile ilişkili çeşitli tanıların konabilmesi, anne kanındaki fetal hücrelerin izole edilerek üzerinde çalışılabilir hale gelebilmesi ile mümkün olacaktır [116]. Ayrıca, kök hücreleri, kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme kapasitelerinden ötürü, çeşitli kan hastalıklarının ve immün yetmezlik durumlarının tedavisinde gelecek vaat etmektedirler [117, 118]. Tam da bu nedenden ötürü, hücresel tedavilerde kök hücrelerin ayırıştırılabilmesi oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra, kanser hastalarından elde edilen normal hücrelerin, malign yani kötü seyirli tümör hücrelerden ayırıştırılması ve karakterizasyonu da oldukça önemli bir ihtiyaçtır [119]. Biyomedikal ve immünolojinin haricinde, hücre ayırıştırma tekniklerinin kullanılabileceği bir başka alan da, farklı yiyecek örneklerinden ve klinik veya çevresel mikrobiyoloji örneklerinden, hastalık yapıcı mikroorganizma ve parazitlerin izolasyonu ve saptanmasıdır [120].

Şimdiye kadar mevcut olan hücre ayırıştırma metodlarının iki ana grup altında sınıflandırılabilmesi mümkündür. Bunlar: Fiziksel özelliklere dayalı hücre ayırıştırma metodları ve Affinite temelli hücre ayırıştırma metodlarıdır.

Fiziksel özelliklere dayalı hücre ayırıştırma; şekil, boyut, yoğunluk farklılıkları gibi fiziksel kriterlere dayalı ayırıştırma yapan, filtrasyon ve santrifüj tekniklerini içeren metodlardır [60]. Boyut temelli hücre ayırıştırma metodlarında, tanımlanmış aralıktaki gözenek çapına sahip olan materyaller kullanılmaktadır. Böylece sadece tekli hücrelerin geçmesine izin verdiği için, dokulardan ayrılan hücre kümelerini uzaklaştırarak, hücrelerin ve organellerin izolasyonuna izin verdikleri için ön filtreler olarak kullanılabilir. Santrifüj yöntemi ise, biyopartiküllerin ayırıştırılması amacıyla yoğunluk gradiyentini kullanmaktadır [121, 122]. Böylece hücrelerin bütünlüğünü koruyacak şekilde uygun pH ve ozmolalite kolaylıkla

ayaralanabilmektedir. Kan örneği gibi örnekler ile santrifüj yöntemi ile çalışıldığında, düşük yoğunluklu hücrelerin, yüksek yoğunluklu hücrelerden ayrıştırılabilmesi mümkündür [123]. Yoğunluk temelli hücre ayrıştırma metodlarında ise, oldukça seyrek bulunan hücre alt tiplerinin, affinite teknikleri ile ayrıştırılma işlemi öncesi, örneğin küçültülmesi (debulking) amacıyla bir ön işlem olarak sıklıkla yararlanılmaktadır.

İdeal bir hücre ayrıştırma metodunun; mümkün olduğunca yumuşak olması, etkileşime girebilecek maddelerin kullanımından kaçınması ve en önemlisi, hücre fonksiyonlarında herhangi bir kayıp olmaksızın çok yüksek bir saflık elde edilmesi beklenmektedir. Buna ulaşmak için, hücre yüzeyindeki molekülleri hedef alan affinite temelli bir yaklaşım oldukça ilgi çekicidir. Affinite temelli hücre ayrıştırma metodları; biyofiziksel ve biyokimyasal hücre yüzey özellikleri farklılıklarına dayalı ayrıştırma yapmaktadır [124-127]. Affinite temelli metodlar, oldukça seyrek bulunan hücre popülasyonlarının izolasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla, farklı hücre yüzey antijenlerine karşı geliştirilen antikörlerin kullanımına dayanmaktadır. Örneğin; CD34 antijeni, insan hematopoietik kök hücrelerinin ve endotelial hücrelerinin birçoğunda eksprese olan bir transmembran glikoprotein olup, olgun kan hücreleri ve tümör hücrelerinin çoğunda bulunmamaktadır. Bu nedenle, hematopoietik kök hücrelerinin zenginleştirilmesinde, yüzey CD34 antijenlerine karşı geliştirilmiş antikörlerin kullanıldığı çalışmalara literatürde rastlamak mümkündür. Floresan ile aktive edilmiş hücre ayrıştırılması (FACS) ve manyetik kürecik ayrıştırma affinite metoduna örnektir. Fakat, ne yazık ki, bu yaklaşımlar, uzun zaman alan ve maliyetli yaklaşımlardır [128].

Tanısal, biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalar için saf hücre popülasyonlarını elde etme amacıyla etkin bir kromatografik hücre ayrıştırma işleminde; hücrelerin geniş boyutları, difüzyon özelliklerinin kısıtlılığı, kompleks yüzey yapıları ve kimyası göz önünde bulundurulmalı ve maliyeti düşük, araştırmacılar için erişilebilir nitelikteki tekniklerle hedef hücrelerin ayrıştırılabilmesi gerekmektedir. Hücreleri alt tiplerine göre ayırmak için kullanılacak etkili metodlara gittikçe daha fazla ihtiyaç duyulmasına rağmen, var olan tekniklerin hiçbiri arzu edilen düzeyde performans sergilemeyi başaramamaktadır: Geleneksel teknikler, mikro-filtrasyon, ultra-filtrasyon ve ultra-santrifüj düşük spesifiteye sahiptir [113-

115]. Manyetik kürecik ayırıştırma teknolojisi, hücre biyolojisi ve tıbbi mikrobiyoloji alanlarında ilgi çekici bir teknik olmasına rağmen, spesifik olmayan hücre-yüzey etkileşimleri ve geri dönüşümsüz hücre adrobsiyonu gibi kısıtlılıkları mevcuttur [115]. Hedef hücrelerin immünofloresan ile işaretlenmesine dayanan akış sitometrisi, doğruluğu yüksek olmakla birlikte, maliyetli ve görece hızlı sonuç vermeyen bir tekniktir [60]. Makrogözenekli kürecikler, akımın %95 kadarının küreciklerin etrafındaki boşluklardan geçmesi ve kürecik yüzeylerine bağlanan hücrelerin, gözeneklerin içerisine girememesi (penetre olamaması) gibi difüzyonel kısıtlılıklarından ötürü ideal bir sistem olmaktan uzaktır [129, 130].

Şu ana kadar bahsedilen tüm bu metodlara alternatif bir yol ise; 10-100 µm genişliğinde, birbirleriyle bağlantılı makrogözenekler içeren kromatografik matrikslerin geliştirilmesidir. Böylelikle hücreler, monolitik kolonlardan geçebileceklerdir. En önemlisi de, hücre ayırıştırılması amacı ile kromatografik metodların kullanmanın karşısındaki ana kısıtlılıklar olan; partiküllü materyal tarafından kolonların tıkanması ve biyopartiküllerin düşük difüzyon kapasitesi gibi problemlerin, monolitik makrogözenekli kolonların kullanımı ile üstesinden gelinmiş olacaktır.

Affinite kromatografisi ile hücre ayırıştırma; maliyet-etkin, etkili ve ayarlanabilir bir hücre ayırıştırma metodudur. Daha önce de bahsedildiği gibi, sistemin etkin bir şekilde kullanılabilmesi adına, geniş gözenek boyutları, yüksek akım hızları ve hücreler üzerinde düşük gerilim stresi sağlayacak, uygun affinite matrikslerine duyulan ihtiyaç büyüktür [102, 128, 131, 132]. Sistemin talep ettikleri ve kriyojellerin doğal olarak sahip olup sunduğu özellikleri bu ihtiyaçlara yanıt vermektedir. Bu potansiyeli fark eden bilim insanları tarafından da hücre ayırıştırılması uygulamalarında çalışılarak etkinlikleri gösterilmiş ve halen de üzerinde çalışılmaya devam etmektedir. Buna bir örnek niteliğinde yapılan bir çalışmada, ticari polisiren-çekirdekli kürecik (TentaGel), PVA kriyojel kürecikleri ve N,N'-dimetilakrilamid (DMAAm)

monolitik kriyojellerinin hücre ayrıştırma performansı üzerine çalışılmıştır [133]. Materyallerin hepsinin protein A ile kovalent bağlı olduğu bilinen, çalışmanın ilk aşamasında insan periferik kanından, B ve T lenfositlerin ayrıştırılması için bahsi geçen üç materyal de test edilmiştir. Arzulanan ideal sistemde: İmmunoglobulin G eksprese ettikleri bilinen B hücrelerinin yakalanmaları; T lenfositlerinin ise, akıp giden kısımda konsantre olmaları beklenmektedir. Çalışmanın sonucunda bu üç materyalinde de sırasıyla (TentaGel kürecikleri, PVA kriyojel kürecikleri ve DMAAm monolitik kriyojelleri) %60, %74 ve %91 hücre bağlama oranına ulaştıkları rapor edilmiştir. Çalışmanın devam eden ikinci kısmında ise, bağlama oranı yüksek olan PVA kriyojel kürecikleri ve DMAAm monolitik kriyojelleri ile çalışılmış ve bu materyaller, CD34⁺ insan akut myeloid lösemi hücrelerinin yakalanması için test edilmiştir. Burada da sırasıyla %76 ve %95 hücre bağlama oranlarına ulaşılmıştır. Bu iki deney de kriyojel küreciklerinin ve monolitlerinin, hücre ayrıştırma uygulamalarındaki potansiyelini göstermeleri açısından oldukça önem taşımaktadır [133].

2.8. Lektinler

Bundan yaklaşık 140 yıl önce, Peter Hermann StillMark adlı bilim insanının, bazı tohum özütlerinin hemaglütinasyon özelliğini keşfetmesi ile birlikte lektin dönemi de başlamıştır [134]. Lektinler, her ne kadar tohum özütlerinden keşfedilseler de bitkilerin yanı sıra; hayvan, alg, fungus, bakteri ve virüs gibi pek çok farklı kaynaktan da türetilmektedirler [14, 15, 135]. Lektinlerin en önemli özelliklerinden biri, spesifik olarak hücre yüzey şeker/glikan yapılarını tanıyıp, onlara kovalent olmayan ve bundan ötürü de geri dönüşümlü olarak bağlanabilme yeteneğine sahip glikoproteinler olmalarıdır [135, 136].

Genel olarak lektinler, sahip oldukları biyokimyasal özellikler ve şekerlere bağlanabilme özellikleri sayesinde affinite kromatografisinde, glikoproteinlerin saflaştırılması amacı ile ligand olarak kullanıma oldukça uygundur [136]. Lektinlerin bazı kullanım alanları Şekil 2.5.'te özetlenmiştir. Lektinlerin, kullanım alanlarından biri olan affinite kromatografisinde sağladıkları en büyük avantajlarından biri; glikoproteinler ile herhangi bir reaksiyona girmemeleri ve onları modifiye etmemeleridir [137].

Ayrıca lektinlerin, glikoproteinlere kovalent olmayan ve geri dönüşümlü bir şekilde bağlanmaları; spesifik serbest şeker veya şeker analogları kullanılarak yarışmalı elüsyon ile affinite kolonundan kolaylıkla ayrılabilmelerini de mümkün kılmaktadır. Bu teknik, birden fazla lektin kolonları kullanılarak ve diğer analitik metodlar ile kombine edilerek daha da geliştirilebilmektedir. Dahası, hem lektinler hem de hedef glikoproteinleri genellikle stabil olduklarından, elüsyon aşamasında aşırı pH koşulları oluşturulmasından veya iyonik kuvveti kullanan elüsyon tekniklerinin kullanımından olumsuz bir şekilde etkilenmezler [138, 139].



Şekil 2.5. Lektinlerin kullanım alanları [135, 136].

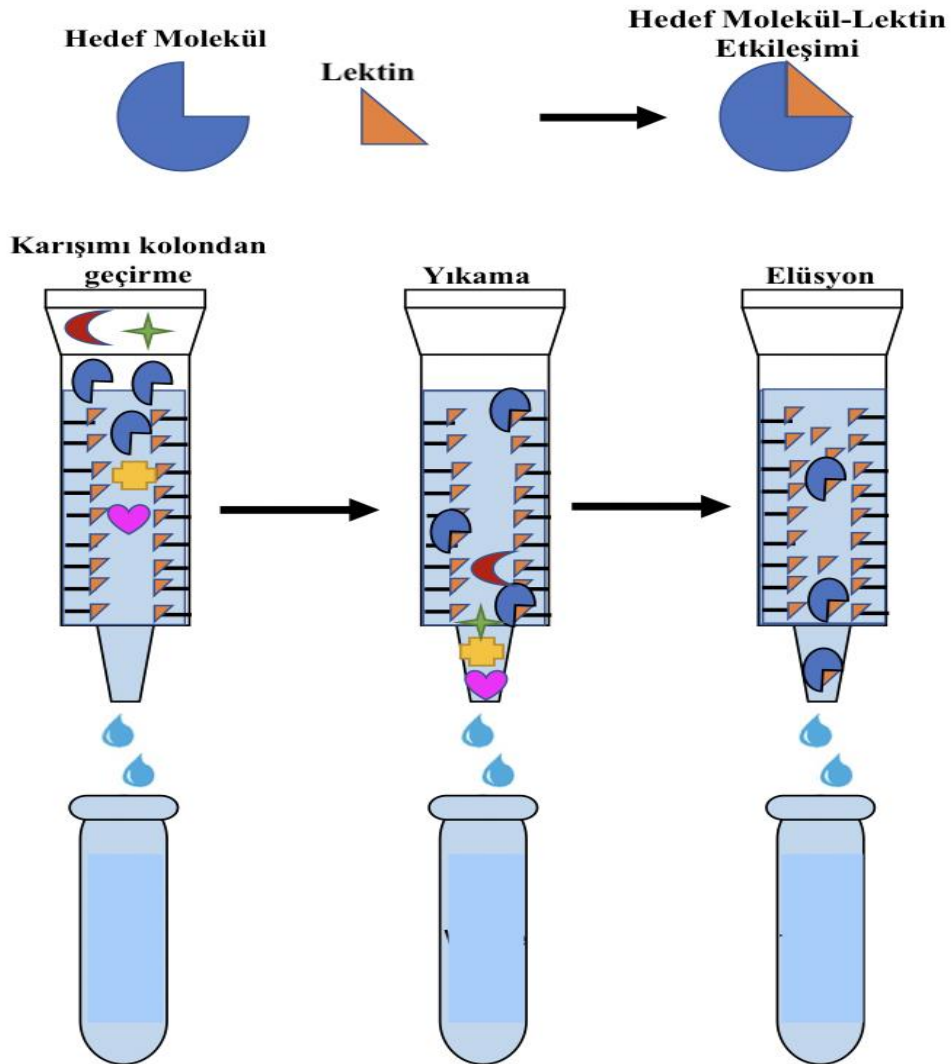
2.8.1. Concanavalin A (Con A)

Concanavalin A (Con A), bezelye (*Canavalia ensiformis*) bitkisinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bir lektin olmasının yanı sıra, saf formda izole edilen ilk lektindir [134]. Con A; glikoz ve mannoza bağlanma yeteneğinden, ilk izole edilen lektin olmasından, ucuz, stabil ve geniş bir spesifikite spektrumuna sahip olmasından ötürü, günümüze kadar, bilim insanları tarafından üzerinde en fazla çalışılan lektin olmuştur. Böylelikle Con A, çok çeşitli çalışmalarda kullanılmış olup, yakın geçmişte yapılan bir çalışmada da glikoenzimlerin immobilizasyonu (sabitleştirip ayrıştırılması) için etkin bir ligand olarak faydalı olduğu bildirilmiştir [140]. Ligand olarak Con A kullanan affinite kromatografi tekniğinin, klinik örneklerden farklı glikoproteinleri ayrıştırma ve analiz etmede oldukça etkili olduğunu söylemek mümkündür [104, 141]. Ayrıca seri lektin affinite kromatografi tekniği de glikopeptitlerin %85'ini yakalama kapasitesine sahiptir [142].

2010 yılında Li ve arkadaşları DTH'nin kandan ayrıştırılması için Con A'yı kullanmıştır [143]. Bu çalışmada, araştırmacılar, geliştirdikleri bir cihaz ile birlikte DTH'ne bağlanıp kümeler oluşturarak kandan izole etmek için Con A'nın farklı derişimlerini denemişlerdir. Bu lektin tipi, hücre membranındaki glikoprotein ve glikolipidlere bağlanabilmektedir. Tümör hücrelerinin sağlıklı hücrelere göre çok daha fazla glikoprotein sentezledikleri bilinmektedir. Araştırmacılar, uygun Con A derişimi kullanıldığında seçici olarak tümör hücrelerinin kümelenmediği, sağlıklı hücrelerin ise kümelenmediğini göstermişlerdir. Böylece lektin ve geliştirdikleri cihaz ile birlikte kullanıldığında DTH'nin ayrıştırılmasındaki başarı %84'e kadar ulaşabilmiştir [143]. Dolayısıyla bazı lektin tipleri tümör hücrelerinin, birlikte bulunduğu diğer hücrelerden ayırt edilerek izole edilmesinde kullanılabilir.

2.9. Lektin affinite kromatografisi

Belli şeker gruplarına seçici affinitesi olan lektinlerin, çeşitli kromatografi desteklerine immobilize edilmesine dayanan lektin affinite kromatografisi; ligand olarak lektinleri kullanarak, protein ve lipitlere bağlı halde bulunan, farklı glikanları (glikoprotein ve glikolipitleri) ve çeşitli hücre tiplerini ayırtmada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [138, 139, 144, 145]. Bu metodlar, glikan analizine çok daha kapsamlı bir yaklaşım sağlama potansiyeli taşımakla birlikte, heterojen şeker karışımlarını ve kompleks örneklerden şekerleri ayırtmada başarı ile kullanılabilir (Şekil 2.6.). Ayrıca bu metodun özgülüğünü arttırmak amacıyla serbest şekerler kullanılarak, spesifik elüsyon yapmak da mümkündür [137].



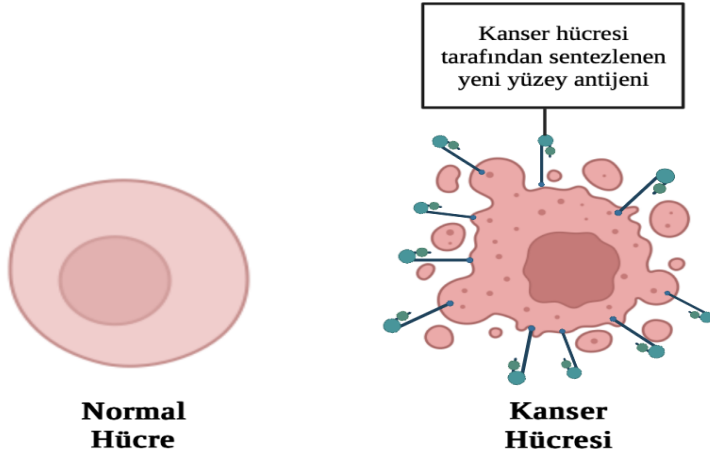
Şekil 2.6. Lektin affinite kromatografisi [146].

2.10. Kanser

Günümüzde, gelişmiş ülkelerde kanser ve kanser ile ilişkili ölümler önde gelen sağlık problemlerinden biridir. Her yıl yaklaşık 8 milyon insan, kanser nedeni ile hayatını kaybetmektedir [147]. Bu sayının önümüzdeki yıllarda da sürekli bir artış halinde olacağını öngörmek zor değildir. Bu nedenle kanserin erken teşhisi ve tedavisi ile ilişkili yöntemlerin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Son dönemlerdeki gelişmeler sayesinde kanserli hastalardaki tanı ve tedavi yöntemleri, geleneksel standartlardan kişiselleştirilmiş tekniklere doğru kaymaktadır [1, 148].

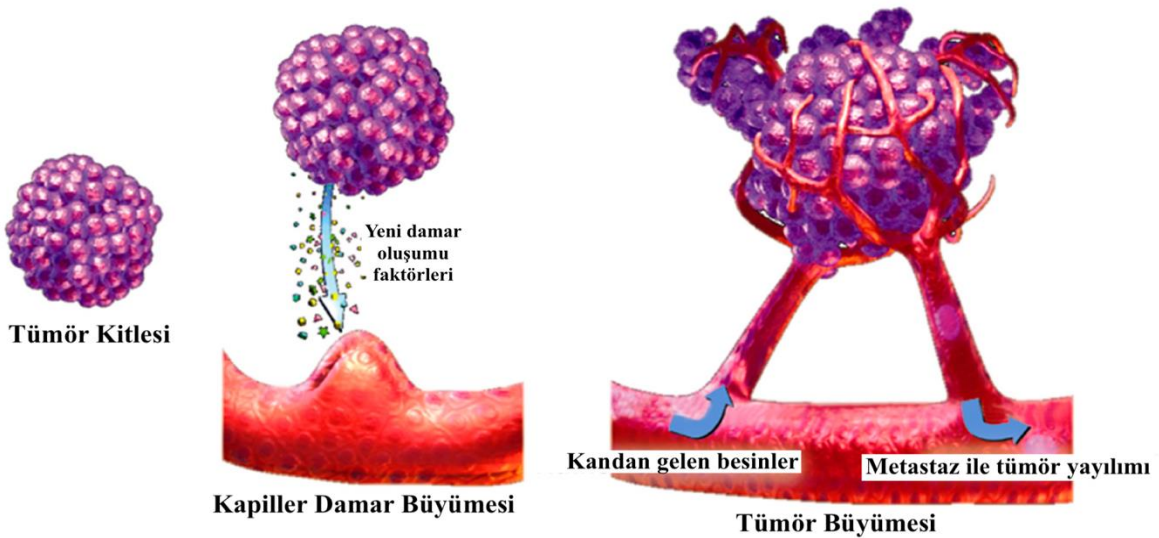
Kontrollü hücre bölünmesi, tüm dokularda görülen fizyolojik bir olaydır. Normal koşullar altında hem hücre bölünmesi hem de hücre ölümü olayları, her bir organ ve dokunun bütünlüğünü devam ettirebilmesi adına sıkı kontrol mekanizmalarına sahiptir. Bununla birlikte, kontrol mekanizmalarından kaçan bazı hücreler, kontrolsüz bir şekilde bölünerek kötü huylu (malign) tümörlerin gelişimine sebep olabilmektedir [149]. Fakat bahsedilen kanser gelişimini bir anda geliştiğini söylemek mümkün değildir. Aksine, kanser gelişimi sırasında normal hücreler, basamak basamak kanser hücreleri haline dönüşürler ve bu dönüşüm sadece normal hücre bölünmesini etkilemekle kalmayıp, hücrenin metabolik durumunu da etkiler. Bununla birlikte, DNA mutasyonlarının kanser gelişiminin nedenlerinden sadece biri olduğunu unutmamak ve her DNA mutasyonunu da kanserle ilişkilendirmemek gerekir. DNA mutasyonlarının çoğu kanser gelişimine yol açmaz fakat bazı DNA mutasyonları kanser gelişimine sebep olabilmektedir [150].

Şekil 2.7.'de örnek görsel üzerinden gösterildiği gibi, kötü huylu kanser hücresinin yüzey biyokimyasal özellikleri, normal hücreninkinden farklıdır. Kanser hücrelerinde gerçekleşen, yeni yüzey antijenlerinin, mukusun, proteoglikanların ve glikolipitlerin oluşumu gibi çeşitli değişiklikler, onların, normal hücrelerden ayırt edilebilmesini mümkün kılar. Hücresel düzeyde gözlenen bu değişiklikler, esas olarak genetik modifikasyon ve gen ekspresyonundan kaynaklanmaktadır [151].



Şekil 2.7. Kanser hücrelerinin değişen yüzey özellikleri.

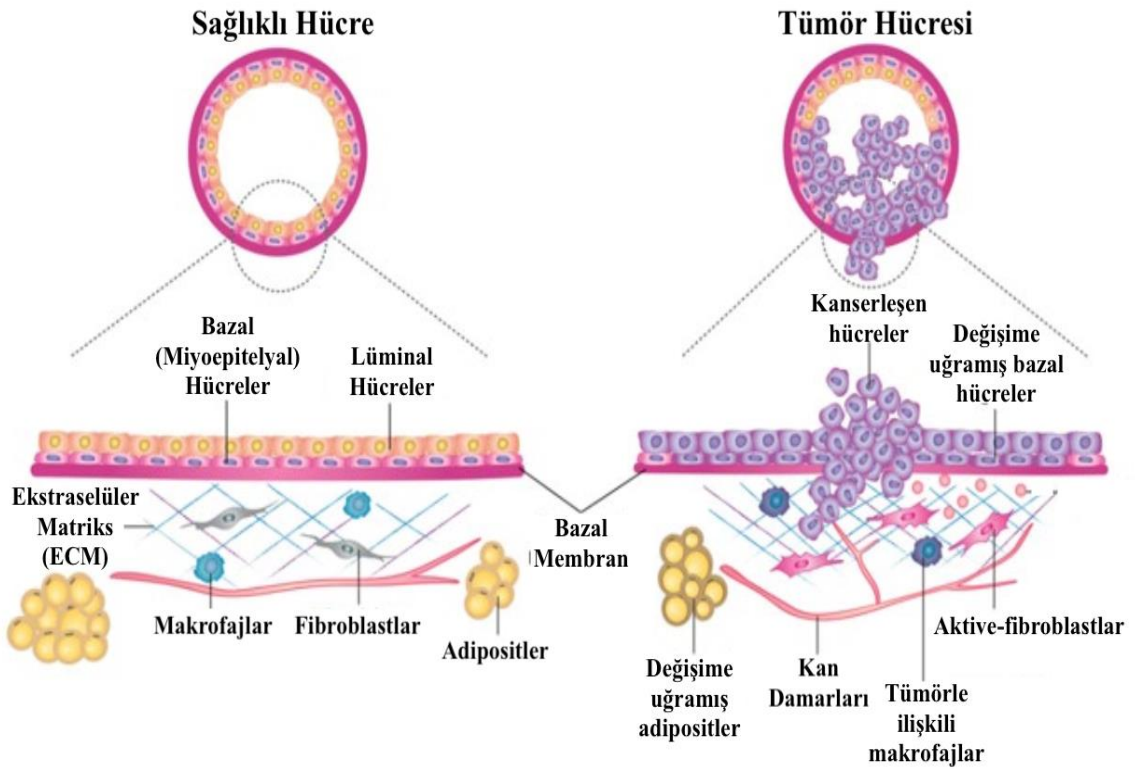
Normal hücreler, kanser hücresine dönüştüklerinde, buldukları kendi mikroçevrelerini de belirgin bir biçimde değiştirirler. Örneğin; Şekil 2.8.'de görüldüğü gibi, kanser hücreleri kendi besinlerini üretemediklerinden, büyümeleri ve yayılmaları için gerekli olan yeterli kan akımını elde edebilmek için yeni damar oluşumunu (anjyogenezis) başlatabilirler [152, 153]. Yine de anjyogenezis yolu ile kan dolaşımına geçen kanser hücrelerinin büyük bir kısmı, immün hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve vasküler endotel tarafından dolaşımdan uzaklaştırılırlar. Böylece dolaşan tümör hücrelerinin sadece çok küçük bir kısmı, metastaza yani kanserin uzak yayılımına neden olabilmektedir [154-157].



Şekil 2.8. Tümör kitlesinin yeni damar oluşumu ve metastaz ile uzak organlara yayılımı [158].

2.10.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme bezinden köken alan ve pek çok alt tipi bulunan bir kanserdir. Meme bezi: Epitelyal hücreler, fibroblastlar, adipositler ve immün hücreler olmak üzere pek çok sayıda farklı hücre tipini içermesine rağmen, klinik olarak önemli meme kanserleri tipik olarak epitelyal hücrelerden köken aldığı bilinmektedir. Şekil 2.9.'da verildiği gibi, meme epitelyumu, çift katlı lüminal hücreler ve bazal (miyoepitelyal) hücrelerin, kanallar ve lobüller şeklinde düzenlenmesinden ibaret olan bir yapıdır [159-161].

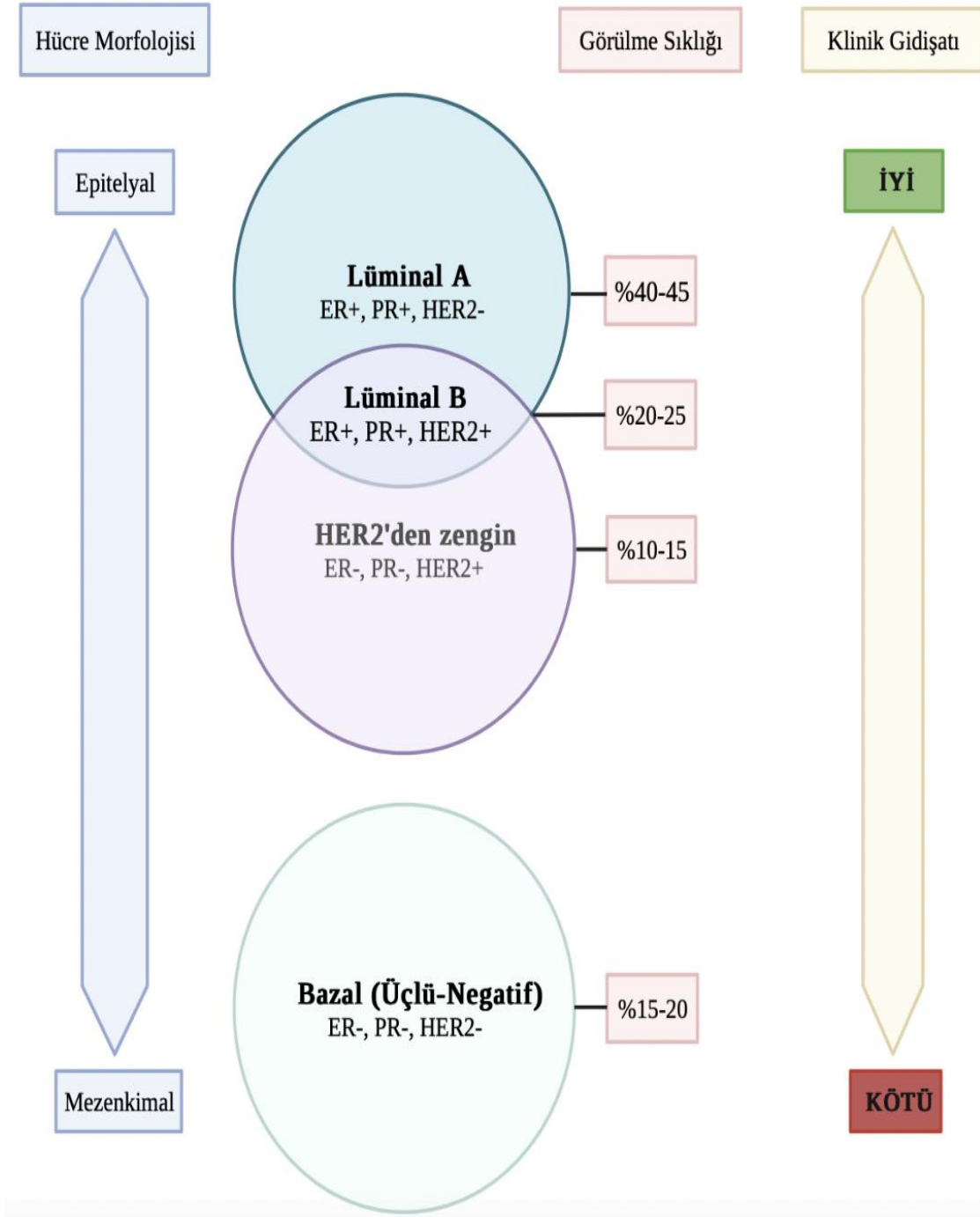


Şekil 2.9. Sağlıklı meme kanseri hücresi ve tümör hücresinin karşılaştırması [161].

Meme kanseri, dünyada en sık tanı konulan kanser olup, kadınlardaki kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir [162]. Dünyada her yıl, iki milyon yeni meme kanseri tanısı konmaktadır. Meme kanser tanısı konduğunda, kanserin başlangıçtaki yaygınlığını yani evresini belirlemek büyük önem taşır. Çünkü kanserin tanı konduğu sıradaki yayılımı, hekimin vereceği tedavi kararlarını direkt olarak etkilemektedir [163]. Meme kanserinin mortalitesi (ölüm oranları), 1970'lerden bu yana azalmaktadır [164]. Mortalitedeki bu azalmanın, hem meme kanseri taramasındaki hem de tedavisindeki olumlu gelişmeler sayesinde olduğunu söylemek mümkündür. Yani söz konusu kanser olduğunda, tanı ne kadar erken konur ve tedaviye de ne kadar erken başlanırsa, ölüm oranlarının da o kadar düşük olacağı öngörülmektedir. Meme kanserinin tanısı, histolojik değerlendirmeyi gerektirir. Kanserin klasik bulgusu: Sert ve düzensiz kenarlı kitledir. Hastalık daha ileri evrelere geçtiğinde; koltukaltı lenf bezlerinde büyüme veya kitlenin üzerindeki ciltte kızarıklık, kalınlaşma gibi bulgulara rastlanmaktadır. Ayrıca meme kanserinin en sık yayılım gösterdiği organlar: Kemikler, karaciğer ve akciğerdir [165, 166].

2.10.1.2. Meme kanserinin moleküler alt tipleri ve klinik gidişatı

Kanserin gelişimi; epitel hücrelerindeki genetik ve epigenetik değişimlerle, epitel hücreleri ile mikroçevrelerinin kompleks etkileşimlerinin sonucunda olur. Bu nedenle ortaya çıkan kanser oldukça heterojen ve farklı alt tipler içeren bir kanserdir [167]. Meme kanserlerinin alt tiplerinin klinik seyir ve tedavileri farklı olduğundan dolayı alt tipleri arasında ayırım yapabilmek hayati bir öneme sahiptir [168]. Farklı kanser alt tipleri: Tümör hücrelerinin histopatolojik özelliklerine, genomik profillerine, orijinine ve klinik gidişatına göre tanımlanmaktadır. Bu şekilde tanımlanan alt tipler: Lüminal, insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2)'den zengin ve bazal'dır [169].



Şekil 2.10. Meme kanseri alt tipleri.

2.10.1.2.1. Lüminal alt tipler

Lüminal A ve B şeklinde karakterizedir. Meme kanseri vakalarının en sık rastlanan alt grubudur. Östrojen (ER) reseptörü pozitif (ER+) olan, meme kanserlerinin büyük bir çoğunluğunu oluştururlar. “Lüminal” ismin verilmesinin nedeni: Bu tümör alt tipi ile memenin lüminal epitelyumunun arasındaki gen ekspresyonu benzerliğinden kaynaklanmaktadır. Bu alt tipteki tümör hücrelerinin, tipik olarak sitokeratin 8 ve 18 (CK8, CK18) eksprese ettiği bilinmektedir [170].

2.10.1.2.2. HER2'den zengin alt tipler

HER2'den zengin olan bu alt grup, tüm meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. Yüksek HER2 ekspresyonu ile karakterize olan bu tümörler sıklıkla, ER ve progesteron reseptörü (PR) negatiftir [170].

2.10.1.2.3. Bazal alt tipler

Bu alt grup, üçlü-negatif (triple-negative) olarak adlandırılan meme kanserlerini kapsar. Yani ER, PR ve HER2 reseptörlerinin hepsi negatiftir (ER-, PR-, HER2-). Bu alt grup, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur [171]. Diğer hormon reseptörü pozitif olan meme kanserlerine kıyasla, üçlü-negatif meme kanserlerine, 40 yaşın altındaki kadınlarda daha sık rastlanır. Üçlü-negatif meme kanserleri hızlı büyürler ve bu nedenle tanı konulduğunda genellikle klinik olarak da bulgu verirler [169].

2.10.1.3. Meme kanserinin alt tiplerinin tedavisi

İnsanlardaki meme kanserlerinin %60-70'inde ER+ ve PR+'tır [172]. Daha az sıklıkta rastlanan, ER- ve PR-, fakat HER2+ olanların, genellikle daha kötü seyirli oldukları literatürde belirtilmektedir. ER+ veya PR+ tümörler, hormon tedavisi; HER2+ tümörler ise, trastuzumab gibi hedefe yönelik tedavilere cevap verirler. Hem hormon (ER ve PR), hem de HER2 içermeyenler ise yani üçlü-negatifler, sistemik kemoterapötik ilaçlar ile tedavi edilmektedir [173].

2.10.1.4. Meme kanserinin evrelemesi

Meme kanserinin evrelemesi, “American Joint Committee on Cancer and the International Union for Cancer Control” sınıflama sistemi kullanılarak tümör, nod ve metastaz (TNM) olarak yapılır. Bu sistemde, hastalar, cerrahi öncesi klinik olarak (cTNM) ve cerrahiyi takiben patolojik olarak (pTNM) evrelendirilirler [174].

Klinik tümör (T), fizik muayene ve görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilir. Tümör boyutunu belirlemek için mamografi, meme ultrasonu ve gerekirse manyetik rezosans görünleme (MRI) kullanılır. Bölgesel lenf nodlarının durumu ise, erken evredeki meme kanserlerinde klinik gidişatı (prognozu) belirleyen en önemli faktörlerden birisidir [175]. Metastaz durumu (yapmış veya yapmamış oluşu) klinik gidişatı ve tedaviyi belirler. Metastaz yapmış olan tümörlerin klinik gidişatının daha kötü olması beklenmektedir.

2.10.2. MCF-7 meme kanseri hücreleri

MCF-7 hücreleri ilk kez, doktor Soule ve çalışma arkadaşları tarafından, 69 yaşındaki metastatik meme kanseri olan bir kadın hastanın akciğer zarı sıvısından izole edilmiş olup “MCF” ismini bu çalışmanın yapıldığı yer olan “Michigan Cancer Foundation”dan almaktadır [176]. O günlerde tamoxifen adlı ilaç henüz olmadığından, bahsi geçen hasta, yüksek dozda sentetik östrojen hormonu ile tedavi edilmiştir ve hastalığın beklenenden 3 kat daha uzun süre kontrol altında tutulduğu gözlenmiştir. Bu durum, tümörün hormona yanıt verdiğinin bir kanıtı niteliğindedir. Böylece MCF-7 hücrelerindeki östrojen reseptörlerinin tanımlanması gerçekleşmiştir ki bu da meme kanseri adına oldukça önemli bir gelişmedir. Bu gelişmeyi takiben, iki yıl sonra anti-östrojen etkili “tamoxifen” ilacının, MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği ve bu inhibisyonun östrojen ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir [177].

MCF-7, ER ve PR pozitifdir (ER+, PR+). Hormon pozitif bir kanser hücresi olmasının yanından, lüminal A, moleküler alt tipine aittir [178]. MCF-7 hücreleri, östrojen (E2) duyarlı hücreler olduğundan, hücre çoğalmaları E2 bağımlıdır [179]. Öte yandan PR ekspresyonu, parental hatlarda kuvvetliken; tamoxifen ilacına dirençli alt hatlarda zayıf veya yoktur. MCF-7 hücreleri, ER bulunmadığı durumlarda, ER ekspresyonunu arttırırlar. Fakat unutulmamalıdır

ki, meme kanseri hücrelerinin büyümesi sadece ER ve PR ile ilgili olmayıp, plazma membranı ilişkili büyüme faktörü reseptörleri ile de kontrol edilmektedir. Bahsi geçen, geniş reseptör ailesinin iki önemli üyesi: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) olup her iki reseptör de, MCF-7 hücrelerinde bulunmaktadır [180]. Ayrıca MCF-7 hücreleri, farklılaşmış memeli epitelyumu özelliklerini sergilerler. Öyle ki, E-kaderin, β -katenin ve CK18 gibi epitelyal işaretlemeleri pozitifken; vimentin ve düz kas aktini (SMA) gibi mezenkimal işaretlemeleri negatiftir [181].

Sonuç olarak, E2, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını hızlandırırken; anti-ER etkili bir ilaç olan tamoxifen, MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını durdurmaktadır. MCF-7, çok saldırgan bir tümör hücresi olmadığından, yayılımı da nispeten daha yavaştır ve buna bağlı olarak metastaz yapma potansiyelleri de düşüktür [178]. Bunlara ek olarak, farklı tedavilere daha iyi yanıt veren bir meme kanseri tipi olduğunu da söyleyebilmek mümkündür [182].

Buraya kadar bahsedilen tüm bu sebeplerden ötürü, MCF-7, dünyada kanser hücresi araştırmaları için özellikle de ER+ meme kanseri ile ilgili araştırmalar için sıklıkla çalışılan bir tümör hücresi olmuştur [180]. Ayrıca MCF-7'nin, özelliklerinin iyi bilinir olması, kolaylıkla kültürde çoğaltılabilmeleri ve bir hedef tedavi ile muamele edildiğinde de ER ekspresyonunu korusması, onu anti-hormon tedavisinde, anti-kanser ilaçların araştırılması adına, uygun bir model haline getirmiştir [180, 182]. O zamandan bu yana, MCF-7'ye dair, diğer tüm meme kanseri hücrelerine kıyasla çok daha fazla veri ve bilgi mevcuttur [182].

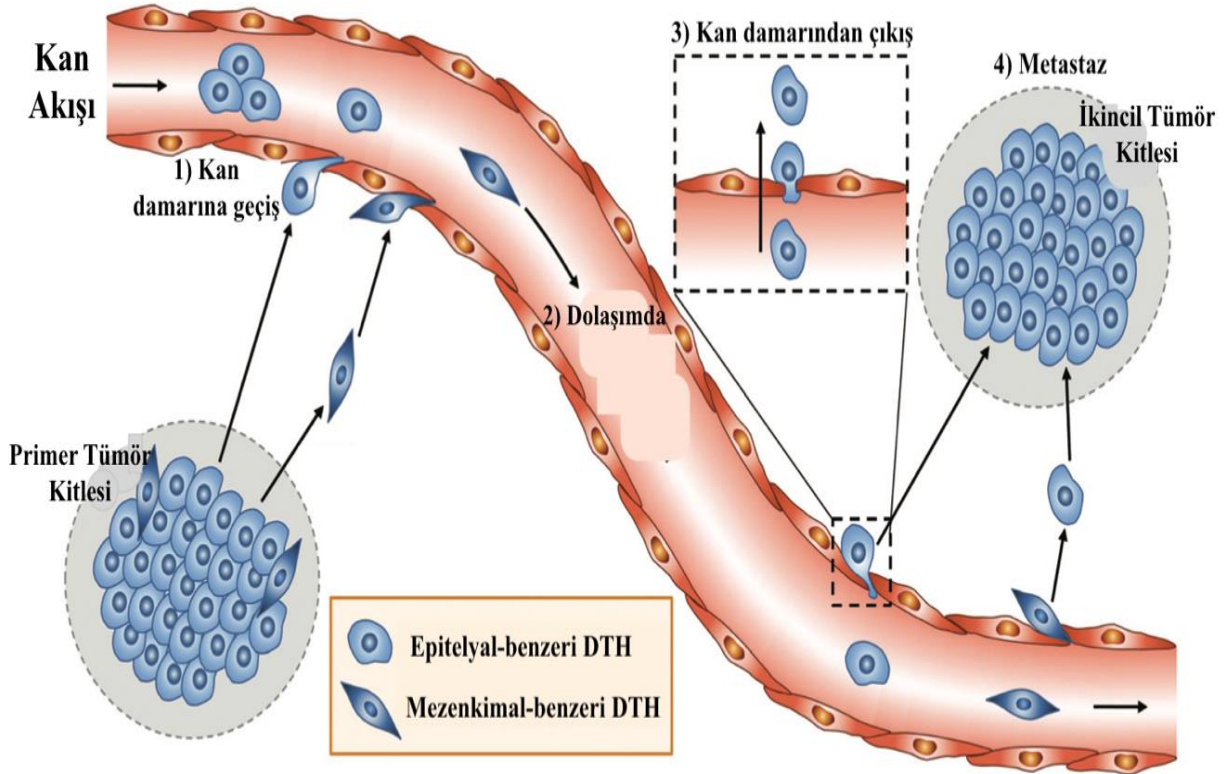
2.10.3. MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri

Patolojik özelliklerine ve klinik gidişlerine göre meme kanserlerini basitçe üç ana gruba ayrılabilir. Bunlar: Yayılımcı olmayan, yayılımcı olan ve metastatiktir. MDA-MB-231 hücreleri, oldukça yayılımcı, az farklılaşmış, üçlü-negatif yani ER, PR ve HER2'den yoksun (ER-, PR-, HER2-) ve metastatik karakterde olan bir meme kanseri hücre hattıdır [168, 183]. MDA-MB-231 gibi üçlü-negatif meme kanserlerinde, antihormonal veya hedefe yönelik geliştirilmiş tedaviler maalesef çok etkili olamamaktadır [184]. Ayrıca MDA-MB-231 meme kanseri hücresi hattı, üçlü-negatif olmasının yanında, total hücre popülasyonunun %90'ından fazlası CD44⁺/CD24^{düşük}- eksprese eden, mezenkimal fenotipte kanser hücreleridir [185].

Yüzey profili CD44⁺/CD24^{düşük/-} olan hücrelerin belirgin ölçüde daha yüksek kötü huylu potansiyele sahip olduğu bilinmektedir [186, 187].

2.10.4. Dolaşan Tümör Hücreleri (DTH)

Dolaşan tümör hücreleri, birincil (primer) tümör kaynağından ayrılıp kan damarları içinde tüm vücudu dolaşarak metastaz ile ikincil (sekonder) uzak organlara ulaşma potansiyeline sahip hücrelerdir (Şekil 2.11.). Bu yüzden DTH, metastaz oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır [188-190]. Kan dolaşımındaki kanser hücrelerinin yakalanması hem kanserin erken tanısının kolayca yapılarak erkenden tedaviye başlanabilmesi hem de kanser olduğu bilinen hastaların klinik seyrinin öngörülerek olası yayılım durumlarının saptanabilmesi açısından oldukça önemlidir [188, 191-194].

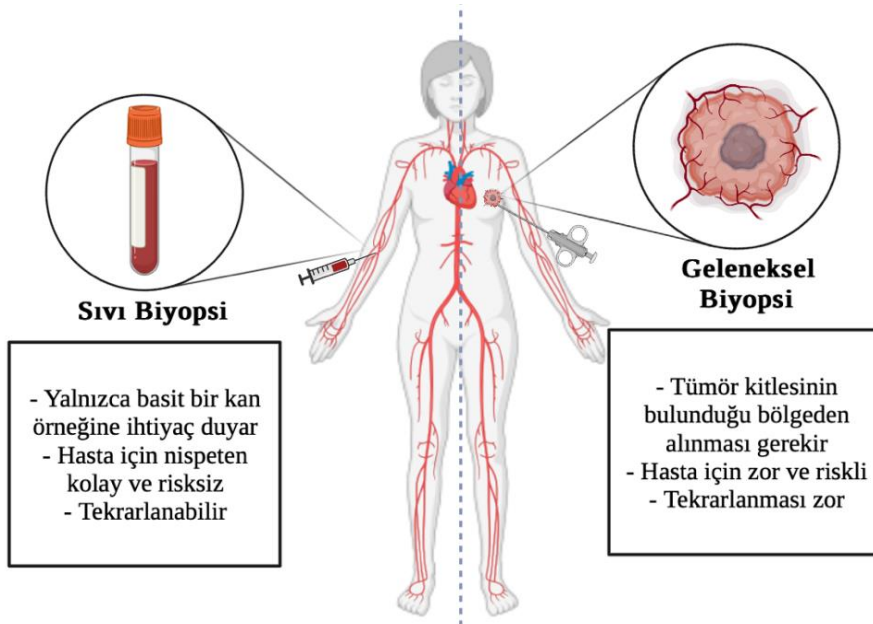


Şekil 2.11. Dolaşan tümör hücrelerinin uzak organ metastazı [190].

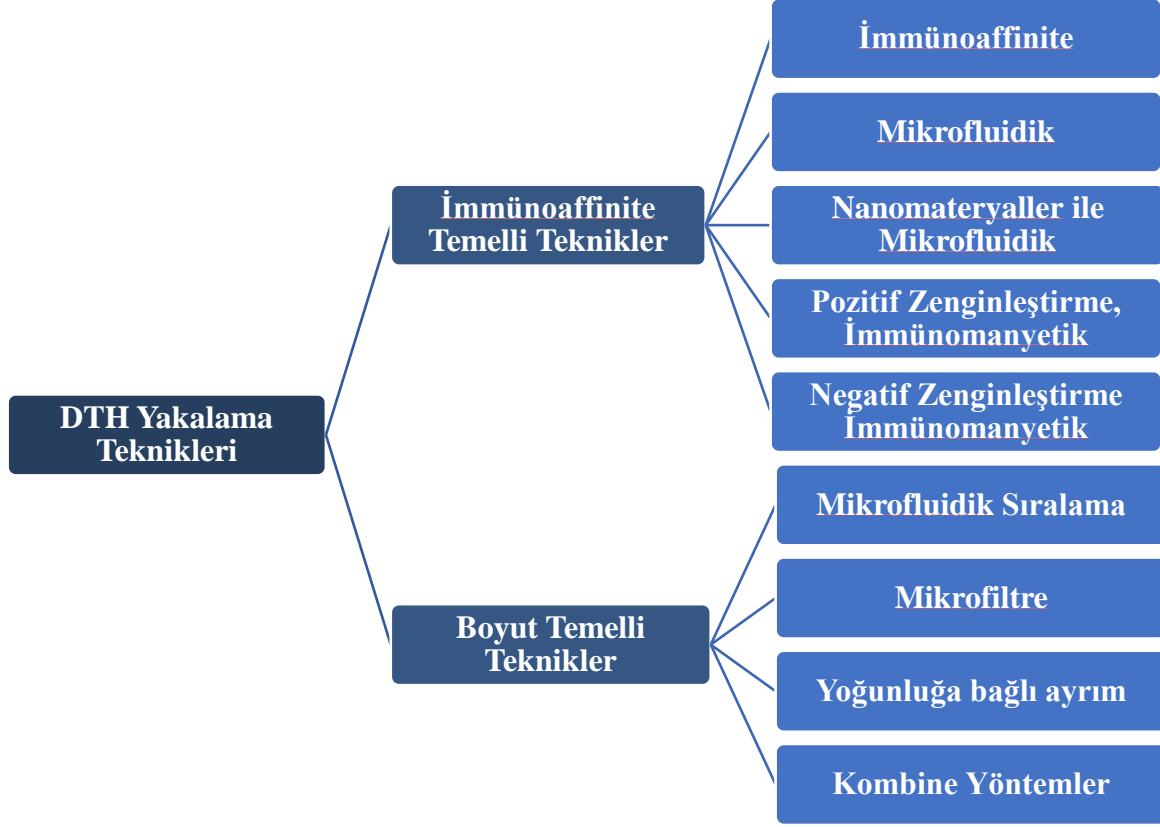
2.11. Tam kan örneklerinden DTH'ni saptama, yakalama ve ayrıştırma

Yakın zamanda, geleneksel klasik biyopsi yöntemine alternatif olarak “sıvı biyopsi” olarak isimlendirilen ve hasta için herhangi bir risk taşımayan bir tanı yöntemi ortaya çıkmıştır [2, 4]. DTH ile ilişkili çalışmalar adına gelecek vaad eden bu yöntem: Basit bir kan örneğinden, DTH’nin ayrıştırılıp, tanınması ve analiz edilmesi yolu ile hastanın kanser evresi (henüz metastaz yapıp yapmadığı) ve tümörün moleküler profili hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlayarak, kanserin gerek tanı gerekse tedavisine ciddi katkılar sağlanmasını hedeflemektedir [7, 195-198]. Sıvı biyopsi yöntemi, tümör dokusundan bir örnek parça almayı gerektiren klasik biyopsi yöntemine kıyasla, hasta için çok daha kolay ve risksiz nitelikte olmasının yanında, sıklıkla ve kolaylıkla tekrarlanabilir bir yöntem olmasıyla da gerek tümörün ilerlemesinin gerekse hastanın tedaviye yanıtının takip edilebilmesini mümkün kılabilme potansiyeli taşımaktadır [197, 198].

Sıvı biyopsi yönteminin ortaya çıkışı ile son dönemlerde DTH’nin, kan örneklerinden saptanması, ayrıştırılması ve sayılması ile ilgili tekniklere duyulan ilgi gittikçe artmaktadır [2]. Buna bağlı olarak, kanserli hastalarının kanında, diğer kan hücrelerine oranla nispeten çok daha az sayıda bulunan DTH’ni, onların biyolojik ve/veya fiziksel özelliklerini hedef alarak ayırt eden farklı teknikler, çeşitli ticari ve teknolojik platformlarda geliştirilmekte ve yaygınlaştırılmaya çalışılmaktadır [195, 198].



Şekil 2.12. Sıvı biyopsi ve geleneksel biyopsinin karşılaştırılması



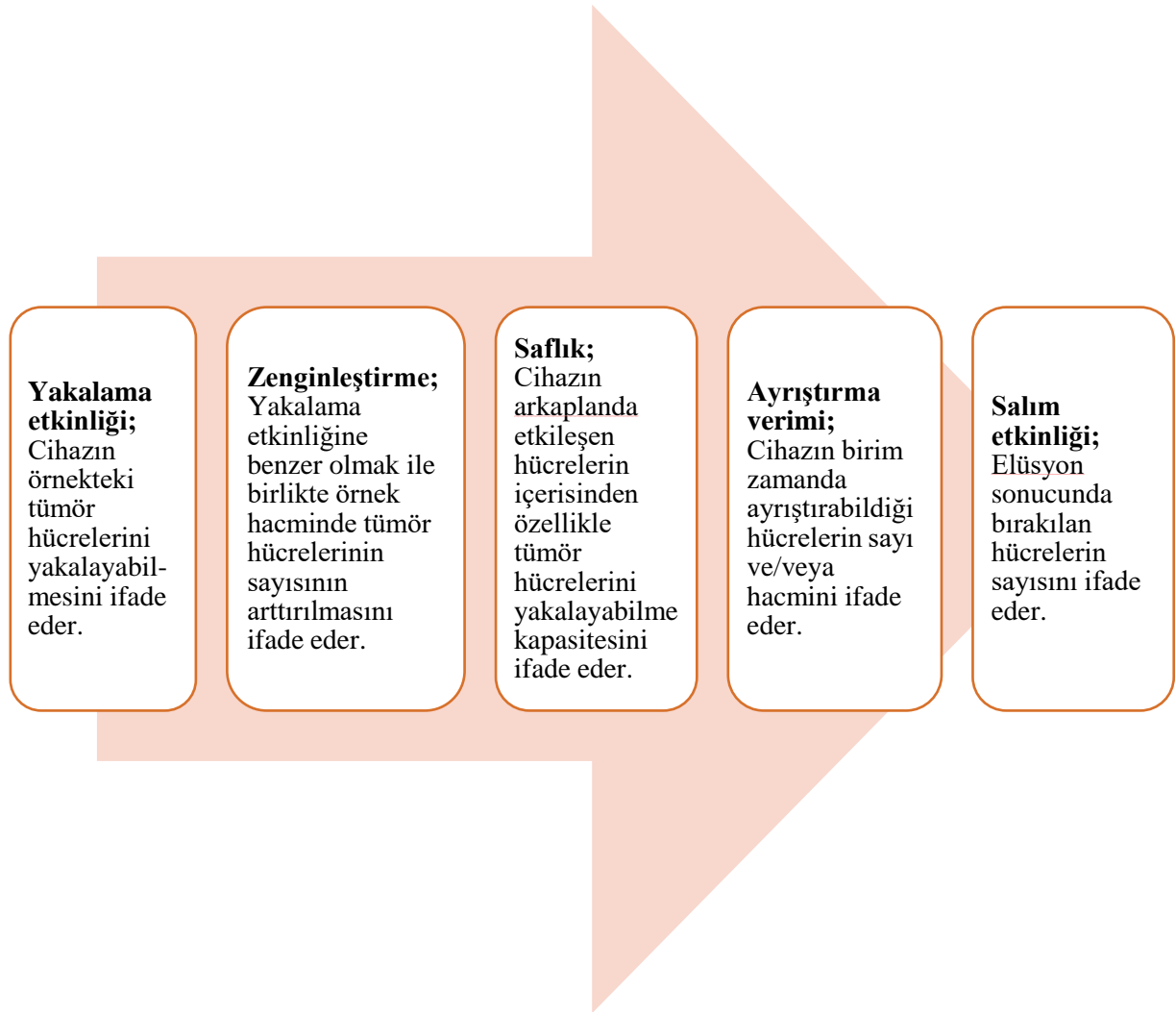
Şekil 2.13. DTH saptama, yakalama ve ayırıştırma teknikleri

Günümüzde mevcut olan DTH saptama, yakalama ve ayırıştırma teknolojileri Çizelge 2.6.’da özetlenmiştir. Bu teknolojiler, immünoafinite temelli ve boyut temelli teknikleri kullanmaktadır [199]. Bu teknikleri kullanan yeni cihazlar daha yüksek performans amaçlanarak geliştirilmiş olup, şimdiye kadar hastalığın klinik gidişatını değerlendirmede (prognozunu belirlemede), FDA tarafından onaylanan tek teknik, immoafinite temelli bir teknik olan “CellSearch” olmuştur [192].

Çizelge 2.6. DTH saptama, yakalama ve ayırıştırma amacıyla geliştirilen teknolojiler [200,224].

Tekniğin Tipi	Teknolojinin Adı	Yakalama Kriteri	Tekniği Önplana Çıkaran Özellik	Klinik Başarı Oranı
İmmünoafinite Temelli Teknikler				
İmmünoafinite	CellSearch	EpCAM	- FDA onaylı - Tam kanda uygulamaya elverişsiz	%71.4
Mikrofluidik	HTMSU	EpCAM	- Düşük hacimli kan örnekleriyle çalışılmaya uygun - Tek basamakta ayırım sağlar	Test edilmemiş
Nanomateriyaller ile Mikrofluidik	GO chip	EpCAM	- Üretimi kolay - Grafen oksit nanotabaka içerir - Yüksek saflıkta	%67-100
Pozitif Zenginleştirme, İmmünomanyetik	MagSweeper	EpCAM	- İhtiyaç duyulan örnek hacmi yüksek - Canlı hücre saflığı yüksek	%100
Pozitif Zenginleştirme, İmmünomanyetik	MACS	EpCAM	- Yüze/Hacim oranı yüksek - Tam kanda uygulamaya elverişsiz	Test edilmemiş
Pozitif Zenginleştirme, İmmünomanyetik	IMS	EpCAM	- Tam kanda uygulamaya elverişli	Test edilmemiş
Negatif Zenginleştirme, İmmünomanyetik	EasySep	CD45	- Uygulaması kolay	Test edilmemiş
Boyut Temelli Teknikler				
Mikrofluidik Sıralama	Parsortix	4.5-10 µm boyut	- Uygulaması kolay - Çoklu kullanım imkanı	%38.5
Mikrofiltre	FMSA	8 µm boyut	- Değiştirilebilir özelliklere sahip - Ters akım	%76
Mikrofiltre	FAST	8 µm boyut	- Uygulaması kolay - Oldukça hızlı hücre zenginleştirme	%83.3
Yoğunluğa bağlı ayırım	OncoQuick	Yoğunluk	- Lenfositleri elimine eder	%23

Geliştirilen diğer teknolojilerin, avantaj ve dezavantajları, FDA onaylı CellSearch tekniği ile karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Ayrıca farklı teknolojilerinin etkinliklerini karşılaştırmak ve cihazların performansını değerlendirmek için pek çok parametreden yararlanılmaktadır. Bunlar: Yakalama etkinliği, Zenginleştirme, Saflık, Hücre canlılığı ve Salım etkinliği olup, Şekil 2.14.'te özetlenmiştir [192, 199].

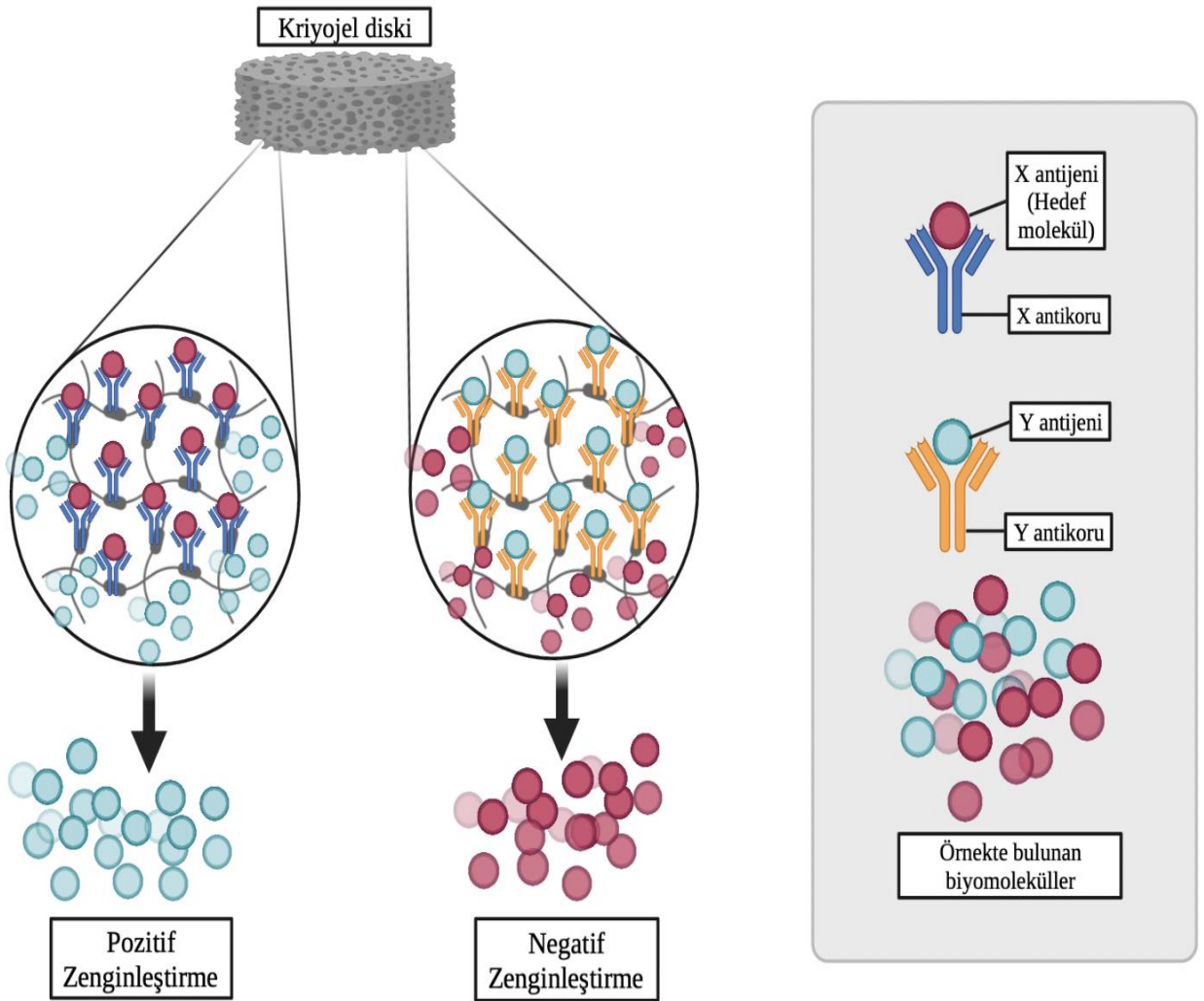


Şekil 2.14. DTH yakalama teknolojilerinin karşılaştırılmasında kullanılan parametreler.

DTH ayırıştırma çalışmalarında, kanser hücreleri hattu içeren kan veya tampon örneklerinden sıklıkla yararlanılmaktadır, fakat bu durum, bir hata kaynağı olabilmektedir. Öyle ki, bu hücrelerin boyutları ve antijen yapıları (ekspresyonları), DTH'ninki ile birebir aynı değildir. Bu yüzden bu teknik, hastadan elde edilen kan örneklerini kullanarak kanser teşhisi yapan özel tekniklerin test edilmesi ve doğruluğunun teyit edilmesi için bir ön değerlendirme olarak kullanılmaktadır [200]. Böylece ideal bir çalışmada, öncelikle kanser hücrelerini içeren yapay örnekler ile tekniğin doğruluğu teyit edilmekte ve bunu takiben, bu tekniklerin, klinik uygulamalarda kullanılabilirliğini değerlendirebilmek amacıyla kanserli hastalardan alınan kan örnekleri (sıvı biyopsiler) ile çalışılarak, tekniğin etkinliğinin doğrulanıp standardizasyonu gerçekleştirilmektedir [201]. Fakat erken DTH saptama, yakalama ve ayırıştırma kullanılan teknik ekipmanlarının verdikleri sonuçlar standardize olmadığından, kullanılan ekipmanlara bağlı olarak elde edilen veriler de değişim gösterebilmektedir. Standardizasyon probleminin üstesinden gelinmesi; araştırmacıların bu yeni teknolojiye şüpheyle bakmasının önüne geçilmesi ve buna bağlı olarak da gelecekte DTH temelli teknolojilerin güvenle klinikte kullanılabilir hale gelebilmeleri adına oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca DTH'nin, klinik pratikte rutin olarak kullanılabilir bir test olabilmesi için hızlı ve kolay bir şekilde örneğin değerlendirilip sonuç elde edilebilmesi de oldukça önemlidir. DTH'nin tespit edilip sayılmasının yaygın bir kullanım alanı bulabilmesi adına, bu işi gerçekleştirecek cihazın; daha basit basamaklar ile herhangi bir ön hazırlık basamağına gerek duymaksızın, direkt kan örneklerini kullanabilmesi, insan kaynaklı hataların en aza indirilebilmesi adına işlemlerin çoğunlukla otomatikleştirilmiş olması ve çok özellikli laboratuvar elemanlarına ihtiyaç duymaksızın çalışması hedeflenmektedir. Ancak bahsedilen koşullar sağlandığı takdirde; ölçüm öncesinde santrifüj, eritrosit ve/veya lökosit lizisi gibi çeşitli ön hazırlık basamakları uygulanmasının sonucunda gözlenen, kan örneklerindeki zaten az sayıda bulunan DTH sayısının, önemli miktardaki azalışının önüne geçilebilmesi mümkün olabilecektir. Öyle ki, 1 mL kanda, 10^9 eritrosit varlığına karşılık, yalnızca birkaç adet DTH bulunduğu göz önünde bulundurulduğunda, kan örneklerindeki tümör hücrelerinin kayıpsız bir şekilde yakalanmasının ne denli önemli olduğu daha iyi anlaşılabilir [5, 192]. Tüm bu ihtiyaçlar doğrultusunda, sürekli yeni teknikler ve gelişmiş cihazlar ortaya çıkmaktadır ve araştırmacıların bu amaç doğrultusunda çalışmaları halen sürmektedir.

2.11.2. İmmünoaffinite temelli ayırıştırma teknikleri

İmmünoaffinite temelli DTH ayırıştırma teknikleri, DTH'lerini yakalamak (tutuklamak) amacı ile ilk geliştirilen teknikler arasında yerini almaktadır. Bu teknikler, DTH'nin yüzeyinde bulunurken, diğer hücrelerde bulunmayan, antijenleri hedefleyen spesifik antikorların kullanımını esas almaktadır [116]. Şekil 2.15.'te özetlendiği gibi, eğer direkt olarak DTH hedefleniyorsa, pozitif zenginleştirme tekniği olarak sınıflandırılırken; arkaplanda kalan diğer kan hücrelerinin hedeflenerek ortamdan uzaklaştırılması yolu ile dolaylı bir ayırım söz konusu ise de, negatif zenginleştirme tekniği olarak sınıflandırılmaktadır [192].



Şekil 2.15. İmmünoaffinite tekniklerinden pozitif ve negatif zenginleştirmenin karşılaştırılması.

2.11.2.1. İmmünoaffinite de pozitif zenginleştirme teknikleri

Pozitif zenginleştirme tekniklerinde, DTH'ni yakalamada kullanılan antikorlar, cihazın içindeki yüzeye bağlı halde bulunmaktadır. Bu durum, yakalanan hücrelerin zenginleştirilmesinden sonra, elüsyonunda veya immünomanyetik tekniklerde manyetik partiküllerden serbest bırakılmasında güçlükler sebep olabilmektedir [202-204]. Genel olarak pozitif zenginleştirme tekniklerinin çoğunda, hedeflenen antijen, epitelyal yüzey tümör işaretleyicisi (EpCAM) olmaktadır. Fakat bu teknik ile yalnızca meme, kolon, prostat ve akciğer kanserlerinde olduğu gibi epitelyalden köken alan DTH'nin yakalanabildiği bilinmektedir [205]. Son çalışmalarda, DTH ile oldukça benzer antijenik özelliklere sahip olan, fakat kanser hücresi olmayan epitel hücrelerinin, çeşitli kanser dışı iyi huylu (benign, malignant olmayan) hücrelerin; kolon, pankreas ve meme hastalıklarında da saptanarak yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkmasına sebep olabildiği gösterilmiştir [205-208]. Bu nedenle DTH'ne yönelik geliştirilen teknolojilerde, epitel-mezenkimal farklılaşması (EMT) ve kök hücresi işaretleri gibi faktörlerin mutlaka değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu zorluğu aşabilmek ve daha spesifik DTH alt gruplarının ayrıştırılabilmesi için: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ve mucin 1 (MUC1) gibi yüzey işaretlerini kullanan yeni alternatif teknikler geliştirilmiştir, ayrıca bu amaçla birden fazla antikor ile birlikte çalışıldığı da bilinmektedir [209].

Pozitif zenginleştirme teknikleri, ön hazırlık basamağında kan örneklerinin santrifüj edilmesini veya kan hücrelerinin lizisini gerektirdiğinden, negatif zenginleştirme tekniklerine kıyasla, örnekte mevcut olan DTH kaybına sebep olma riski taşısa da; bu tekniklerin önemli bir avantajı, daha yüksek saflıkta sonuç vermesidir [192].

2.11.2.1.1. Mikrofluidik sistemler

Mikrofluidik temelli teknolojiler, hücre-antikor etkileşimine dayalı ve örnek akımının üzerinde daha ince kontrole izin veren cihazlardır.

Mikroçip kullanımını esas alan HTMSU teknolojisi, yüzey proteinlerini hedeflemesi amacı ile monoklonal antikorları kullanarak, kandan DTH'ni yakalayarak ayırıştırın mikrofluidik bir cihazdır. Mikrokanalların antikor kaplı duvarlarında tutuklanan DTH'nin tripsin ile elüe edilmektedir. HTMSU teknolojisi ile MCF-7 hücreleri üzerinde çalışılmış ve %97'ye ulaşın oranda bir başarı elde edilmiştir [210, 211]. Fakat bu teknoloji kullanılarak kanserli hastalardan alınan kan örnekleri üzerinde yapılan klinik bir çalışma bulunmamaktadır.

2.11.2.1.1.1. Nanomateryaller ile mikrofluidik sistemler

DTH'nin, antikorlar ile etkileşimi, hücre yakalanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Nanomateryal kullanımı gibi yeni teknikler, immunoaffinite tekniklerinin etkinliğini arttırmaya yardımcı olmuştur [212]. Öyle ki, bu nanopartiküllerin, DTH için spesifik olan antikorlar ile kaplanması, yakalamak istenen DTH'nin bağlanabileceği yüzeyi arttırmakta ve buna bağlı olarak tekniğin DTH yakalama başarısını da arttırmaktadır.

Nanomateryal kullanımını esas alan Grafen oksit (GO) çip teknolojisi, daha duyarlı DTH yakalama işlemi için, geniş yüzey alanına sahip ve biyoyumlu bir nanomateryal olan GO çipler ile çalışmaktadır [213]. Bu teknolojinin pankreas, meme ve akciğer kanserli hastalardan alınan kan örneklerinden DTH'nin izolasyonunda kullanılabildiği bilinmektedir [214]. GO çip teknolojisi başarılı bir şekilde DTH izole etmesine rağmen, immunoaffinite temelli tekniklerin çoğunda olduğu gibi tutuklama yüzeyinden canlı hücrelerin elüsyonu ile ilgili zorlukları mevcuttur. Bu problemi çözmek için GO çipleri, ısıya yanıt veren polimerler kullanılarak iyileştirilmiş, böylelikle tutuklanan hücrelerin canlılıkları korunarak daha nazik bir DTH elüsyonu sağlanabilmiştir [215, 216].

2.11.2.1.2. İmmünomanyetik ile pozitif zenginleştirme

İmmunomanyetik stratejiler, yüzeye bağlanma şeklindeki immunoaffinite tekniklerinde, hücrelerin elüsyonu basamağında yaşanan zorluğu aşmayı hedefleyen tekniklerden biridir. Diğer cihazlarda, tripsin kullanımı olmaksızın hücrelerin elüsyonu oldukça zordur [214, 215]. Bu problemi aşabilmek için DTH'nin, manyetik kürecikler tarafından tutuklandığı immunomagnetik tekniklere başvurulmuştur. Daha önce de bahsedildiği gibi, santrifüj veya eritrosit lizisi gibi ön hazırlık işlemlerinin, DTH'nin etkin bir şekilde tutuklanmasında azalmaya ve DTH'nin kaybına sebep olma kısıtlılıkları söz konusudur. Tam kan örnekleri ile çalışan yeni immunomanyetik teknikler bu kısıtlılığı giderme konusunda dikkat çekmektedir [192, 217].

İmmunomanyetik ile pozitif zenginleştirme teknolojilere verilebilecek bir örnek, manyetik hücre ayrıştırma sistemi (MACS)'tır [218]. MACS, EpCAM antikoru ile birleştirilmiş manyetik nanopartiküllerle işaretlenmiş DTH'ni yakalamada kullanılan bir teknolojidir. Fakat MACS'ın, tam kan örneklerini analiz etmede bazı zorluklar bildirilmiş olduğundan, tam kan örnekleri yerine, doku örnekleri ile çalışılmaya daha uygun bulunmuştur [219].

MACS'ın tam kan örnekleri ile çalışılmasıyla ilgili kısıtlılığın üstesinden gelebilmek adına, biyomimetik immuno-magneto-zom (IMSS) teknolojisi geliştirilmiştir [219]. Bu teknolojiye de DTH saptamada antikor olarak EpCAM kullanılmasının yanında, yüksek manyetik alan oluşturabilmek için de manyetik nanokürecikler (MNCs) kullanılmış ve bu manyetik nanokürecikler, lökosit membran parçacıkları ile kamufle edilmiştir. Böylece tam kan örneklerinden, spesifik olmayan lökosit adsorpsiyonu baskılanmış ve DTH'nin de ortamdaki diğer hücrelerle etkileşimi azaltılmıştır [220]. Sonuç olarak IMSS teknolojisinin, epitelyal DTH tanımında yüksek etkinlik gösterdiği görülmüştür [219]. Bu teknoloji ile 15 dakika gibi bir sürede, tam kan örneğinde bulunan DTH'nin %70-90'ı yakalanabilmektedir [219]. Fakat bu cihaz sadece deneysel örneklerle test edilmiş olup henüz klinik olarak test edilmemiştir. Bu nedenle, klinik kan örnekleri kullanımında kontamine lökosit sayısının çok daha yüksek olacağı araştırmacılar tarafından öngörülmektedir.

İmmunomanyetik ile pozitif zenginleştirme teknolojilere verilebilecek bir diğer örnek, "MagSweeper"dır. Bu teknoloji ile tam kan örnekleri herhangi bir santrifüj veya kan hücresi lizisi basamağı gerektirmeksizin, DTH'ni yüksek saflıkta izole edilebilmektedir. Bu cihaz,

DTH'ni, çok ince, plastik tabaka ile kaplı neodivium manyetik çubuklarını kullanarak tutuklamaktadır [212, 221]. Bunu takiben, örnekteki DTH dışındaki, işaretlenmemiş hücrelerin uzaklaştırılması için yıkama yapılır. Manyetik çubukların, eksternal bir manyetik alan bulunduran kuyucuklara sokulması ile de tutuklanan işaretlenmiş DTH'nin elüsyonu sağlanmış olur [221]. EpCAM antikorlarını kullanan bu teknoloji, metastatik meme kanseri olan 17 hastada ve DTH olmayan 5 sağlıklı kişiden alınan kan örnekleri ile klinik olarak test edilmiştir. Metastatik meme kanseri olan hastalarda DTH izole edilirken, sağlıklı bireylerde herhangi bir DTH'ne rastanmamıştır [221]. Böylelikle bu teknolojinin, sadece epitelyal tipteki kanser hücrelerini yakaladığı, sağlıklı kişilerde veya epitelyal tipte olmayan kanser hücrelerine sahip lenfomalı hastalarda herhangi bir DTH yakalayamadığı görülmüştür [201].

2.11.2.2. İmmünoaffinitede negatif zenginleştirme teknikleri

Negatif zenginleştirme teknikleri, DTH'nde bulunmayan, fakat diğer kan hücrelerinin yüzeyinde bulunan antijenleri (örneğin; CD45 ve CD66b) hedefleyen, direkt olmayan, dolaylı bir yaklaşımdır [212].

Negatif zenginleştirme teknikleri, pozitif zenginleştirme tekniklerine kıyasla, daha düşük saflıkta sonuç verse de; bu tekniklerin önemli avantajları, işaretlenmemiş, serbest DTH'nin tüm alt gruplarının yakalanmasına imkan vermesi ve herhangi bir elüsyon basamağına ihtiyaç duyulmaksızın elüsyonunun mümkün olmasıdır [202-204].

2.11.2.2.1. İmmünomanyetik ile negatif zenginleştirme

İmmünomanyetik ile negatif zenginleştirme teknolojilere verilebilecek bir örnek, StemCell™ tarafından geliştirilen, EasySep™ adlı teknolojidir. Bu teknoloji, CD45 antikorunu içeren zenginleştirme solüsyonu ve farklı boyutlarda manyetik küreciklerin kullanımı esasına dayanmaktadır. Bu teknoloji, DTH içeren kan örnekleri üzerinde test edilmiş; yakalanan ortalama kanser hücresi yüzdesinin $42 \pm 23\%$ iken, eritrosit kontaminasyonunun ise mL başına 9.000 eritrosit şeklinde olduğu raporlanmıştır [212]. Fakat bu cihaz sadece deneysel örnekler ile test edilmiş olup, henüz klinik olarak test edilmemiştir.

2.11.3. İmmünoaffinite temelli tekniklerinin avantaj ve dezavantajları

İmmünoaffinite temelli DTH izolasyon tekniklerinin en büyük avantajı, yüksek spesifiteleri yani özgüllükleridir. Böylelikle belli antijenleri içeren DTH, antikolar ile etkileşime girerek tutuklanma yoluyla yakalanabilmektedir. Fakat günümüze kadar, tüm DTH alt grupları için geçerli olan, ortak bir antijen tespit edilebilmiş değildir ve her yeni çalışma, DTH'nin yüzey özelliklerinin gösterdiği farklılıkların, tahmin edilenden bile daha fazla olduğunu ortaya koyar niteliktedir [116, 192]. Bu çok sayıda, farklı tümör ve DTH tiplerinin varlığı göz önüne alındığında, yüksek özgüllükten faydalanarak yalnızca (hedeflenen antijeni bulunduran) tek bir alt grubun yakalanmasına imkan tanımaktadır. Buna karşılık, ortamda bulunan, diğer alt gruplara ait farklı DTH'nin yakalanamama ihtimali tekniğin önemli bir dezavantajı olup, bu durum, kanserin ve DTH'nin diğer alt grupları hakkında bilgi sahibi olunmasının önünde büyük bir engel teşkil etmektedir. Bazı çalışmalarda, bu kısıtlılığın üstesinden gelebilmek için, birden fazla farklı antikoların birlikte kullanımı yoluna başvurulmuştur. Bu fikir olumlu sonuçlar vermiş, fakat mevcut teknolojilerin halen geliştirilmeye ve iyileştirilmeye ihtiyaçlarının olduğu aşıkardır [222-225].

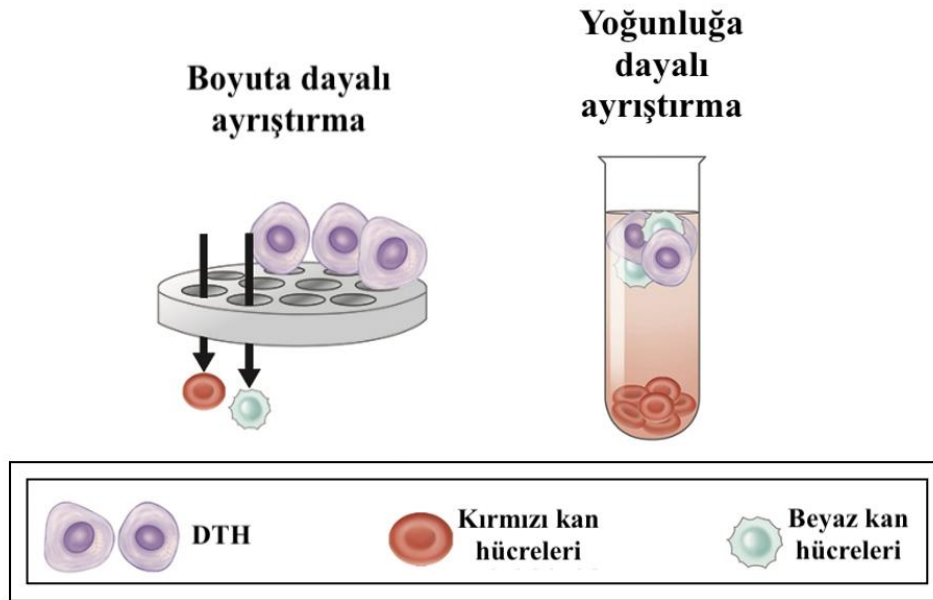
Kısaca özetleyecek olursak, immünoaffinite temelli DTH izolasyon tekniklerinin iki ana dezavantajının: Yakalama ve zenginleştirme işlemleri sırasında, DTH alt gruplarının kaybına neden olabilen DTH heterojenitesi ve DTH'nin bağlandığı cihazın yüzeyinden elüsyonunda yaşanabilen olası zorluklar olduğunu söyleyebilmek mümkündür [116]. Mevcut teknolojilerin birbirleri ile karşılaştırılarak eksiklerinin giderilmesi, bu teknolojilerin iyileştirilebilmesi ve tekniklerin etkinliğinin arttırılabilmesi adına önemli bir adım olacaktır.

2.11.4. Boyut temelli ayırıştırma teknikleri

Boyut temelli zenginleştirme teknikleri gibi fiziksel metodlar, hücre yüzeyindeki antijen ekspresyonundan bağımsız olarak çalıştıkları için, DTH'nde gözlenen heterojen antijen ekspresyonunun kaynaklı problemlerden etkilenmezler [226]. Şekil 2.16.'da görüleceği

gibi, bu teknikler, kan örneğindeki DTH'nin ve ortamda bulunan diğer hücrelerin fiziksel ve mekanik farklılıklarını kullanırlar [227].

Fiziksel tekniklerden biri olan boyut temelli teknikler; DTH'nin, kandaki diğer hücelere kıyasla, artan boyutları (9-19 μm) sayesinde DTH'nin izolasyonunu gerçekleştirmektedir [192, 227]. Bu tekniklerin ana amacı; işaretlenmemiş ve modifiye edilmemiş canlı hücrelerin, hızlı ve basit bir metod ile yüksek tutuklama etkinliğiyle başarılı bir şekilde elde edilmesidir [226-233]. Bu sayede hedeflenen hücreler, bir sonraki işlemde de kolaylıkla kullanılabilir olduğundan, tek bir örnekten birçok veri elde edilebilmesini mümkün kılabilir.



Şekil 2.16. Boyut temelli ayırma teknikleri [234].

2.11.4.1. Mikrofiltreler ile DTH ayırma teknikleri

Mikrofiltreler yardımıyla DTH ayırma tekniklerinde; ince, kontrollü, nano/mikron boyutlarda gözenekler içeren, polikarbonat filmler kullanılmaktadır [235]. Mikrofiltrelerin kullanımında saflık oldukça önemlidir. Çünkü lökositler, filtreleri tıkayabilmekte ve floresan

görüntüleme kullanıldığında zemin gürültüsünü arttırarak yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedirler.

FMSA, DTH'nin boyut ve şekil bozukluklarına bağlı ayrıştırmasını hızlı bir şekilde gerçekleştiren bir cihazdır [228, 236]. Bu cihazda, oldukça gözenekli ve esnek yapılar kullanıldığından ötürü; yüksek hacimdeki kan örneklerini, herhangi bir membran tıkanması olmaksızın, 10 dakika gibi kısa bir süre içinde işleyebilmektedir [229, 232]. Ayrıca bu cihaz ile MCF-7, MDA-MB-231, C8161, WM35 hücre hatlarını içeren kan örneklerinde çalışılmış ve %90 yakalama etkinliğine karşılık, %80'den fazla hücre canlılığına ulaştığı rapor edilmiştir [228, 231]. Bu cihaz ile yapılan klinik çalışmalarda ise, 21 kan örneğinden, 16'sında DTH saptanmış olup %76 oranında DTH saptama başarısı elde ettiği rapor edilmiştir.

FAST (Fluid-Assisted Separation Technology), boyut temelli DTH izolasyonunu hızla yapabilen bir başka cihaz olup sıvı yardımıyla ayrıştırma işlemini gerçekleştirmektedir [237]. Bu cihazda, 8 µm boyutunda gözeneklere sahip polikarbonat membranlar kullanılmaktadır. FAST ile MCF-7, MDA-MB-231 gibi meme kanseri hücreleri içeren kan örnekleri ile çalışılmış ve teknoloji test edilmiştir. Klinik testler için kanser hastalarından alınan tam kan örnekleri ile herhangi bir dilüsyon veya kan hücresi lizisi yapılmaksızın çalışılmış ve 18 kan örneğinden, 15'inde DTH saptanmış olup %83 oranında DTH saptama başarısı elde ettiği rapor edilmiştir [237]. Fakat bu tekniğin vurgulanması gereken asıl başarısı, normal şartlarda kan örnekleri ile çalışıldığında en sık rastlanan kısıtlılıklardan biri, membran tıkanması sorununu ihmal edilebilir düzeylere kadar düşürebilmiş olmasıdır.

2.11.4.2. Yoğunluk temelli DTH ayrıştırma teknikleri

Eritrosit, lökosit ve kanser hücrelerinin kendilerine özgü yoğunluklarını hedef alan santrifüj yöntemi, DTH izolasyonu için ilk kullanılan yöntemlerden biri olmuştur [238]. Son zamanlarda farklı partikülleri, kendi yoğunluklarını temel alarak ayırılan, gradiyent santrifüjü olarak isimlendirilen yöntem ortaya çıkmıştır [192].

OncoQuick[®], DTH'nin yoğunluğunu temel alan bir ayrıştırma teknolojisi olup, bu cihaz ile yapılan klinik çalışmalarda, metastatik kanseri olan 61 hastanın kan örneğinden, 14'ünde DTH saptamış ve %23 oranında DTH saptama başarısına sahip olduğu rapor edilmiştir [239].

2.11.5. Boyut temelli tekniklerinin avantaj ve dezavantajları

Boyut temelli teknikler gibi fiziksel özelliklere dayalı ayrıştırma yapan tekniklerin en büyük avantajı; herhangi bir ajan ile işaretlenmemiş, modifiye edilmemiş, canlı hücreleri yakalayabilmeleridir. Ayrıca bu teknikler, immünoafinite tekniklere kıyasla, daha kısa zenginleştirme zamanında, daha düşük maliyet ile çalışabilmektedirler [240].

Boyut temelli tekniklerin en önemli kısıtlılıklarından biri; lökosit gibi, DTH'ne benzer boyutlardaki diğer hücrelerle muhtemel etkileşimlerdir. Boyutları 7-9 µm olan lökositler, 9-19 µm boyutlarındaki DTH ile etkileşebilmektedirler [212]. Bunun yanında, bazı kanser vakalarında, daha küçük boyutlarda DTH tespit edilebilmekte olup, boyut temelli teknikler kullanıldığı takdirde, bu durum DTH saptama etkinliğini azaltabilmektedir [241]. Ayrıca, kanser hücresi hatları kullanılarak yapılan ön değerlendirme testlerinde, DTH ile kanser hücresi hattındaki hücrelerin, boyut farkları da bu yöntemlerin bir diğer önemli kısıtlılıklarından olup, bu durum, *in-vitro* ve *in-vivo* testlerin farklı sonuçlar vermesine neden olabilmektedir. Bu tekniklere dair bahsedilecek son kısıtlılık ise, DTH ayrıştırma çalışmalarında, örnek materyali olarak tam kanın kullanımının bir sonucu olarak, özellikle de mikrofluidik cihazlarda sıklıkla gözlenen, yüksek konsantrasyondaki kan hücreleri tarafından, membranın tıkanması durumudur [226, 228, 242]. Araştırmacılar tüm problemlerin üstesinden gelebilmek adına farklı gözenek boyut ve şekillerinde cihazlar geliştirmeye çalışmaktadır.

2.12. DTH'ni saptama, yakalama ve ayrıştırmanın gelecek potansiyelleri

Daha önce de bahsedildiği üzere, sıvı biyopsi; arzu edildiği kadar tekrarlanabilen, DTH'ni saptama, yakalama ve ayrıştırma teknikleri ile çalışıldığı takdirde tümör ilerlemesini gerçek zamanlı olarak takip edebilmeyi mümkün kılma potansiyeline sahip, hastalar için risk taşımayan bir yöntemdir [195, 198]. DTH'nin izolasyonu ve sayımı; kanserin erken evrede saptanması, kanser ilerlemesinin, olası metastaz durumunun monitörize edilmesi ve bunlara bağlı olarak hasta için uygun tedavinin belirlenebilmesi adına oldukça umut verici bir

yöntemdir. Ayrıca, kandan ayrıştırılan DTH'nin analiz edilmesi ile de kanserin alt tiplerinin ve ilaç direncinin saptanması konularında da gelecek vaat etmektedir [193, 194, 243]. Bu nedenle, günümüzde gittikçe önem kazanan, her hastanın kendine özgü değerlendirildiği ve tedavi edildiği, kişisel tıp alanında da kullanılma potansiyeline sahiptir [188, 244]. Ayrıca bu yöntem ile tek bir tümör hücresinin DNA analizlerinin yapılması ve tüm genomunun tanımlanması da mümkündür [245].

Günümüzde DTH ayrıştırma tekniklerinin klinik pratikte rutin olarak kullanımı henüz son konusu değildir. Fakat ön değerlendirilmesi yapılan çalışmalar, DTH ayrıştırma tekniklerinin, moleküler çalışmalar ile kombine edilmesinin, kanserli hastaların klinik gidişatının gerek tahmini gerek ise tedavi kararlarının daha doğru verilmesi üzerindeki potansiyellerini ortaya koymaktadır. Öyle ki, hayvan deneylerinde, DTH'nin kandan ayrıştırılarak uzaklaştırılmasının bir sonucu olarak, yaşam sürelerinde iyileşme sağlanabildiği gösterilmiştir [246]. Günümüzde mevcut bulunan immunoaffinite ve boyut temelli tekniklerin birbirleriyle avantaj ve dezavantajlarının karşılaştırılarak, iyileştirilmesinin, gelecekte: Tam kan örnekleri ile herhangi bir ön hazırlık basamağı olmaksızın çalışılmasını, böylelikle DTH'nin hasar görmesi ve kaybı gibi kısıtlılıkları ortadan kaldırılarak, daha güvenilir DTH analizleri yapılmasına olanak sağlayacağı öngörülmektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan materyaller

Sentezlenen süper-makrogözenekli kriyojellerde: Monomer olarak kullanılan HEMA, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBAAm) ve BSA'nın çapraz bağlayıcısı olarak kullanılan glutraldehit (G) (%25)Sigma (St Louis, USA) firmasından, reaksiyon başlatıcı olarak kullanılan amonyum persulfat (APS) ve reaksiyon hızlandırıcı olarak kullanılan ultra saf su (UPS), N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Merck (Darmstadt,

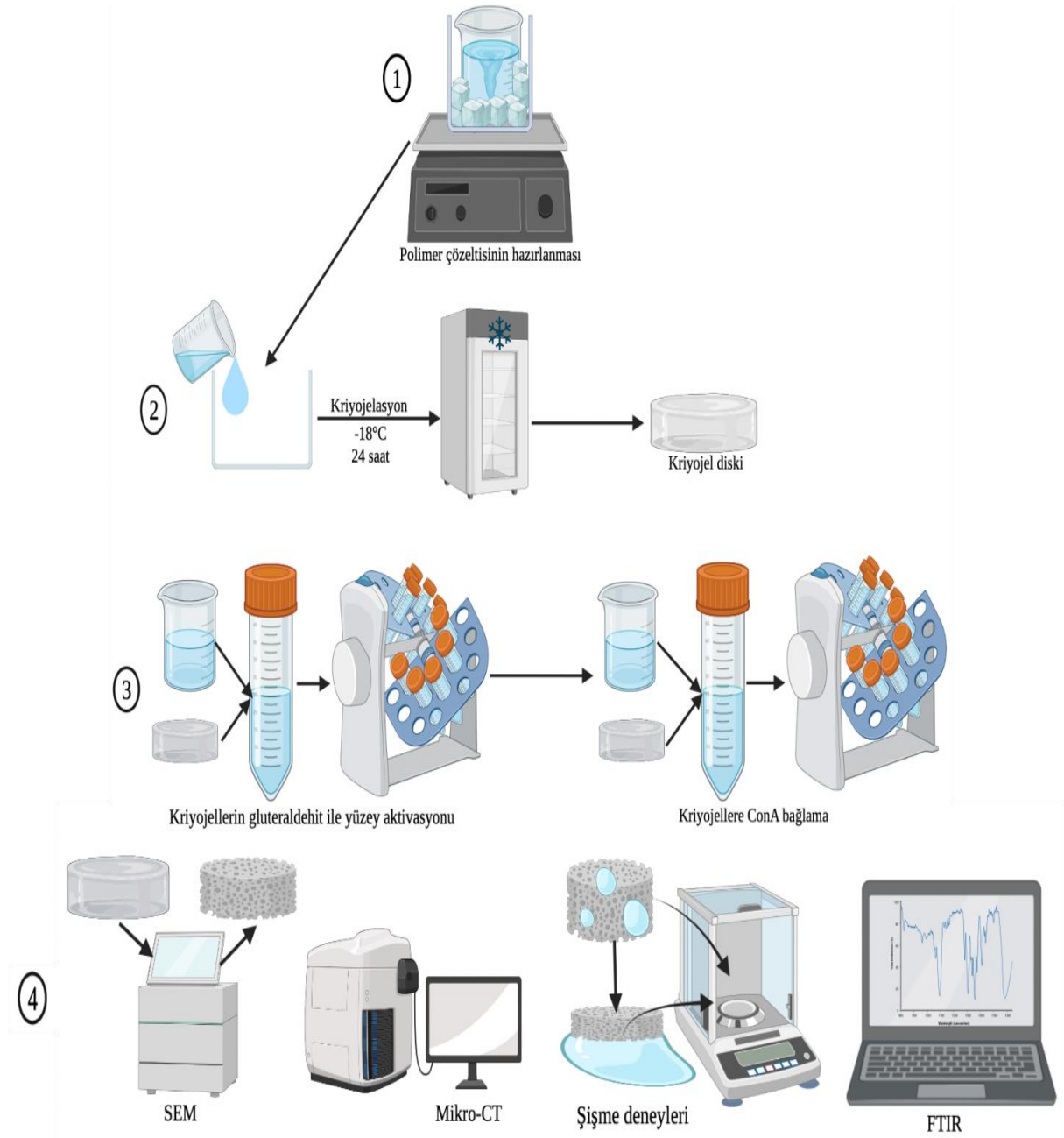
Almanya) firmasından, Sığır Serum Albümin (BSA) Capricorn SCI (USA) firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültür çalışmaları kapsamında kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının ikisi de Amerikan Tıp Kültür koleksiyonu'ndan (ATCC®, Amerika Birleşik Devletleri) temin edilmiştir. Hücreler için besiyeri olarak kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Merck (Berlin, Almanya) firmasından; Fetal Sığır Serum (FSS) Cegrogen (Stadtallendorf, Almanya) firmasından; penicilin, streptomisin, tripsin/EDTA çözeltisi Sigma (St Louis, USA) firmasından temin edilmiştir. Son olarak hücre pasajlanması ve deney koşullarının sağlanması amacı ile kullanılan etüv de Sanyo, MCO18AC, Japonya firmasına aittir.

Kriyojellerin karakterizasyonu amacıyla yapılan SEM analizinde, örneklerin hazırlanma aşamasında ve hücre canlılık testlerinde kullanılan kimyasallar olan: hekzametildisilazan (HMDS), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]difenilterazolyum bromür (MTT), Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (0,01M, toz formunda), dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma (St Louis, USA) firmasından; amonyak Merck (Berlin, Almanya) firmasından; tripan mavisi boyası Biochrom (Berlin, Almanya) firmasından; alkol Riedel de haen (Seelze, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen kriyojel sentezi, karakterizasyon amaçlı deney ve analizlerin genel bir özeti Şekil 3.1.'deki şemada bulunmaktadır.

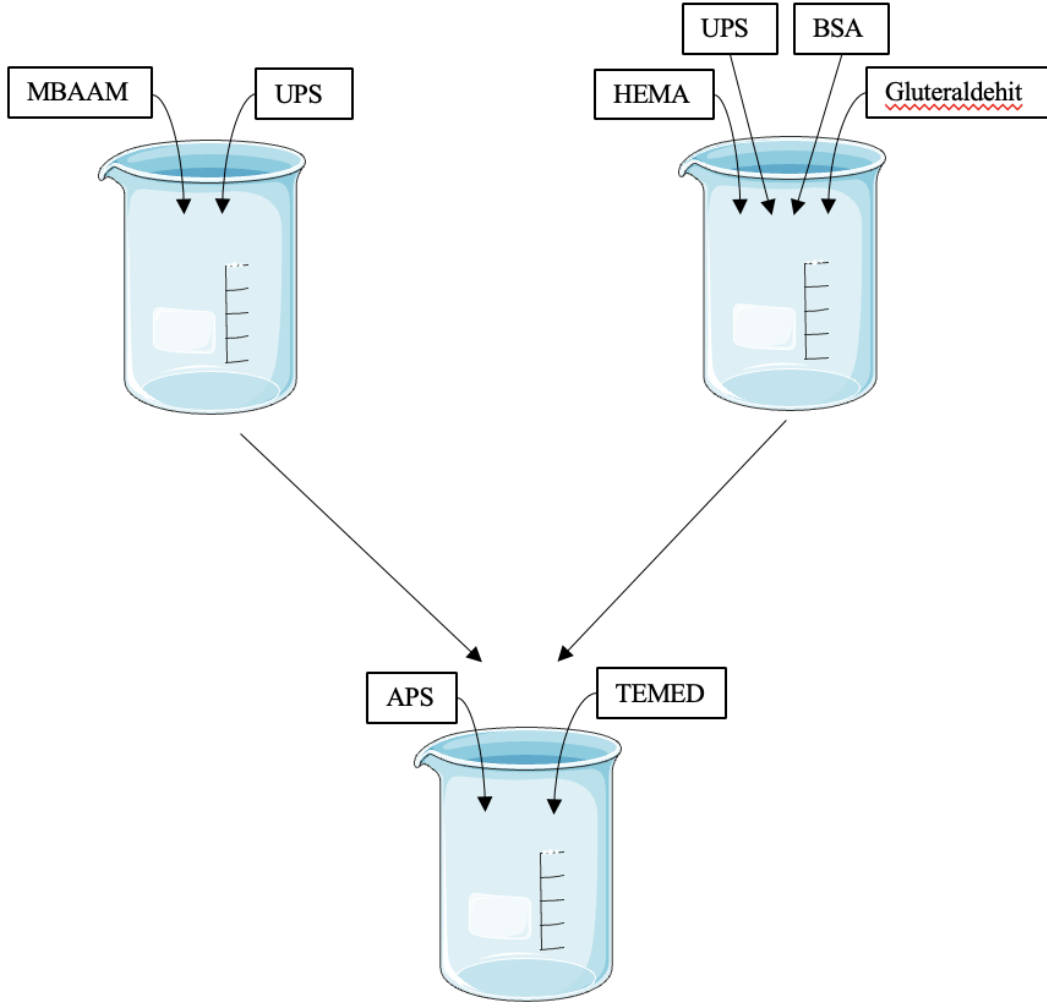
3.2. PHEMA-BSA kriyojellerin sentezlenmesi ve Con A bağlanması



Şekil 3.1. Karakterizasyon çalışmalarının genel özeti: 1) ve 2) PHEMA temelli kriyojellerin sentezlenmesi; 3) Kriyojellerin yüzey aktivasyonu ve Con A bağlanması; 4) Kriyojellerin karakterizasyon analizleri.

3.2.1. PHEMA-BSA kriyojellerin sentezi

Kriyojel sentezi aşamasında, manyetik karıştırıcı üzerinde çözme ve buz banyosunda soğutma üzerine bir sistem kurularak kriyojellerin geniş gözeneklere sahip olması hedeflenmiştir. Bu amaçla, bir erlende hazırlanacak kriyojelin içeriğindeki BSA oranına göre: 0, 25, 50, 75, 100 mg BSA, 3 mL ultra saf su içersinde çözdürüldükten sonra 1.3 mL monomer olan HEMA, ardından da 20 µL BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan glutraldehit eklenerek çözdürülmüştür. Bu sırada başka bir erlende 0.283 gr çapraz bağlayıcı olan N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBAAm), 8.0 mL ultra saf su içersinde çözdürülmüştür. İki erlende de çözme işlemleri tamamlandıktan sonra erlendeki çözeltiler karıştırılmıştır. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra polimerizasyon başlatıcısı olan 20 mg APS ve reaksiyon hızlandırıcısı olan 25 µL TEMED sırasıyla eklenip çözelti, önceden soğutulmuş iki cam arası yüzeye aktarılmış ve -18°C sıcaklıkta, 24 saat boyunca polimerizasyonun gerçekleşmesi amacı ile dondurucuya kaldırılmıştır. Polimerizasyon için gerekli olan sürenin tamamlanmasının ardından kriyojeller, dondurucudan çıkarılarak, bir sonraki aşama olan, erime basamağına geçilmesi için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Erime aşamasında, hazırlanan polimer çözeltisi içersindeki donarak buz kristallerini oluşturan çözücünün eriyerek birbirleriyle bağlantılı süper-makrogözeneklerin oluşumu gerçekleşmektedir. Erime aşaması tamamlandıktan sonra yapıya katılamayan gerek çapraz bağlayıcıların, gerekse monomer/polimer öncüllerinin ortamdan uzaklaştırılması amacı ile kriyojeller birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. İki cam arasına, 2.5 mm kalınlıkta hazırlanmış kriyojel tabakasından, deney aşamasında kullanılacak olan kartuş sistemine uyumlu boyutlarda, 2.2 cm çapında diskler kesilmiştir. Yapıya katılamayan ya da parçalanmış kısımların uzaklaştırılması amacı ile distile su ile yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Bu yöntem ile sentezlenen kriyojeller, deneyde kullanılacakları zaman gelene dek, +4°C'de sodyum azid (NaN₃) çözeltisi (20g/L, %0.02, (w/v)) içersinde deneyde kullanılacağı zamana kadar muhafaza edilmiştir. Aşağıda verilen Şekil 3.2.'de kriyojel sentezine katılan kimyasal materyaller gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Kriyojel sentezine katılan kimyasal materyaller.

Tez çalışmasında kullanılmak amacı ile, gluteraldehit (G) içeren ve içermeyen kriyojeller (PHEMA, PHEMA-G), değişen BSA oranına göre (PHEMA-BSA0/25/50/75/100, PHEMA-G-BSA0/25/50/75/100) toplamda on farklı kriyojel grubu olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu grupların isimleri, içeriklerindeki değişkenlere ve değişen içeriklerin kullanıldıkları miktarlara uygun olarak verilmiştir. Tüm kriyojel grupları, yukarıda bahsedilen PHEMA kriyojel sentezleme metoduna göre hazırlanmıştır. Aşağıda verilen Çizelge 3.1.'de tez çalışması kapsamında sentezlenen tüm kriyojel gruplarının içerikleri + ve - işaretleri kullanılarak özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Sentezlenen kriyojel gruplarının içerikleri.

Kriyojel Grupları	Kimyasal İçerikleri		
	HEMA	Gluteraldehit	BSA
PHEMA	+	-	-
PHEMA-BSA25	+	-	+
PHEMA-BSA50	+	-	+
PHEMA-BSA75	+	-	+
PHEMA-BSA100	+	-	+
PHEMA-G	+	+	-
PHEMA-G-BSA25	+	+	+
PHEMA-G-BSA50	+	+	+
PHEMA-G-BSA75	+	+	+
PHEMA-G-BSA100	+	+	+

Kriyojellerde değişen miktarlarda kullanılan BSA'nın, jellerin yapısında katılma başarısını ölçmek için; kriyojellerin yıkama suyundan alınan örnekler, Bradford yöntemine göre, spektrofotometrik olarak 595 nm'de analiz edilmiştir.

3.2.2. PHEMA-BSA kriyojellerin yüzey aktifleştirmesi

Sentezlenen PHEMA-BSA kriyojellerine, Con A lektinin bağlanma işlemi gerçekleştirilmeden önce, daha etkin bir etkileşim ve bağlanmanın sağlanabilmesi adına bir ön hazırlık basamağı olarak; her üç kriyojel diski başına, 25 mL gluteraldehit çözeltisi (%5 v/v; pH 7.0 fosfat tamponunda) kullanılarak 6 saat boyunca rotatorda muamele edildi. Kriyojellerin yüzey aktifleştirme işlemi tamamlandıktan sonra, fazla gluteraldehitin uzaklaştırılması için yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir [257].

3.2.3. PHEMA-BSA kriyojellere Con A bağlanması

Gluteraldehit ile yüzey aktifleştirilmesi gerçekleştirilen kriyojellere, Con A bağlanması için kullanılacak Con A çözeltisi hazırlandı. Çözeltiyi hazırlamak için: 1 mg/mL Con A, fosfat tamponunda 6 saat çözdürüldü. Çözülme gerçekleştikten sonra 100 µM CaCl₂ (kalsiyum klorid) ve 100 µM MnCl₂ (mangan klorür) iyonları eklendikten sonra, son olarak %2 glukoz da eklenerek homojen bir çözelti elde edilmiştir [255].

Yukarıdaki protokole uygun bir şekilde hazırlanan Con A çözeltisinden, her beş kriyojel disk başına, 20 mL kullanılarak 2 saat boyunca rotatorda bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. PHEMA-BSA kriyojellerin, Con A bağlama başarısını ölçmek için spektrofotomede 280 nm’de analiz yapılmıştır.

3.3. PHEMA-BSA kriyojellerin karakterizasyon çalışmaları

Kriyojellerin karakterizasyon çalışmalarında; şişme özellikleri, yapısal özellikleri ve yüzey özellikleri incelenmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

3.3.1. Şişme deneyleri

Kriyojellerin şişme özellikleri; polimerizasyon için kullanılan monomer/polimer öncüllere, tercih edilen çapraz bağlama yöntemine, içeriğindeki çapraz bağlayıcıya, sentez yöntem ve ortam koşulları gibi pek çok parametreye bağlıdır [76]. Bu değişkenlerin hedefe uygun ayarlanması, şişme deneyleri sonrası elde edilen sonuçlar ile doğrulanmış olacaktır.

3.3.1.1. Jelleşme verimi (%)

Kriyojellerin jelleşme verimlerinin incelenebilmesi için öncelikle jellerin kuru ağırlıklarının (m_{kuru}) bulunması gerekmektedir. Bu amaçla, su ile şişmiş kriyojeller, 40°C sıcaklıkta inkübatörde kurutulmuş ve hassas terazide tartılmıştır. Denklemdeki bir diğer parametre olan “ m_t ” ise, polimer çözeltisindeki monomerlerin gram cinsinden toplam kütlelerini ifade etmektedir. Böylece kriyojellerin jelleşme verimleri, aşağıda verilmiş olan Eşitlik 3.1.’e göre hesaplanmıştır [247].

$$\text{Jelleşme Verimi (\%)} = (m_{kuru} / m_t) \times 100$$

(Eşitlik 3.1.).

3.3.1.2. Şişme oranı (%)

Kriyojellerin şişme oranlarının incelenebilmesi için öncelikle jellerin su ile şişmiş ve kuru ağırlıklarının bulunması gerekmektedir. Bu amaçla, kriyojellerin su içerisinde tamamen şişmesi sağlandıktan sonra şişmiş ağırlıkları ($m_{\text{şişmiş}}$) hassas terazide tartılmıştır. Ardından yukarıda bahsedildiği yöntemle m_{kuru} da bulunmuştur.

Böylece kriyojellerin şişme oranları, aşağıda verilmiş olan Eşitlik 3.2.'ye göre hesaplanmıştır [247].

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = (m_{\text{şişmiş}} - m_{\text{kuru}}) / m_{\text{kuru}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.2.})$$

3.3.1.3. Makrogözenek miktarı (%)

Kriyojellerin makrogözenek miktarının incelenmesi ve bağlantılarının derecelendirilmesi için öncelikle şişmiş ve sıkılmış jellerin ağırlıklarının bulunması gerekmektedir. Bu amaçla, kriyojeller su içerisinde bekletilmiş ve tamamen şişmesi sağlandıktan sonra ($m_{\text{şişmiş}}$) hassas terazide tartılmıştır. Denklemdaki bir diğer parametre olan sıkılmış kriyojel ağırlıklarını ($m_{\text{sıkılmış}}$) bulmak için ise, şişmiş halde bulunan kriyojellerin yapısındaki serbest çözücünün (suyun) mekanik olarak kuvvet uygulanarak (sıkma yöntemi ile) uzaklaştırılmış ve ($m_{\text{sıkılmış}}$) hassas terazide tartılmıştır. Bu teknik, kriyojellerden uzaklaştırılan serbest suyun total hacminin, birbirleriyle bağlantılı olan gözeneklerin hacmine eşit olduğu varsayımına dayanmaktadır [248].

Böylece kriyojellerin makrogözenek miktarı, aşağıda verilmiş olan Eşitlik 3.3.'e göre hesaplanmıştır [247].

$$\text{Makrogözenek Miktarı (\%)} = (m_{\text{şişmiş}} - m_{\text{sıkılmış}}) / m_{\text{şişmiş}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.3.})$$

3.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Sentezlenen farklı kriyojel gruplarının yüzey morfolojilerinin değerlendirilmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara bağlı olarak deneyin *in vitro* hücre kültürü aşamalarında hangi kriyojel disklerinin daha başarılı olacağına dair öndeğerlendirme yapılmasını ve deney sonuçlarında da bunun doğrulanması mümkün kılınmıştır.

3.3.2.1. SEM görüntülemeleri için kriyojel örneklerinin hazırlanması

SEM örneği hazırlama aşamasında, öncelikle kriyojel gruplarının içinde buldukları besi ortamı uzaklaştırılmış ve bunu takiben, fiksasyon aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla, kriyojel grupları, 1 mL gluteraldehit çözeltisinde (%2.5'lük v/v), karanlık bir ortamda, +4°C'de, 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Ardından fiksasyon aşamasını takiben, dehidrasyon aşamasına geçilerek, kriyojeller, konsantrasyonları kademeli olarak artan; %30, %50, %70 ve %100 etanol çözeltileri ile oda sıcaklığında, 5'er dakika boyunca muamele edilmiş ve son olarak da hekzametildisilazan (HMDS) ile 10 dakika boyunca muamele edilerek, dehidrate edilmiştir. Tüm bu işlemler tamamlandığında, kriyojeller, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. SEM öncesi son aşamada, kuruyan ve kesitleri alınarak hazırlanan kriyojel örneklerinin görüntüleri, altın-paladyum ile kaplanarak, HÜNİTEK'te (JEOL, JEM, 1200 EX, Tokyo, Japonya) alınmıştır.

3.3.3. Mikro bilgisayarlı tomografi (Mikro-CT)

Tez kapsamında sentezlenen kriyojellerin sahip oldukları farklı özelliklerin sonucunda değişen, gözenek boyut ve dağılımlarının değerlendirilebilmesi amacıyla, PHEMA-G ve PHEMA-G-BSA100 kriyojel grupları için Mikro-CT taraması (SkyScan1272, Bruker, ABD) gerçekleştirilmiştir. Mikro-CT taramasında kullanılmak amacı ile hazırlanan kriyojeller, şırıngaya dökme yöntemi ile kolon şeklinde sentezlenmiş olup, ön hazırlık olarak liyofilizatörde (Christ Alpha 1-2 LD, Maryland, ABD) dondurma-kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem, 0.031 mbar basınç altında, -61°C'de, 48 saat sürmüştür. Ardından örnekler, 40 kV voltajda ve 160 µA (mikroamper) gücünde ışınlamalar uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar CT Analyser programı (1.20.3.0 versiyonu) ile analiz edilmiştir.

3.3.4. Fourier transform infrared (FTIR) spektrometresi ile yapı analizi

PHEMA temelli kriyojellerin yapısına, BSA ve gluteraldehitin katılıp katılmadığını analiz edebilmek için PHEMA, PHEMA-BSA, PHEMA-G-BSA kriyojellerinin yapıları FTIR Spektrometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet İ550, Waltham, MA, ABD) ile incelenmiş ve elde edilen veriler birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Analiz işleminden önce, ön hazırlık aşamasında, örnekler etüvde 40°C’de kurutulmuştur. Ardından örneklerin 650-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrumu alınmıştır.

3.3.5. Bradford deneyi ile kriyojellerin yapısına katılan BSA’nın analizi

Burada, özelliklerdeki kriyojel gruplarının BSA’yı yapılarına katabilme başarılarının analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, BSA için bradford deneyi yapılmış ve standart grafiği oluşturulmuştur. Bradford deneyi kapsamında, BSA stok çözeltisi hazırlanmıştır. Örnekler, stok çözeltisinden protokole uygun konsantrasyonlarda alınıp eppendorf tüplerine alınıp üzerlerine 1,5 mL Bradford solüsyonu eklenerek, oda sıcaklığında, 25 dakika boyunca bekletilmiştir. Ardından spektrofotometrede BSA’nın 595 nm’de ölçümleri gerçekleştirilmiştir [256].

Sentezlenen farklı özelliklerdeki kriyojel gruplarının, içeriğindeki değişen BSA konsantrasyonları ve BSA’nın çapraz bağlayıcısı olan gluteraldehitin kullanılıp kullanılmamasına bağlı olarak, BSA’yı yapılarına katabilme başarılarını inceleyebilmek hedeflenmiştir. Bu amaçla sentezlenen kriyojel grupları, 1 gece +4°C’de muhafaza edildikten sonra, yıkama sularından örnekler alınmıştır. Örneklerle bradford deneyinin yapılmasını takiben, spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.6. PHEMA-BSA kriyojellerin Con A bağlama başarı analizi

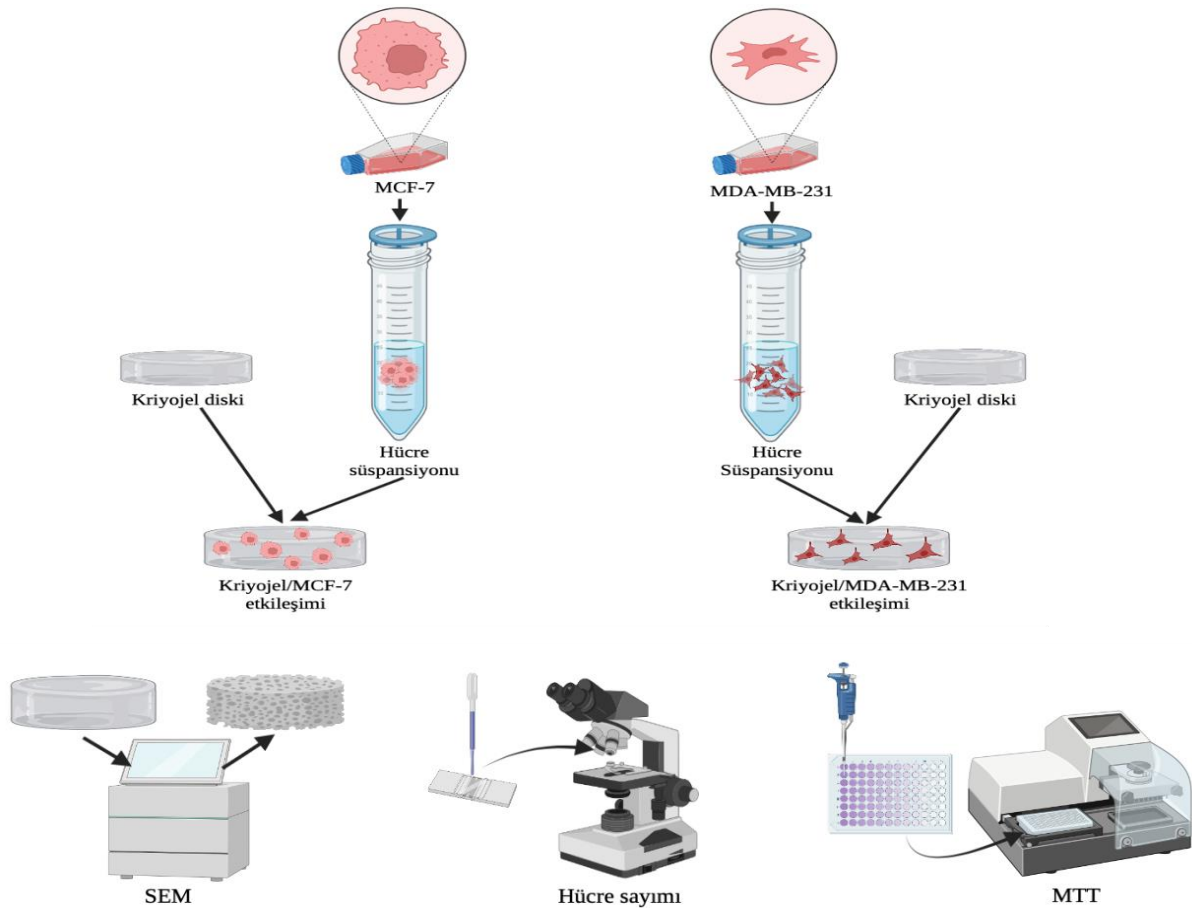
Sentezlenen farklı özelliklerdeki kriyojel gruplarının, içeriğindeki değişen BSA konsantrasyonları ve BSA’nın çapraz bağlayıcısı olan gluteraldehitin kullanılıp kullanılmamasına bağlı olarak, Con A’yı yapılarına katabilme başarılarını inceleyebilmek

hedeflenmiştir. Bu amaçla, Con A bağlama işlemi gerçekleştirilen kriyojel grupları, 1 gece +4°C’de muhafaza edildikten sonra, yıkama sularından örnekler alınmış ve 280 nm’de spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.4. Hücre kültürü çalışmaları

Tez kapsamında, içeriğinde değişen miktarlarda BSA bulunan ve yüzeylerinde ConA lektini bağlı olması açılardan farklı özelliklerde hazırlanmış olan kriyojellerin, kanser hücrelerini yakalama ve ayırıştırma etkinliklerinin, araştırılması amacıyla; MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile çalışılmıştır. Söz konusu hücreler, ATCC’den temin edilmiş olup, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sırasıyla, 25-30 ve 5-10 pasaj aralığında iken kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarındaki deney ve analizlerin genel bir özeti Şekil 3.3. de şematize edilmiş halde bulunmaktadır.



Şekil 3.3. Hücre kültürü çalışmalarının özeti: MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğaltılması, hücre süspansiyonu hazırlanarak kriyojellerle

muamele edilmesi ve hücre süspansiyonundan kanser hücrelerinin bağlanması amacı ile kriyojellerin kullanılabilirliğinin kontrolü amaçlı test ve analizler.

3.4.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğaltılması

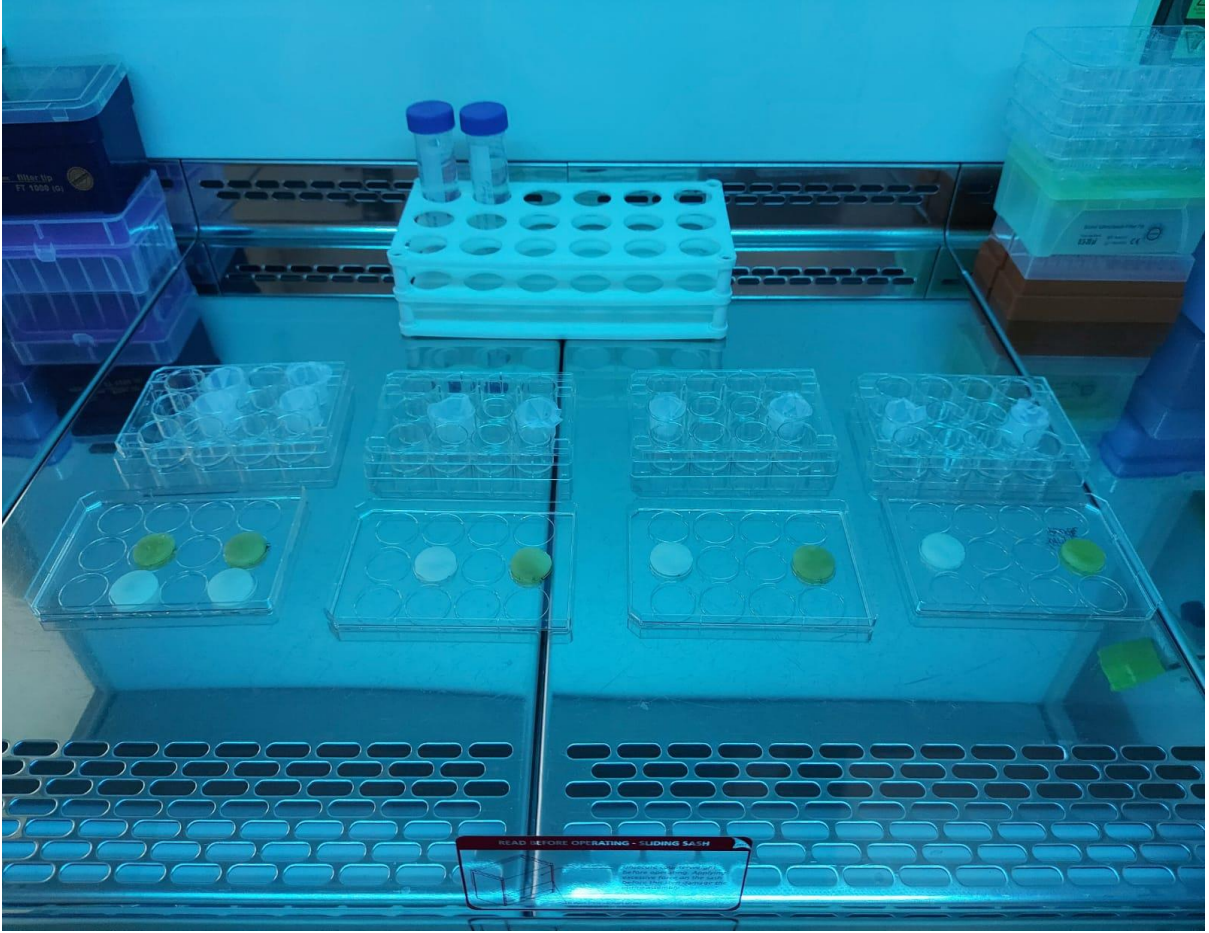
MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri; DMEM besiyerinde, %10 FSS ve 100 U penisilin/ 100 µg streptomisin antibiyotik ile hazırlanan besi ortamında çoğaltılmıştır. Bu amaç ile 75 cm²'lik flaskların içerisindeki besi ortamında bulunan hücreler, sıcaklığı 37°C olan ve %5 CO₂'li etüve kaldırılmıştır.

Hücreler, buldukları flasklarda %80-90 kapasiteye ulaştıklarında besi ortamları değiştirilerek tazelenmiştir. Ardından besi ortamındaki atık besiyeri aspire edilip, ortam 3 mL PBS ile yıkandıktan sonra, hücreleri gerek flasktan gerek ise birbirlerinden ayırmak için 2 mL Tripsin/EDTA ile 2 tekrarlı muamele etme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemleri takiben buldukları ortamdaki hücreler, önceden su banyosunda ısıtılarak 37°C olan taze besi ortamlarına konmuş ve sıcaklığı 37°C olan ve %5 CO₂'li etüve kaldırılmıştır.

3.5. PHEMA-BSA kriyojeller ile *In vitro* hücre kültürü deneyleri

3.5.1. Sterilizasyon

Sentezlenen kriyojel grupları, hücre kültürü deneylerinde kullanılmadan önce, sterilize edilmek amacıyla; öncelikle 21 rpm'de 5'er dakika boyunca PBS ile rotatorda üç defa yıkanmış, ardından da, (deney sırasında hücre bağlanmasını engellemek amacı ile) tüm yüzeyleri hiç boşluk kalmaksızın parafilm ile kaplanan 12 kuyucuklu steril hücre kültür kaplarının kuyucuklarına yerleştirilerek, her iki yüzü de 30'ar dakika boyunca mor ötesi (UV) ışımına maruz bırakılması ile sterilizasyon basamağı tamamlanmıştır (Şekil 3.4.). Böylelikle steril hale getirilen kriyojeller, deneyler için kullanıma hazır hale getirilmiştir.



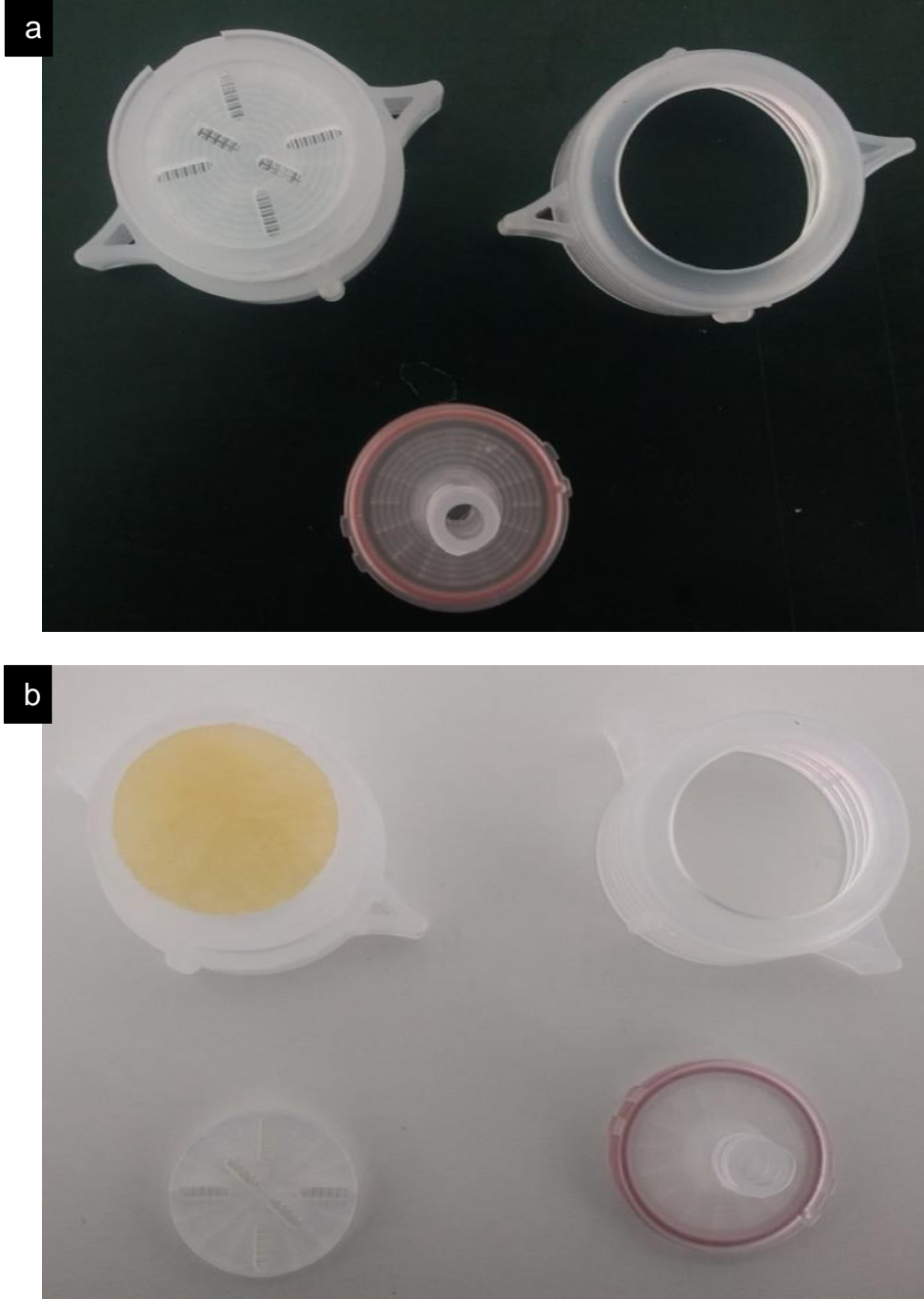
Şekil 3.4. Sterilizasyon amaçlı kriyojel gruplarının UV’de bekletilmesi.

3.5.2. Kriyojellerin hücre süspansiyonu ile muamele edilmesi

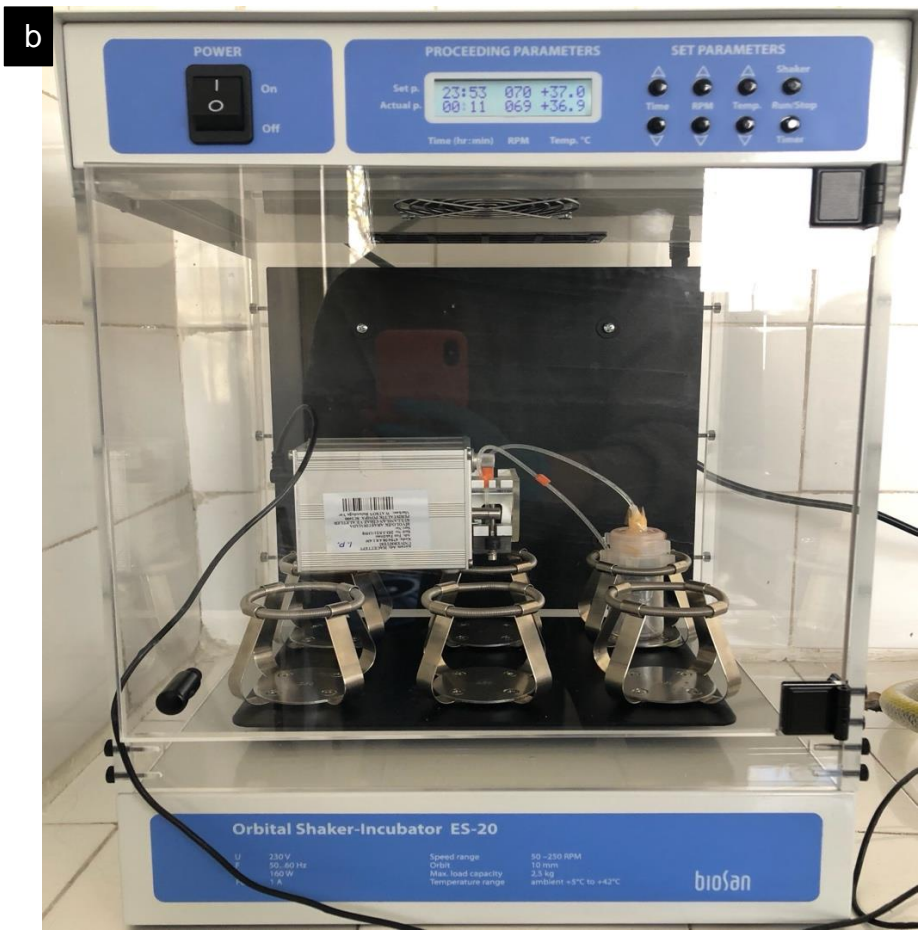
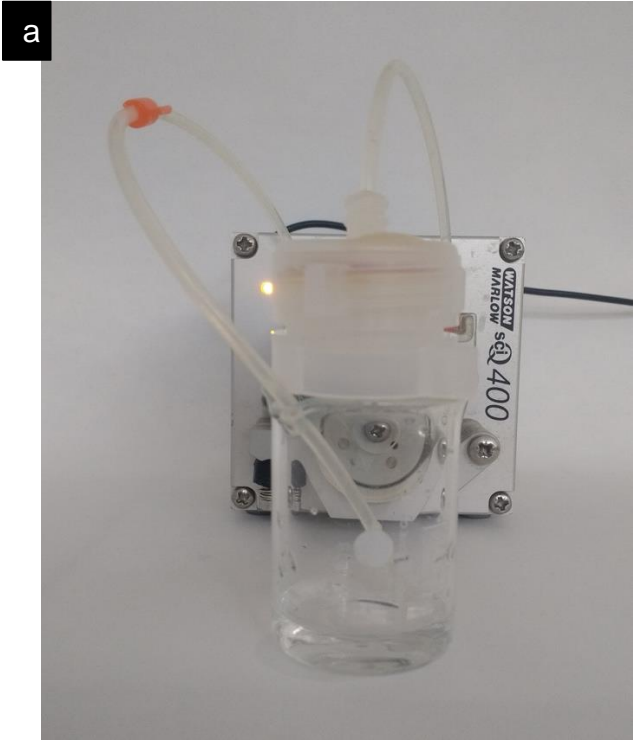
Farklı özelliklerde hazırlanan ve sterilize edilmiş olan kriyojeller, hücre süspansiyonu ile muamele edilmeden önce, deney sırasında hücrelerin buldukları ortama adapte olabilmeleri adına; kriyojeller, %10’luk FSS ve %1’lik penisilin/streptomisin içeren DMEM besi ortamı içerisinde, etüvde bir saat boyunca bekletilmiştir. Ardından besi ortamı uzaklaştırılmış, kriyojeller hücre kültür plağından alınarak devamlı sistem için kullanılacak kartuş düzeneğine alınmıştır.

Sentezlenen farklı özellikteki kriyojel grupları için: Her bir kriyojel diski başına, 5×10^5 hücre gelecek biçimde, fosfat tamponunda (pH 7.0), 5 mL’lik hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Deney peristaltik pompa kullanılarak (0.5 mL/dk akış hızında), devamlı sistemde yapılmış, belirlenen inkübasyon süreleri boyunca (30, 60, 90, 120 dakika), *in vivo* ortamı taklit

edebilir bir ortam olabilmesi adına 37°C sıcaklıktaki, %5 CO₂'li ve uygun nem koşullarını sağlayan etüvde çalışılmıştır (Şekil 3.5 ve 3.6).



Şekil 3.5. a) Devamlı sistemde kullanılacak kartuş sisteminin hazırlanması, b) Kartuş sistemine çalışılacak kriyojel grubunun yerleştirilmesi.



Şekil 3.6. a) Devamlı sistem için kartuş ve peristaltik pompanın kurulması, b) Deney düzeneğinin kurularak hücre süspansiyonunun kartuştan geçirilmesi.

3.5.3. Tripan mavisi ile canlılık testi ve hücre sayımı

Tripan mavisi ile canlılık testi, canlı ve ölü hücrelerin tespit edilerek sayılabilmesi adına çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Normal şartlarda bir hücre eğer canlıysa membran bütünlüğünü korumakta, fakat hücre öldüğünde membran bütünlüğü de bozulmaya başlamaktadır. Hücreler, tripan boyası ile muamele edildiğinde, membranı geçirgen hale gelen ölü hücreleri koyu mavi renge boyanırken; membran bütünlüğünü koruyan canlı hücreler boyanmadan kalmaktadır.

Belirtilen her inkübasyon sürelerinin sonunda, kriyojel diskinden devamlı akışta geçirilen hücre süspansiyonundan 450 µL alınıp, üzerine 50 µL tripan mavisi boyası eklenerek besiyerinde kalan hücrelerin sayımı, burker lamında gerçekleştirilmiştir. Böylece zamana bağlı, kriyojellerin kanser hücresi bağlama başarılarındaki değişim gözlenebilmiştir.

3.5.3.1. PHEMA-BSA kriyojellerin hücre süspansiyonundan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanserleri hücrelerini bağlama kapasitelerinin araştırılması

Sentezlenen farklı özelliklerdeki kriyojellerin, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanserleri hücrelerini bağlama kapasiteleri peristaltik pompa ile devamlı sistemde incelenmiştir. Bağlanma devam ederken belirlenen zaman aralıklarında (30, 60, 90, 120 dakika), hücre süspansiyonundan örnekler alınarak, kriyojellerin değişen zamana bağlı söz konusu hücreleri bağlama kapasiteleri değerlendirilmiştir.

1 g kuru kriyojel diski başına, bağlanan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin miktarı, aşağıda verilen Eşitlik 3.4.'e göre hesaplanmış olup, formülde, “Q” kriyojel diskinin birim kütlesi başına bağlanan kanser hücresi miktarını (hücre/g); “C₀ ve C” sırasıyla, başlangıçta ve inkübasyon sürelerinin sonlarında hücre süspansiyonunda bulunan kanser hücresi derişimini (hücre/mL); “V” hücre süspansiyonu hacmini (mL); “m” ise kriyojel disklerinin kuru ağırlığını (g) ifade etmektedir.

$$Q \text{ Değeri} = [(C_0 - C) \times V] / m$$

(Eşitlik 3.4.).

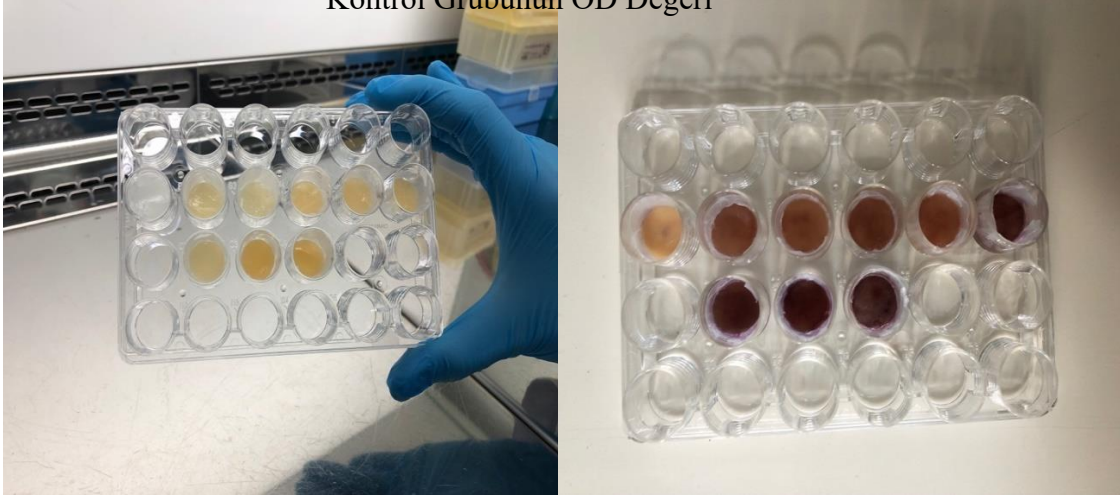
3.5.4. 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) hücre canlılık analizi

3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) testi hücrelerin canlılığını ölçen kantitatif ve kolorimetrik bir yöntemdir. Testin çalışma prensibi; canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondriyel dehidrogenaz enziminin, mor renkte formazan kristalleri oluşturmasına dayanmaktadır. Canlı hücrelerde mitokondriyel aktivite gözleneceğinden, formazan kristallerinin miktarının hücre sayısı ile doğru orantı göstermesi beklenmektedir. Şekil 3.7.'de görüleceği gibi, kriyojel disklerin değişen tonlarda mor/kahve renklere boyanmasını henüz sonuçları almadan önce bile, çıplak gözle görebilmek ve bu doğrultuda hücre canlılığına dair fikir sahibi olabilmek mümkündür [249]. Bu test sayesinde, sentezlenen farklı özellikteki kriyojellerin, değişen zamana bağlı canlı hücre tutuklama başarıları değerlendirilmiştir.

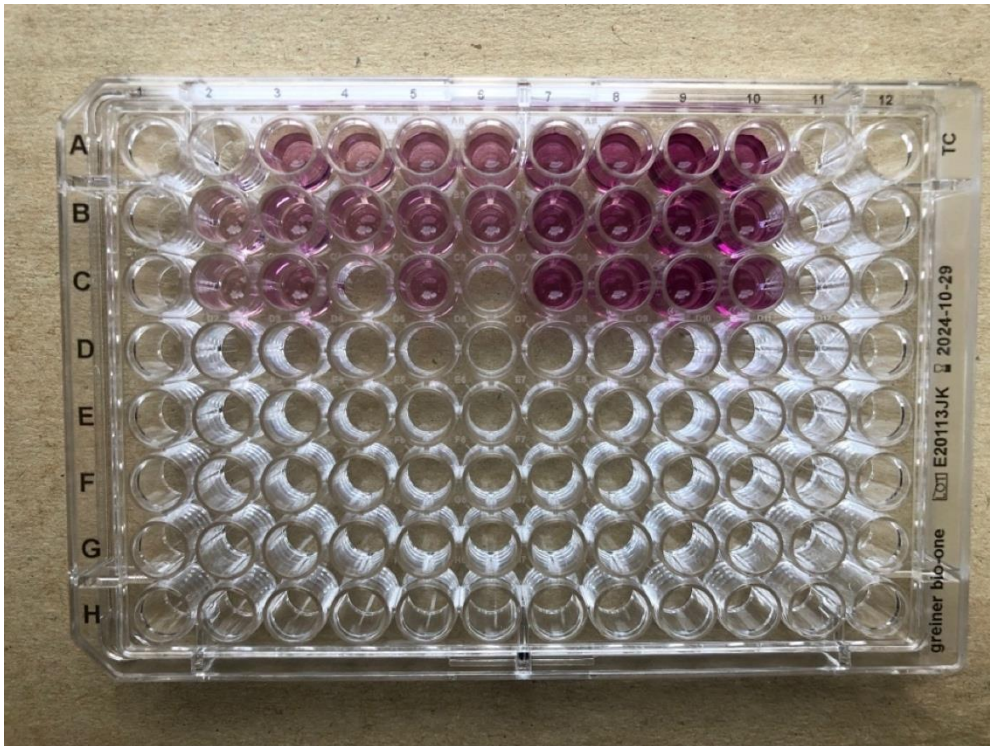
MTT testini uygulamak amacıyla, yukarıda bahsedilen protokolle hazırlanmış kriyojeller; 30, 60, 90, 120 dakika olmak üzere, belirlenmiş dört inkübasyon süresi için gerçekleştirilmiş ve tüm inkübasyon sürelerinin sonunda izlenen yöntem aynı olmuştur. İnkübasyon süresi dolan kriyojeller, öncelikle yüzeyi parafilmle kaplanmış 12 kuyucuklu steril hücre kültür plaklarına alınmış ve içinde buldukları besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Ardından, kriyojel diski başına, 1 mL serumsuz DMEM besiyeri ve üzerine de 100 µL MTT solüsyonu eklenerek, 37°C'de, karanlık ortamda, 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin sonunda, kuyucuklarda bulunan DMEM besiyeri ve MTT uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristallerini çözebilmek adına; kriyojel diski başına 600 µL DMSO/Amonyak çözeltisi (%95 DMSO, %5 Amonyak) eklenerek, oda sıcaklığında, karanlık ortamda, 15 dakika boyunca shakerda çalkalanmıştır. Çıplak gözle dahi görülebilen, içeriğindeki canlı hücre sayısına bağlı değişen tonlarda mor/kahve renkteki çözeltilerden 100 µL alınarak, en az üç tekrarlı olacak şekilde, 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına alınmış ve mikropak okuyucuda (BIOTEK, µQuant), 550 nm'de spektrofotometrik ölçümü gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8.). MTT testi sonrası elde edilen verilerdeki, optik dansite (OD) değerleriyle kriyojel disklerine bağlanan canlı hücre %'si,

aşağıda verilmiş olan Eşitlik 3.5.'e göre hesaplanmış ve sonuçlar birbirleri ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

$$\% \text{ Hücre Canlılık} = \frac{\text{Ölçülen OD Değeri}}{\text{Kontrol Grubunun OD Değeri}} \times 100$$



Şekil 3.7. Farklı kriyojel gruplarının, tutukladıkları meme kanseri hücrelerinin canlılıklarının bir göstergesi olarak mor renkte formazan kristalleri oluşturması sonucunda mor/kahve renklere boyanması.



Şekil 3.8. % Canlılık analizi için örneklerin, 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarında, mikroplak okuyucuda spektrofotometrik ölçüme hazır hale getirilmesi.

3.5.5. SEM Analizi

Farklı özellikteki kriyojel grupları ile yapılan çeşitli test ve analizlerin değerlendirilmesi sonucunda seçilen, PHEMA-G ve PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojelleri ile MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin etkileşimlerini incelemek, söz konusu hücrelerin kriyojellere bağlandığını doğrulayabilmek amacıyla SEM analizi tekrarlanmıştır.

3.5.5.1. Hücreli kriyojel örneklerinin SEM için hazırlanması

SEM analizinde kullanılan hücre tipleri ve kriyojel tipleri aşağıda Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. Söz konusu kriyojel gruplarının, hücre süspansiyonu (5×10^5 hücre/kriyojel), 120 dakika boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kriyojel örnekleri SEM protokolüne uygun bir şekilde hazırlanmıştır. Bu işlem, karakterizasyon çalışmalarında bahsedilen SEM örneği hazırlama protokolündeki basamakların aynen uygulanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, elde edilen SEM görüntüleri ile daha önce çekilen; hücre ekilmemiş kriyojeller örneklerinin SEM görüntüleri, birbirleriyle kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.2. SEM analizi için kullanılan hücrelerin ve kriyojellerin tipleri.

HÜCRE TİPİ	KRİYOJEL TİPİ
MDA-MB-231	PHEMA-G
MDA-MB-231	PHEMA-G-BSA100-ConA
MCF-7	PHEMA-G
MCF-7	PHEMA-G-BSA100-ConA

Hücesiz	PHEMA-G
Hücesiz	PHEMA-G-BSA100

3.6. İstatistiksel Analiz

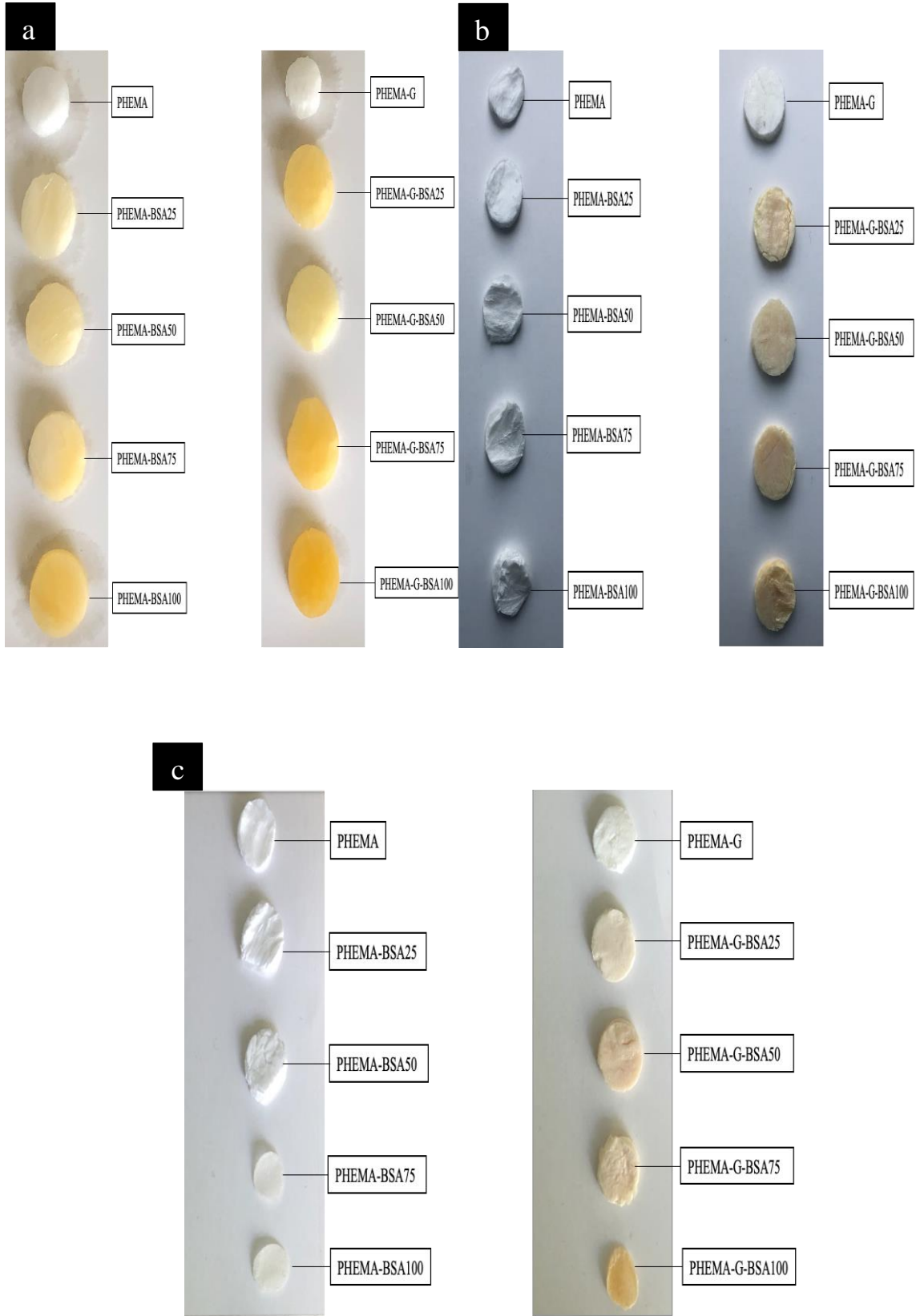
Bu tez çalışmasında, MTT sonuçlarının istatistiksel analizi, Python 3 uygulaması kullanılarak yapılmıştır. Değişkenler, Shapiro-Wilk testi ile normal dağılıma uygun olduğu için gruplar arasındaki karşılaştırmalar, Student t testi ve Anova testleri ile yapılmıştır. Yanılma düzeyi olarak % 5 belirlendiğinde, p değeri 0.05'ten küçük olduğu durumlarda, gruplar arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. PHEMA-BSA kriyojellerin karakterizasyonu

Tez çalışmamızdaki amacımız; sentetik bir polimer olan PHEMA'nın ayarlanabilir özellikleri ile doğal bir polimer olan BSA'nın bir arada kullanılması ile kriyojel temelli kromatografik bir sistem tasarlamaktır. Bu amaçla, içeriğinde değişen konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 75, 100 mg) BSA bulunan beş grup ve yine değişen konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 75, 100 mg) BSA bulundurmasına ek olarak içeriğinde BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan glutraldehiti de içeren beş grup olmak üzere, toplam on gruptan oluşan PHEMA temelli kriyojellerin özellikleri incelenmiştir. Çalışma kapsamında sentezlenen tüm PHEMA temelli kriyojel gruplarının şişmiş ve kuru hallerinin optik fotoğrafları Şekil 4.1.'de verilmiştir.

Yapılan morfolojik incelemelerin sonucunda, yapısında BSA'nın çapraz bağlayıcısı glutraldehiti içeren kriyojel gruplarının; hem daha esnek sünger benzeri bir yapıda hem de daha mekanik olarak dayanıklı oldukları gözlenmiştir. PHEMA temelli kriyojellere, değişen konsantrasyonlardaki BSA'nın etkisi ise bu aşamada morfolojik olarak büyük bir fark oluşturmamakla birlikte, ilerleyen kısımlarda değinileceği üzere, Con A lektini bağlama aşamasında önem taşımaktadır.



Şekil 4.1. PHEMA-BSA kriyojel gruplarının, a) su alarak şişmiş; b) sıkılmış; c) kuru görüntüleri

4.1.1. PHEMA-BSA kriyojellerin şişme davranışları

Kriyojellerin şişme özellikleri, onların bünyelerinde maksimum miktarda suyu tutabilme kapasitesini ifade etmekte olup, kriyojellere geniş bir çalışma alanı imkanı sunmaktadır [79].

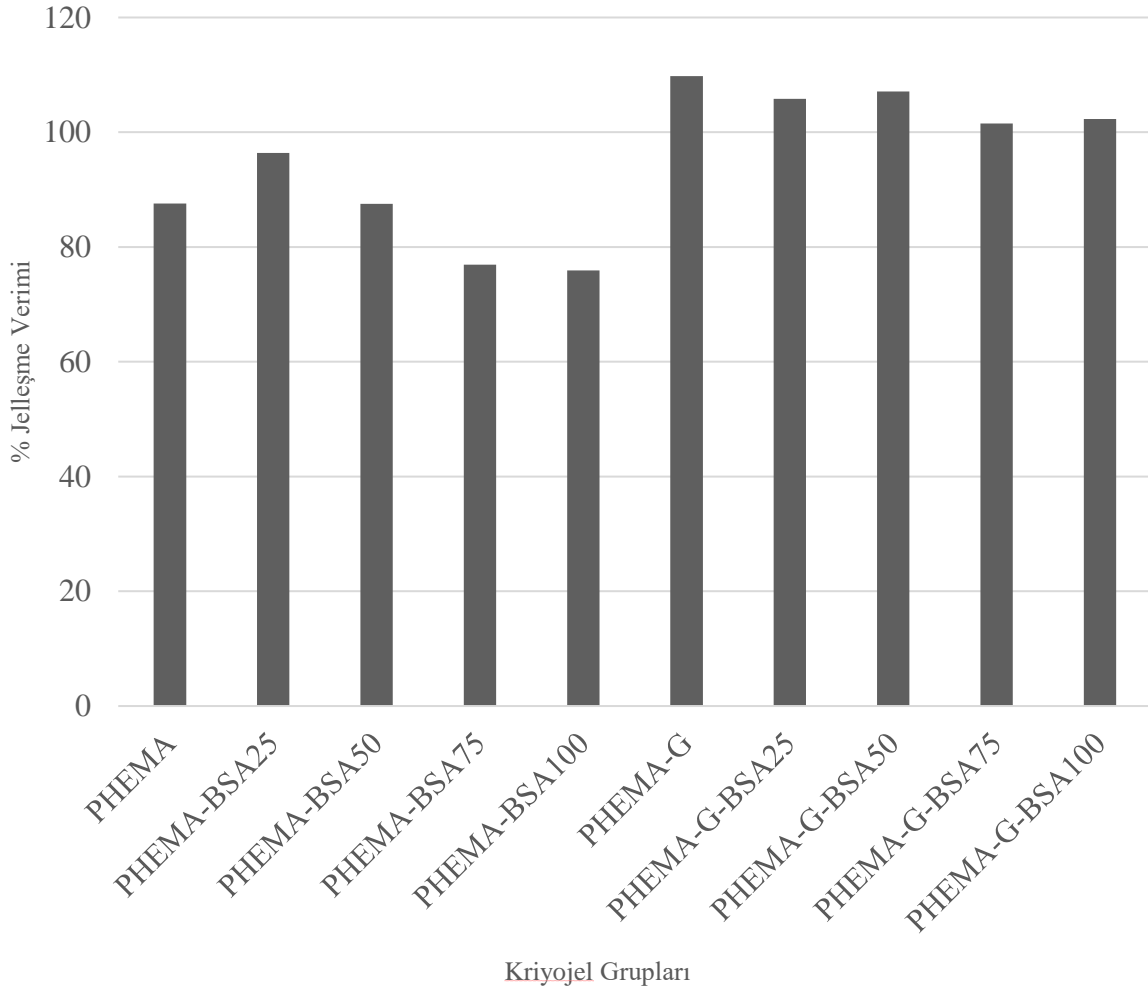
Tez kapsamında hidrofilik karakterdeki PHEMA kriyojellerin sentezinde, tüm gruplara çapraz bağlayıcı olarak MBAAm kullanılmış olup, bahsi geçen beş gruba da MBAAm'a ek olarak, bir diğer çapraz bağlayıcı olan gluteraldehit de kullanılarak, kriyojel daha dayanıklı bir hale getirilmiştir [251]. Ardından, sentezlenen farklı özelliklere sahip PHEMA temelli kriyojel gruplarının, içeriğindeki (gluteraldehit içermesi ve değişen BSA konsantrasyonu gibi) değişkenlerin, kriyojelin ağı gözenek yapıları ve buna bağlı şişme özellikleri üzerine etkisi, yapılan şişme deneylerinin sonuçlarına göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Şişme deneyleri sonuçları.

Kriyojel Tipleri	Şişme Deneyleri	Şişme Oranı (%)	Makrogözenek Miktarı (%)	Jelleşme Verimi (%)
PHEMA		587,5	71,9	87,6
PHEMA-BSA25		585,3	67,5	96,4
PHEMA-BSA50		585,7	71,1	87,5
PHEMA-BSA75		589,3	76,8	76,9
PHEMA-BSA100		587,7	76,4	75,9
PHEMA-G		658,3	75,8	109,8
PHEMA-G-BSA25		643,3	76,9	105,8
PHEMA-G-BSA50		648,0	77,3	107,1
PHEMA-G-BSA75		674,5	79,5	101,5
PHEMA-G-BSA100		681,4	77,6	102,3

4.1.1.1. Jelleşme verimi (%) sonuçların değerlendirilmesi

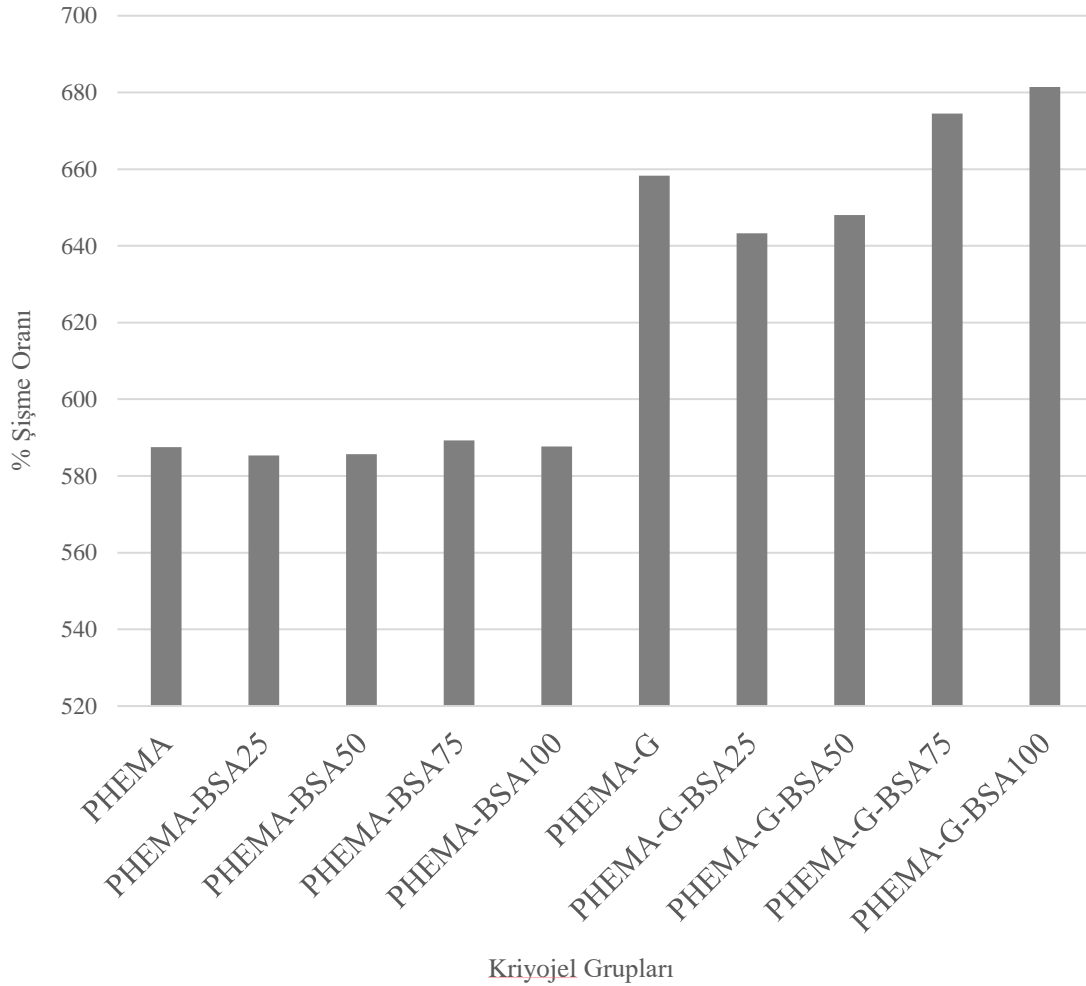
Şişme deneyleri kapsamında incelenen parametrelerden biri olan jelleşme verimi, polimerizasyonun etkin bir şekilde gerçekleşme durumu hakkında bilgi vermektedir. Sentezlenen farklı özellikteki kriyojellerin, jelleşme verimleri, grupların başarılarının birbirleri ile daha iyi kıyaslanabilmesi adına grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.2.). Grafikte de görüldüğü gibi, içeriğinde BSA'nın çapraz bağlayıcısı, gluteraldehit bulunan kriyojel gruplarında, çapraz bağlanma etkinliğinin artmasının bir sonucu olarak, daha iyi bir jelleşme verimi gözlenmiştir. Bununla beraber en düşük jelleşme verimine sahip olan; PHEMA-BSA75 ve PHEMA-BSA100 içeriklerinde BSA'nın çapraz bağlayıcı olan gluteraldehit bulunmamasına karşılık, en yüksek konsantrasyonda BSA içeren gruplar oluşuyla dikkat çekmektedir.



Şekil 4.2. Kriyojel gruplarının jelleşme verimi (%) grafiği.

4.1.1.2. Şişme oranı (%) sonuçlarının değerlendirilmesi

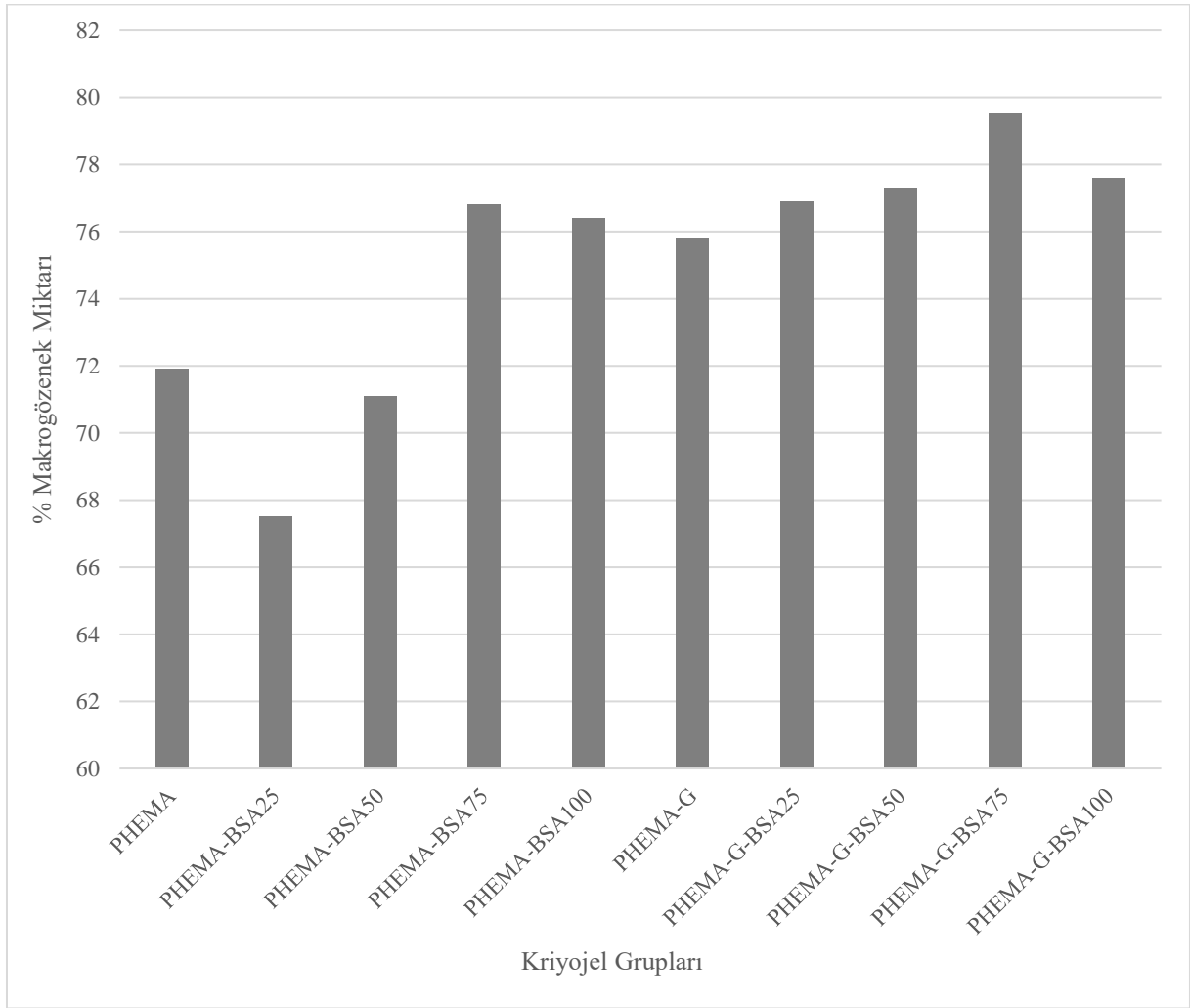
Sentezlenen farklı özellikteki kriyojellerin, şişme oranı, grupların başarılarının birbirleri ile daha iyi kıyaslanabilmesi adına grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.3.). Grafikte de görüldüğü gibi, içeriğinde BSA'nın çapraz bağlayıcısı, glutraldehit bulunan kriyojel gruplarında, su tutma kapasitesindeki artışın bir sonucu olarak, daha iyi bir şişme oranı gözlenmiştir. Üstelik bu artışı artan BSA konsantrasyonları ile ilişkilendirmek mümkündür. Bununla beraber en düşük şişme oranına sahip olan; PHEMA, PHEMA-BSA25, PHEMA-BSA50, PHEMA-BSA75, PHEMA-BSA100, birbirlerine oldukça yakın sonuçlar vermiş olup, bu grupların ortak noktaları ise, hiçbirinin içeriğinde, BSA'nın çapraz bağlayıcı olan glutraldehitin bulunmamasıdır.



Şekil 4.3. Kriyojel gruplarının şişme oranı (%) grafiği.

4.1.1.3. Makrogözenek miktarı (%) sonuçlarının değerlendirilmesi

Sentezlenen farklı özellikteki kriyojellerin, makrogözenek miktarı, grupların başarılarının birbirleri ile daha iyi kıyaslanabilmesi adına grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.4.). Grafikte de görüldüğü gibi, en yüksek jelleşme verimine sahip olan; PHEMA-G-BSA75 ve PHEMA-G-BSA100 kriyojel grupları iken; en düşük makrogözenek miktarına sahip olan ise, PHEMA-BSA25 ve PHEMA-BSA50 kriyojel grupları olmuştur. Kriyojel grupları arasından, içeriğinde BSA'nın çapraz bağlayıcısı, gluteraldehit bulunan gruplarda, çapraz bağlanma etkinliğinin artmasının bir sonucu olarak, daha iyi bir makrogözeneklilik derecesi gözlenmiştir. Ayrıca gluteraldehit varlığında artan BSA konsantrasyonunun da makrogözenek miktarı üzerinde olumlu bir etki gösterdiğini söyleyebilmek mümkündür.

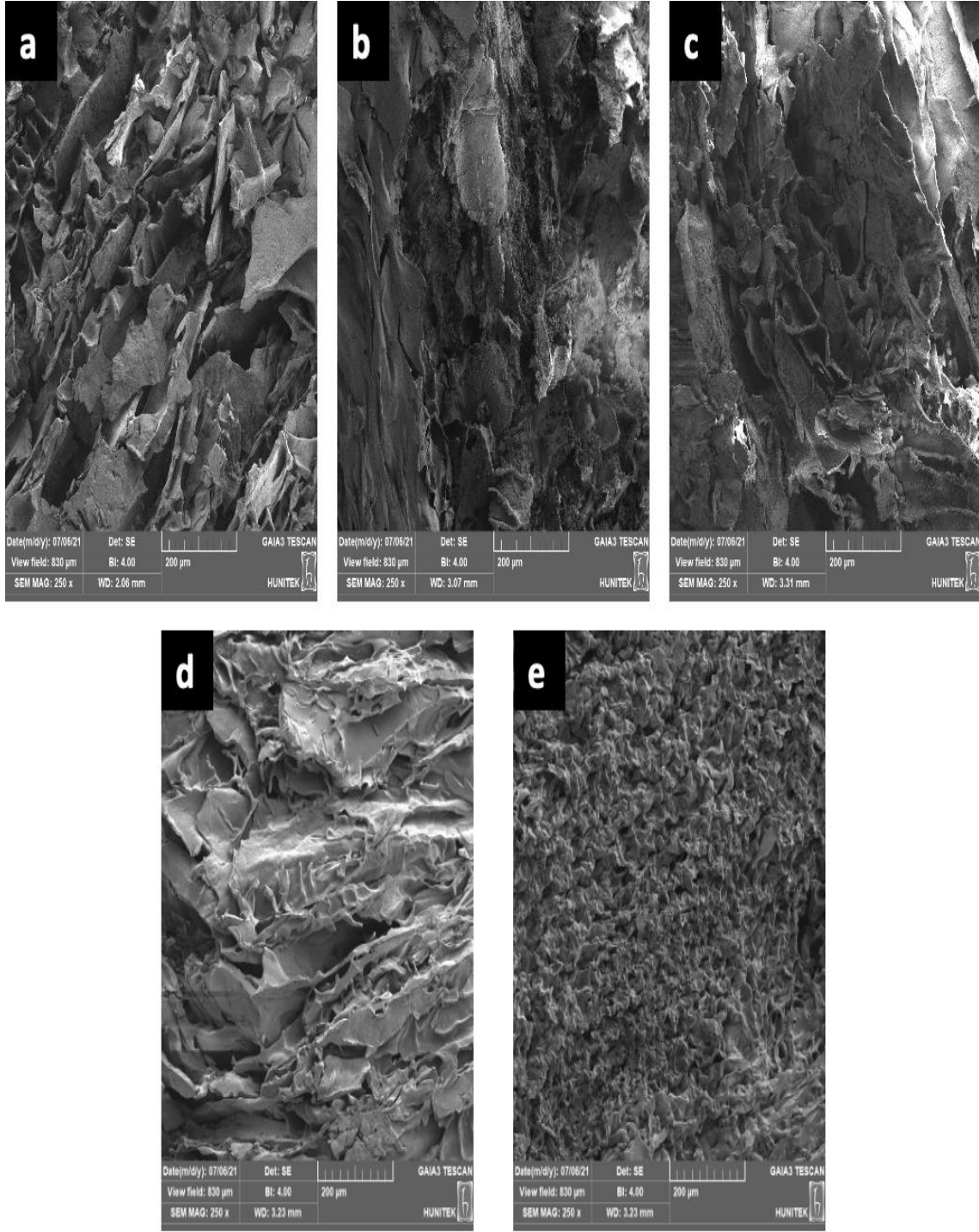


Şekil 4.4. Kriyojel gruplarının makrogözenek miktarı (%) grafiği.

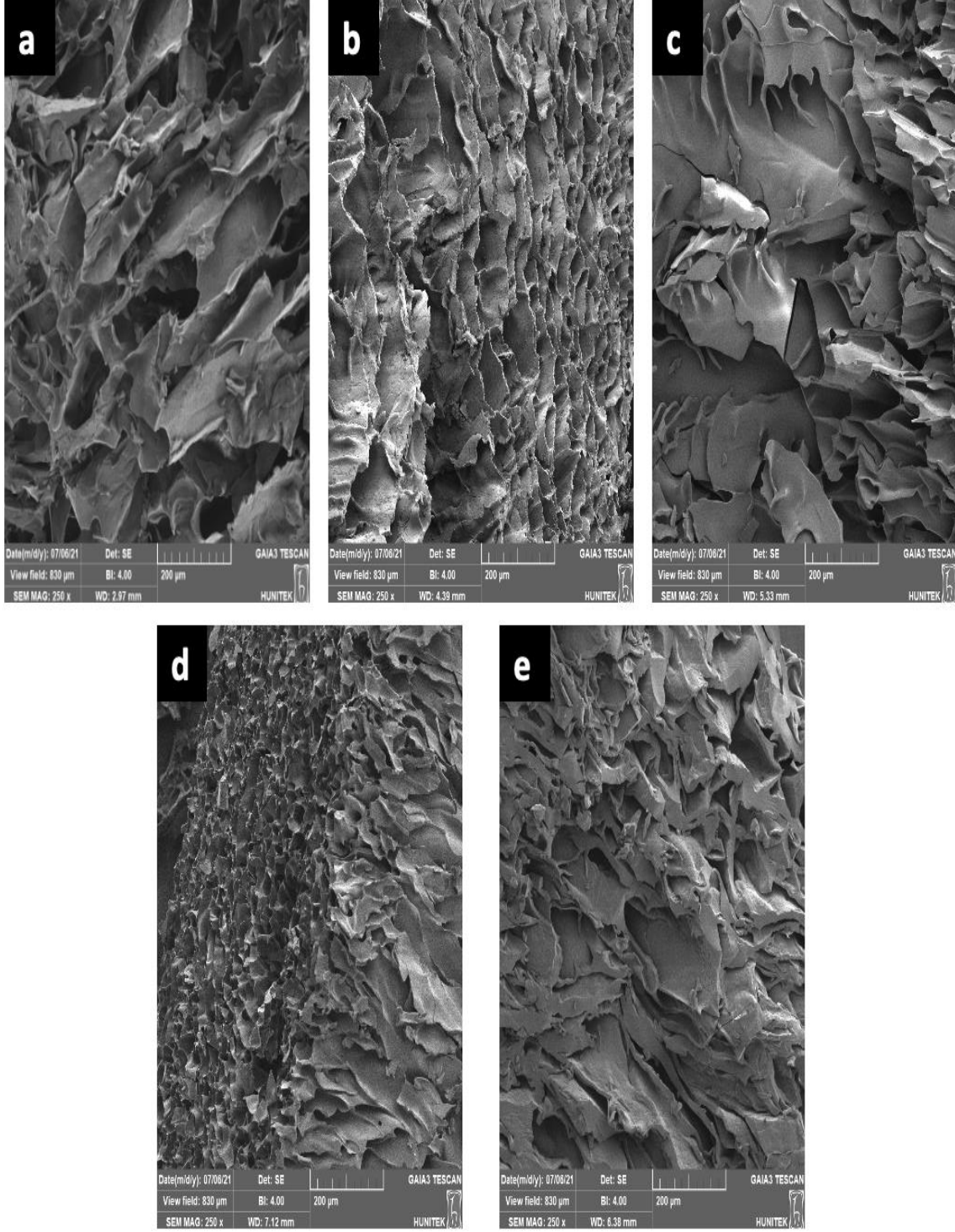
4.1.2. PHEMA-BSA kriyojellerin SEM ile yüzey özelliklerinin değerlendirilmesi

Kriyojellerin birbirleri ile bağlantılı geniş gözeneklere sahip olmaları, kurulan deney düzeneğinde geri basınç sorunu ile karşılaşılması adına oldukça önemlidir. Bu amaçla, PHEMA temelli kriyojellerin birbirleri ile bağlantılı gözeneklerinin incelenmesi amacıyla SEM analizi yapılmış ve kriyojel grupları görüntülenmiştir. SEM görüntülemesi; hem kriyojeller sentezlendikten sonra (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.), hem de *in-vitro* deneylerde kriyojeller, hücre süspansiyonu ile muamele edildikten sonra (Şekil 4.7.) yapılmıştır. Böylelikle, hem değişen kriyojel içeriklerinin gözenek yapısına etkisi hem de *in-vitro* deneyler sonrası MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin, kriyojelin gözeneklerinde bağlanıp bağlanmadığını analiz edebilmek mümkün olmuştur. Karakterizasyon amaçlı yapılan SEM görüntülemelerinde, içeriğinde glüteraldehit bulunan gruplar, bulunmayanlara kıyasla, gözenekleri daha geniştir. *In-vitro* deneylerin sonrasında yapılan SEM görüntülerinde, kontrol grubu olan PHEMA-G kriyojellerinin gözeneklerinde ve yüzeyinde hücrelere oldukça az ya da hiç rastlamazken; yüzeyine Con A lektini bağlanması sonucunda sentezlenen PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojellerinin gözeneklerinde ve özellikle yüzeyinde hücrelere rastlanmıştır. Bu da hem boyut hem affinite temelli DTH ayrımı yapmayı hedefleyen sistemimizin, affinite temelli ayırmada daha başarılı olduğunu göstermektedir.

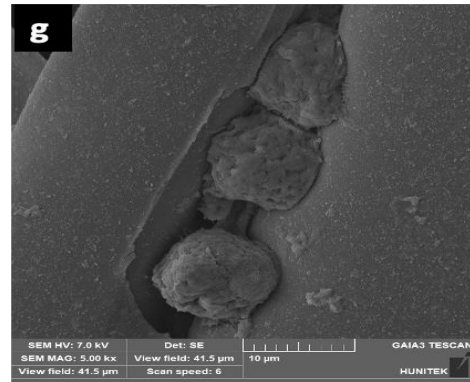
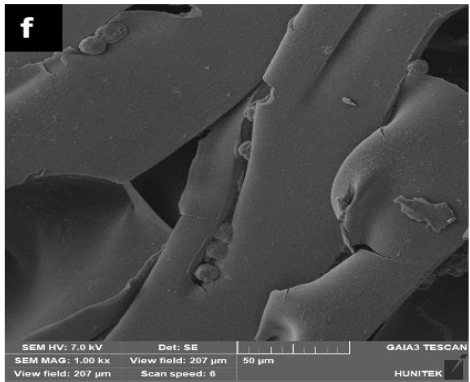
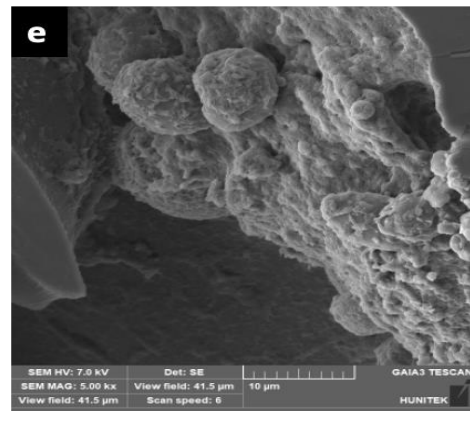
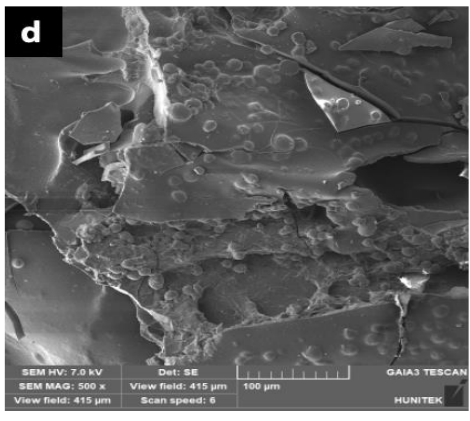
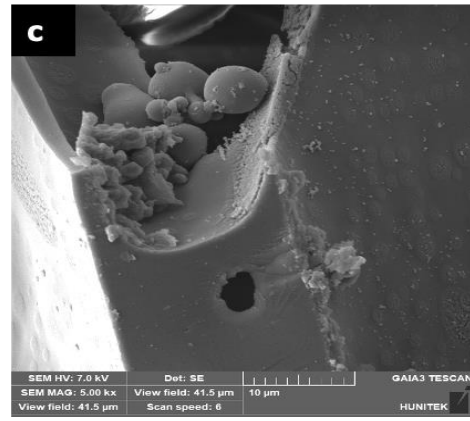
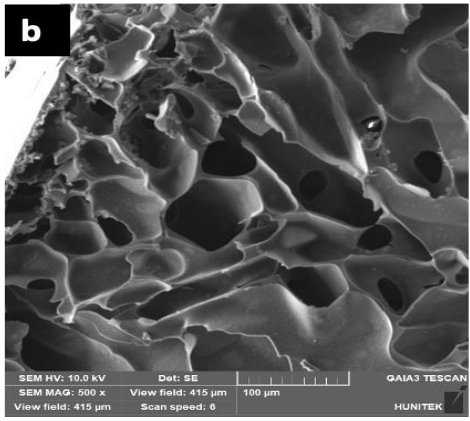
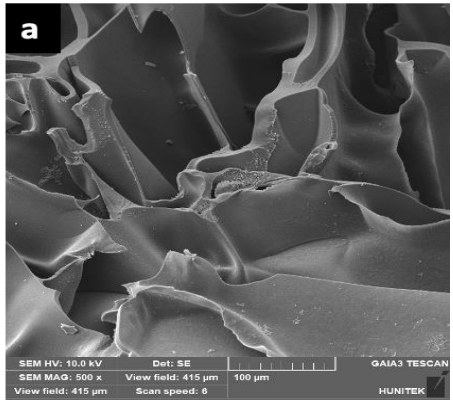
DTH ayırıştırma tekniklerinden olan immünoaffinite temelli pozitif zenginleştirme yöntemlerinden CellSearch, MACS, IMS gibi teknolojiler başta olmak üzere pek çok teknik DTH'ı ayırıştırma adına EpCAM antikorunu kullanmaktadır. Bu durum, bu teknolojileri EpCAM bağımlı olmasına sebep olup, DTH yüzeyinde EpCAM antikorunun bulunmadığı takdirde bu teknolojiler DTH yakalaması yapamamaktadırlar. Bizim geliştirdiğimiz affinite sisteminde ligand olarak Con A lektinini kullanmamız, kanser hücrelerinin yüzeyinde artan glikolipid tabakasını hedeflediğinden böyle bir kısıtlılık söz konusu olmamakla birlikte farklı DTH ile çalışabilmeyi mümkün kılmasının yanı sıra, özellikle metastatik tipteki DTH'nin yakalanması konusunda sergilediği başarıları literatürde rastlanmaktadır [201, 218, 219, 221].



Şekil 4.5. a)PHEMA, b)PHEMA-BSA25, c)PHEMA-BSA50, d)PHEMA-BSA75, e)PHEMA-BSA100 tez çalışması kapsamında sentezlenen kriyojel gruplarının SEM görüntüleri: 200 µm.



Şekil 4.6. a)PHEMA-G, b)PHEMA-G-BSA25, c)PHEMA-G-BSA50, d)PHEMA-G-BSA75, e)PHEMA-G-BSA100 tez çalışması kapsamında sentezlenen kriyojel gruplarının SEM görüntüleri: 200 µm.

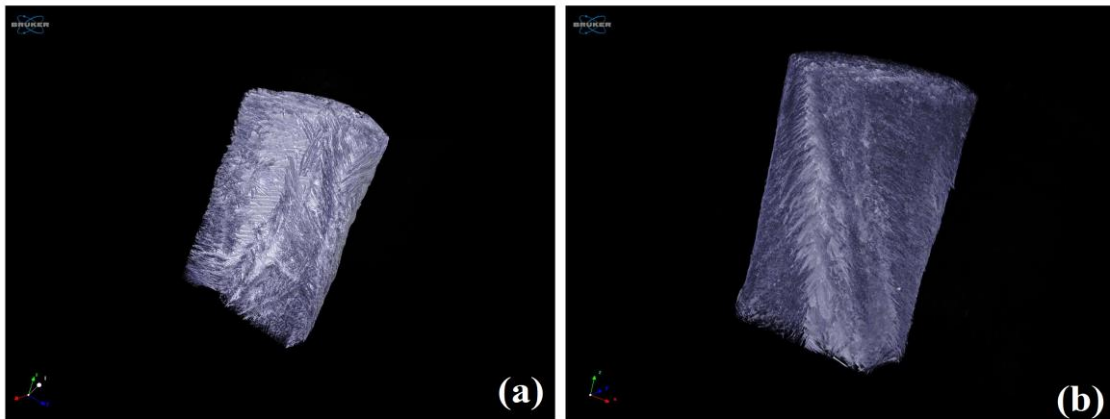


Şekil 4.7. SEM görüntüleri: a) MDA-MB-231, PHEMA-G, b,c) MCF-7, PHEMA-G, d,e) MDA-MB-231, PHEMA-G-BSA100-ConA, f,g) MCF-7, PHEMA-G-BSA100-ConA.

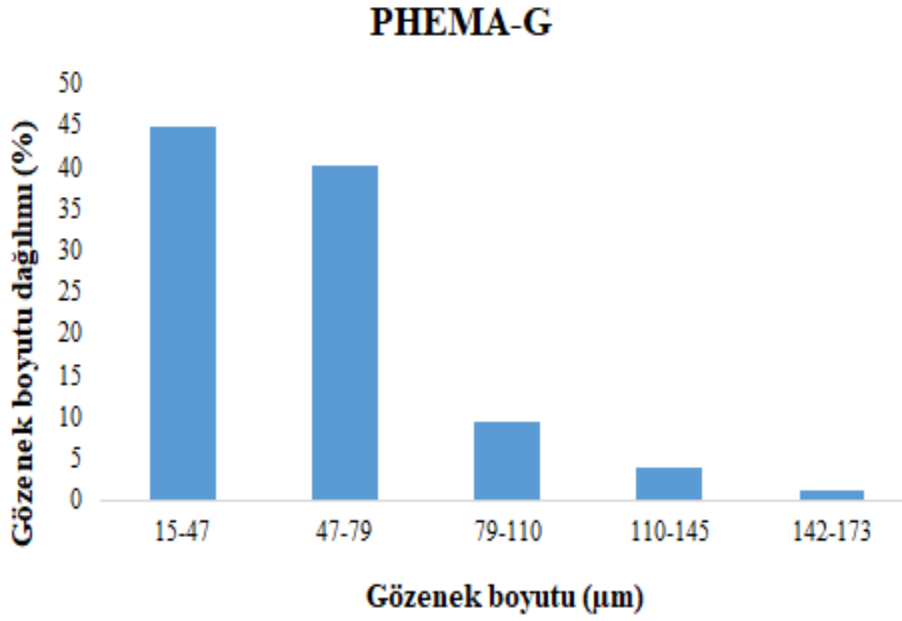
4.1.3. PHEMA-BSA kriyojellerin Mikro-CT sonuçları

Tez çalışması kapsamında, PHEMA-BSA kriyojeller ile DTH ayrıştırılması hedeflenen sistemin etkin bir şekilde DTH tutuklayabilmesi için geniş ve birbirleri ile bağlantılı makrogözenek yapılarının önemine sıklıkla vurgu yapılmıştır. Bu amaçla, kriyojellerin gözenek durumları hakkında bilgi sahibi olabilmek adına yapılan şişme deneyleri, Mikro-CT analizileri ile desteklenmiş ve çıkan sonuçlar birbirleri ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

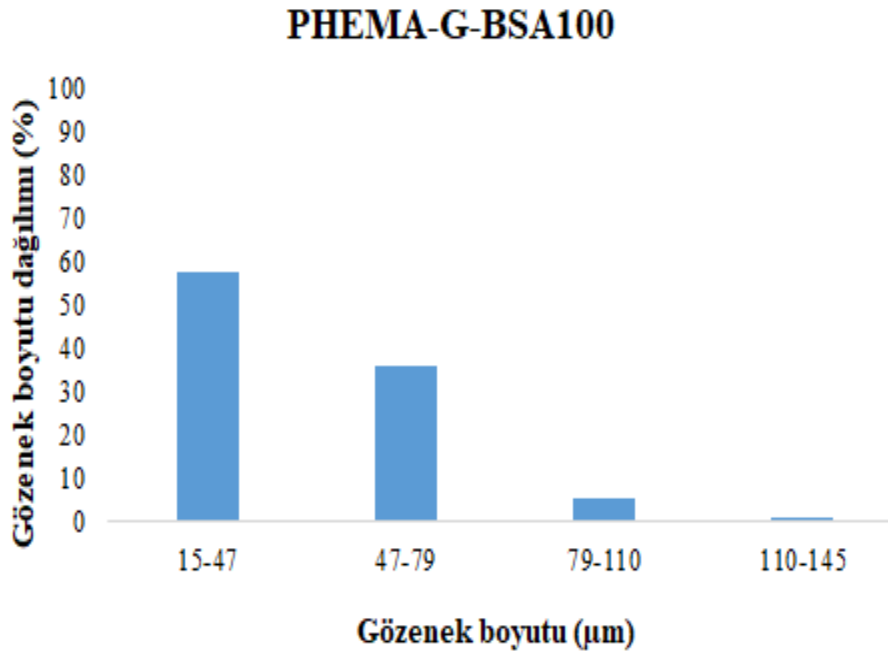
PHEMA-G ve PHEMA-G-BSA 100 kriyojel örneklerinden, X ışınları geçirilerek, kriyojellerin gözenek boyutları ve gözeneklerin dağılımlarının modellenmesini mümkün kılan Mikro-CT analizi sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.8.'de verilmiştir. Yapılan Mikro-CT analizi kapsamında, PHEMA-G (Şekil 4.9.) ve PHEMA-G-BSA100 (Şekil 4.10.) kriyojellerinin verdikleri görüntüler karşılaştırılmış ve kriyojelin içeriğinde BSA bulunmasının jelin gözenekleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde PHEMA-G kriyojelin gözenek boyutunun 15-173 µm arasında değiştiği, gözenek yüzdesinin %79.7 olduğu bulunmuştur. PHEMA-G-BSA100 kriyojelin gözenek boyutunun 15-145 µm arasında değiştiği, gözenek yüzdesinin %84.8 olduğu bulunmuştur. Gözenek yüzdesinin kontrol grubu olan PHEMA-G kriyojelden yüksek çıkması PHEMA-G-BSA100 kriyojelin başarısını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar literatürde hazırlanmış, içerikleri farklı PHEMA temelli kriyojeller ile karşılaştırıldığında başarılı bulunmuştur. Çalışmada PHEMA temelli kriyojelin gözenek yüzdesi bizim çalışmamız ile benzer olarak %80 bulunmuştur [253].



Şekil 4.8. a) PHEMA-G; b) PHEMA-G-BSA100 kriyojellerinin Mikro-CT görüntüleri.



Şekil 4.9. PHEMA-G kriyojelinin Mikro-CT analiz sonuçlarına bağlı gözenek boyut/dağılım analizi.

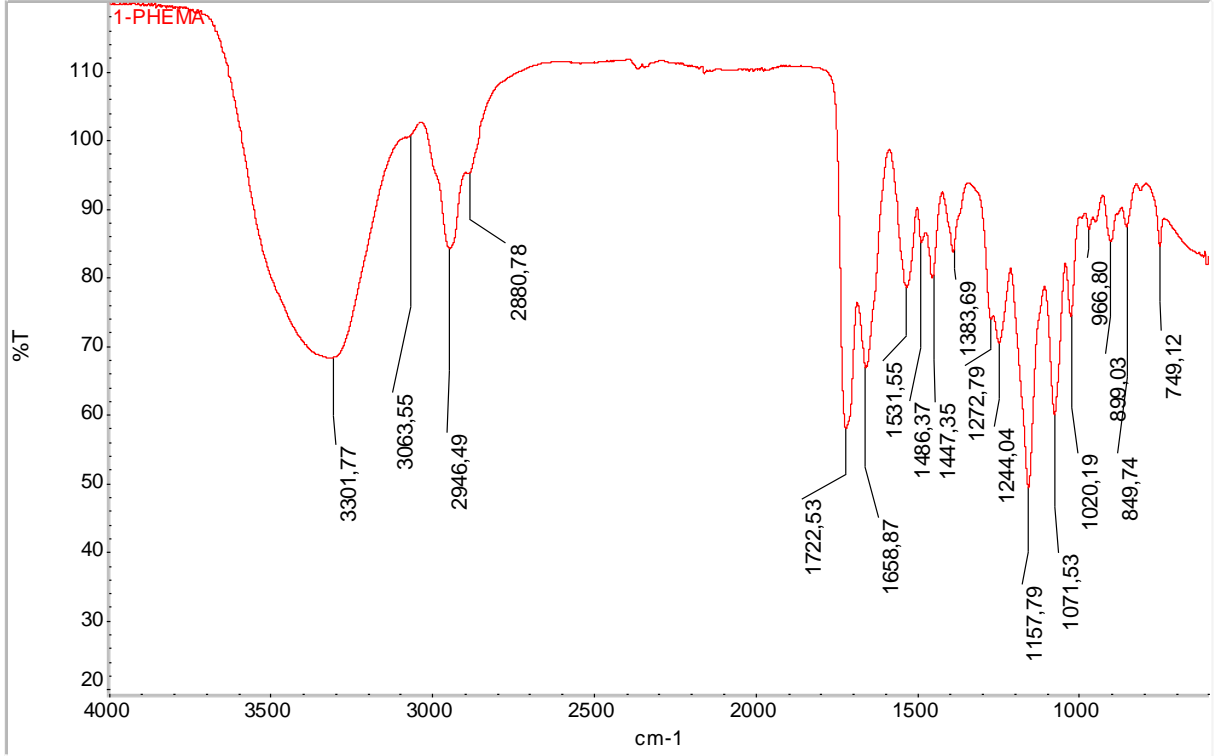


Şekil 4.10. PHEMA-G-BSA100 kriyojelinin Mikro-CT analiz sonuçlarına bağlı gözenek boyut/dağılım analizi.

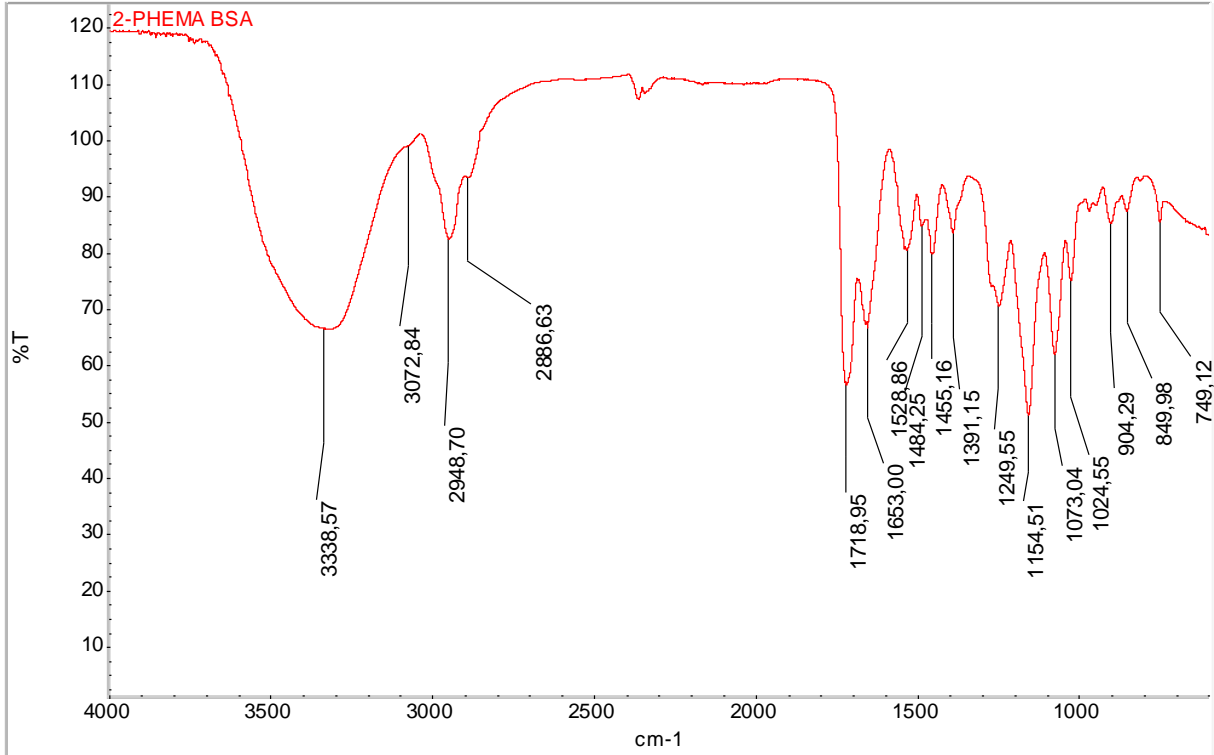
4.1.4. PHEMA-BSA kriyojellerin FTIR ile yapı analizi sonuçları

Tez çalışması kapsamında sentezlenen PHEMA, PHEMA-BSA ve PHEMA-G-BSA kriyojellerin infrared spektrumları alınmıştır. Böylelikle, PHEMA temelli kriyojellerin yapısına katılması amaçlanan BSA'nın, çapraz bağlayıcı olan gluteraldedehit kullanarak hazırlanmış PHEMA-G-BSA ve çapraz bağlayıcı kullanılmadan hazırlanan PHEMA-BSA kriyojellerin yapısına katılıp katılmadığı infrared spektrumları ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçların kıyaslanabilmesi amacı ile, BSA'nın infrared spektrumundan yararlanılmıştır. FTIR analizi sonucunda PHEMA, PHEMA-BSA, PHEMA-G-BSA kriyojelleri ve BSA'ya ait elde edilen spektrumlar; sırasıyla Şekil 4.11., 4.12., 4.13., 4.14.'te verilmiştir.

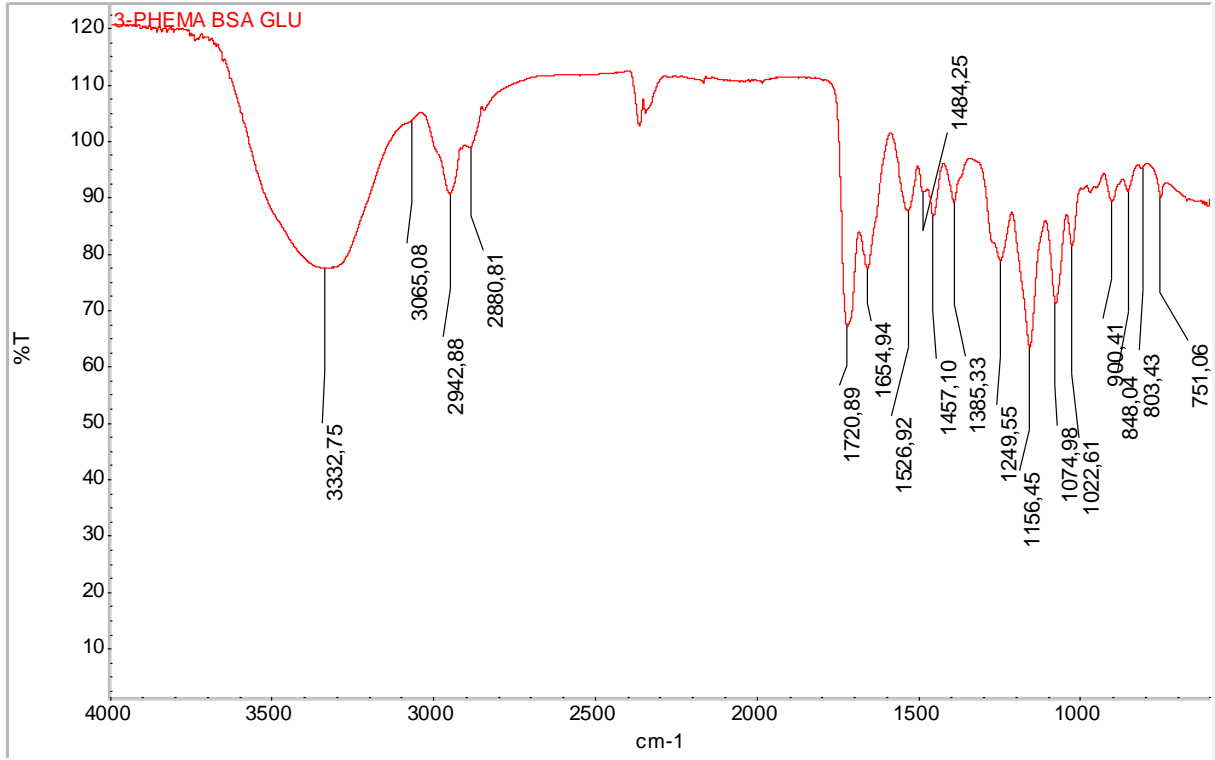
Grafikte verilen spektrumlar incelendiğinde, BSA'ya ait verilen dalga boyları görülmektedir. Literatüre göre, 3284 cm^{-1} 'de O-H gerilme bandı, albüminin protein yapısından kaynaklı amid I ve amid II bantları 1641 cm^{-1} 'de ve 1521 cm^{-1} 'de görülmektedir [252]. PHEMA kriyojelin yapısının karakteristik bantları olan O-H gerilme bandı 3301 cm^{-1} 'de C=O gerilme bandı 1722 cm^{-1} 'de görülmektedir. O-H gerilme bandı PHEMA-BSA kriyojelde 3338 cm^{-1} 'e PHEMA-G-BSA kriyojelde 3332 cm^{-1} 'e kaymıştır. C=O gerilme bandı ise PHEMA-BSA kriyojelde 1718 cm^{-1} 'e PHEMA-G-BSA kriyojelde 1720 cm^{-1} 'e kaymıştır. BSA'nın yapısında yer alan amid bantlarına PHEMA-BSA ve PHEMA-G-BSA kriyojelin yapısında da rastlanmaktadır [253]. Amid bantları sırasıyla PHEMA-BSA kriyojelde 1653 ve 1528 cm^{-1} 'de, PHEMA-G-BSA kriyojelde 1654 ve 1526 cm^{-1} 'de görülmektedir. PHEMA kriyojelin infrared spektrumu incelendiğinde amid I ve II bantlarının 1658 ve 1531 cm^{-1} 'de pik verdiği görülmekte olup, bu durum, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan metilen bisakrilamitin varlığından kaynaklanmaktadır. PHEMA-BSA ve PHEMA-G-BSA kriyojellerde amid I ve II'de dalga boylarında kaymanın gerçekleşmesi BSA'nın PHEMA-BSA ve PHEMA-G-BSA kriyojellerin yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir.



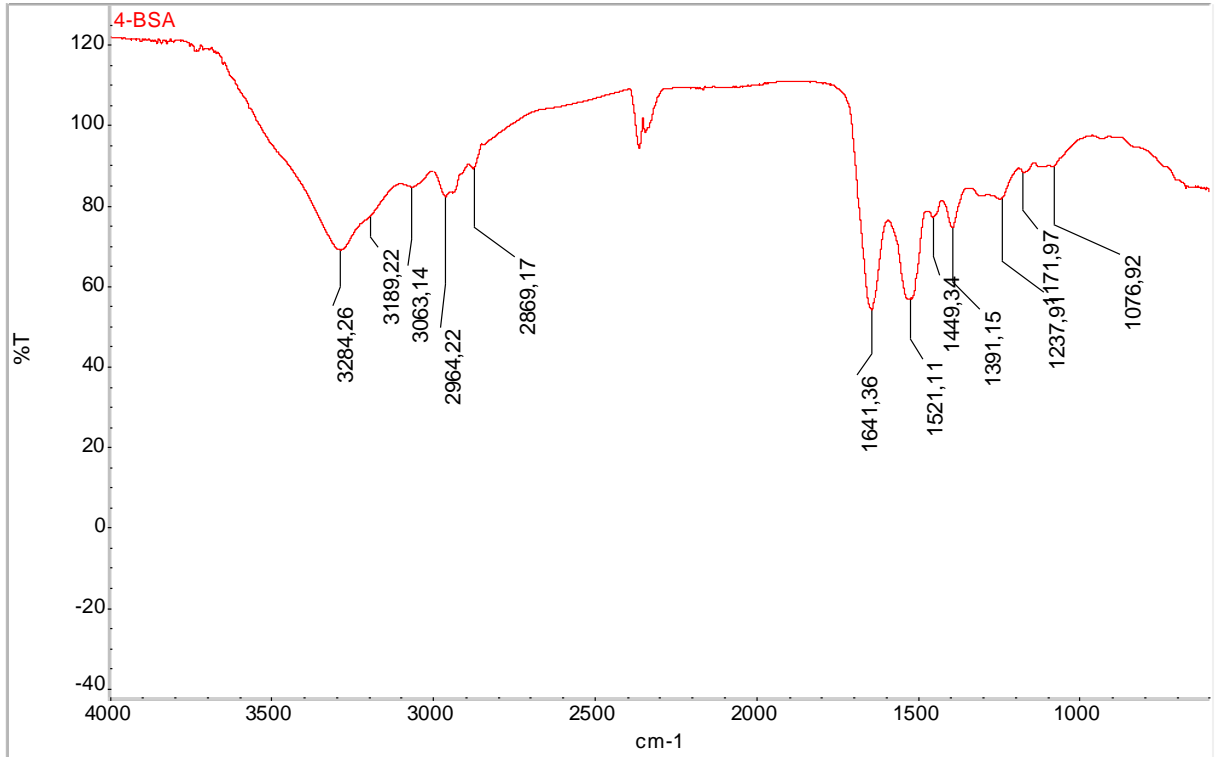
Şekil 4.11. PHEMA kriyojelin FTIR analizi sonucu.



Şekil 4.12. PHEMA-BSA kriyojelin FTIR analizi sonucu.



Şekil 4.13. PHEMA-G-BSA kriyojelin FTIR analizi sonucu.

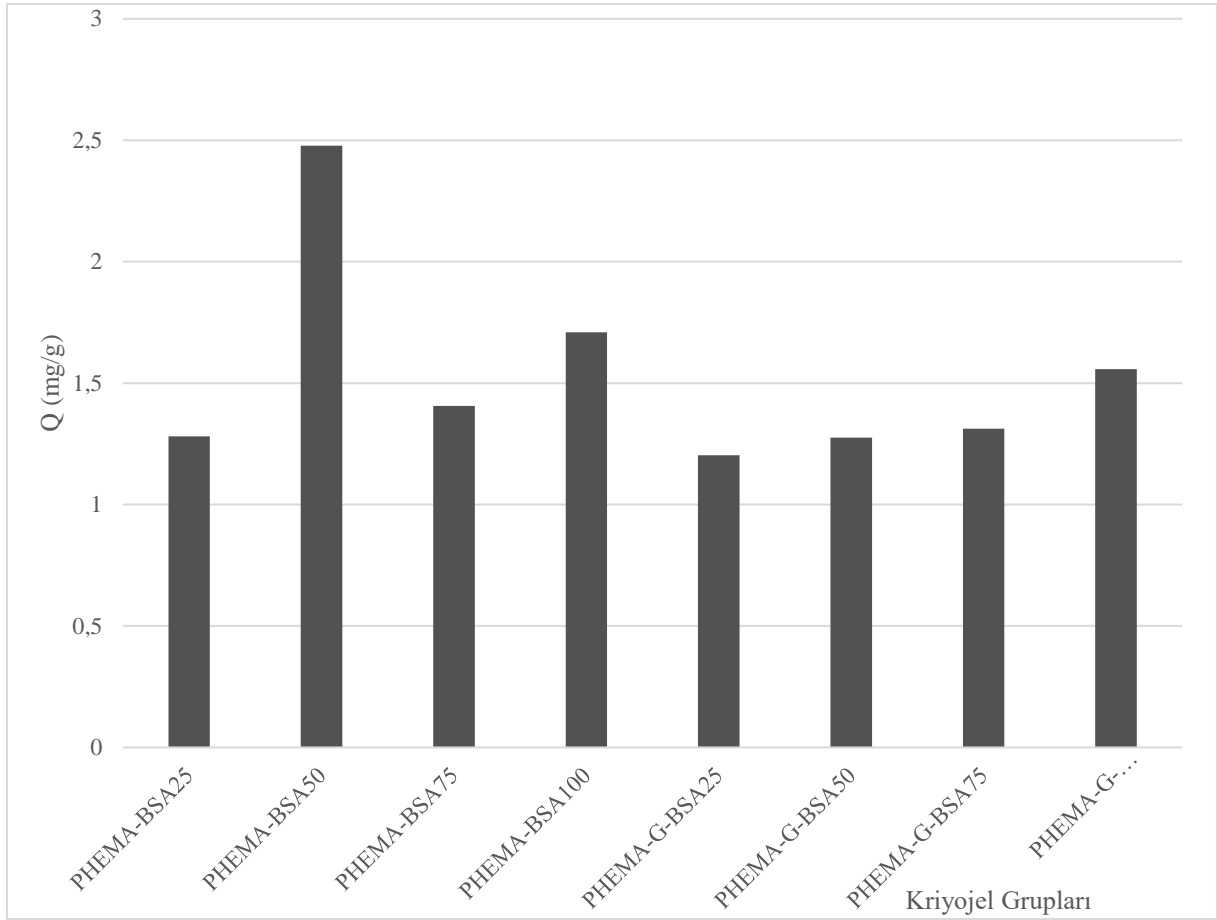


Şekil 4.14. BSA'nın FTIR analizi sonucu.

4.1.5. Bradford deneyi ile kriyojel yapısına katılan BSA'nın analiz sonuçları

Sentezlenen farklı özelliklerdeki kriyojel gruplarının, içeriğindeki değişen BSA konsantrasyonları ve BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan gluteraldehitin kullanılıp kullanılmamasına bağlı olarak, BSA'yı yapılarına katabilme başarılarını inceleyebilmek amacıyla; Kriyojel gruplarının yıkama sularından örnekler alınarak spektrofotometrik analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, BSA standart grafiği ışığında hesaplanmıştır.

Şekil 4.15.'te kriyojellerin sentezlendikten sonra 1 gece bekletilen yıkama sularından elde edilen örneklerin ölçüm sonuçları olup, kriyojellerin BSA sızıntısı yapma davranışlarını ifade etmektedir. Grafikte görüldüğü gibi, içeriğinde BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan gluteraldehit bulunan kriyojel grupları, artan BSA konsantrasyonlarına rağmen BSA'yı etkin bir şekilde yapılarına katarken; içeriğinde gluteraldehit bulunmayan kriyojel grupları BSA'yı yapılarına katmakta nispeten başarısız olmuştur. Bu durum, kriyojellerin yapısına BSA'nın daha etkin bir şekilde katılabilmesi için çapraz bağlayıcı gluteraldehitin kullanılmasının yararlı olacağını göstermektedir.



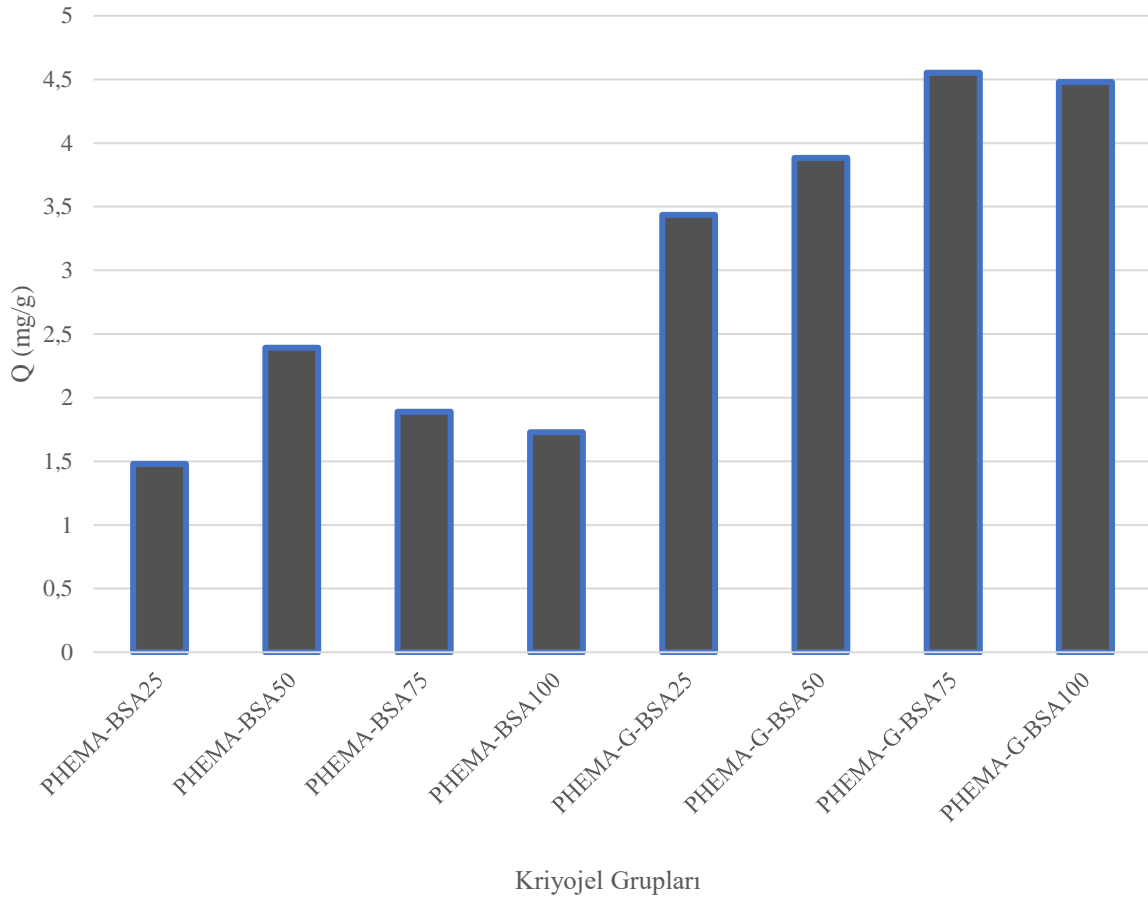
Şekil 4.15. Kriyojel gruplarının BSA sızıntısı sonuçları.

4.1.6. Con A bağlanmasının değerlendirilmesi

Sentezlenen farklı özelliklerdeki kriyojel gruplarının, içeriğindeki değişen BSA konsantrasyonları ve BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan gluteraldehitin kullanılıp kullanılmamasına bağlı olarak, Con A'yı yapılarına katabilme başarılarını inceleyebilmek amacıyla; Con A bağlama işlemi gerçekleştirilen kriyojel gruplarının yıkama sularından örnekler alınarak spektrofotometrik analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Con A standart grafiğinden yararlanılarak, farklı kriyojel gruplarının Con A bağlama kapasiteleri değerlendirilmiştir. Böylece 1 g polimer başına kaç mg Con A bağlandığı bulunmuştur.

Kriyojel gruplarının, Con A lektininin bağlayabilme başarıları Şekil 4.16.'da verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi, içeriğinde BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan gluteraldehitin bulunduğu kriyojel grupları, içeriğinde gluteraldehit bulunmayanlara kıyasla Con A lektinini bağlayabilmede daha başarılı olmuştur. Ayrıca gluteraldehit varlığında artan BSA

konsantrasyonunun da, Con A'nın kriyojele bağlanmasına katkı sağladığını söyleyebilmek mümkündür.



Şekil 4.16. Kriyojellerin ConA'yı yapılarına katma başarıları.

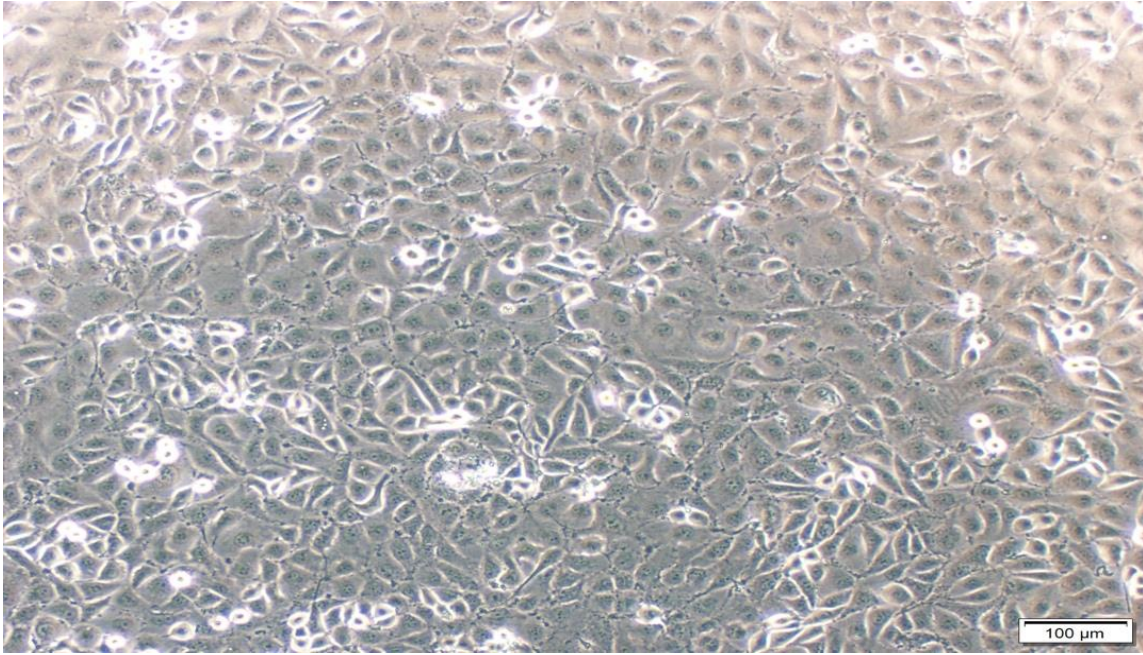
4.2. Hücre kültür çalışmaları

4.2.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin morfolojik görüntüleri

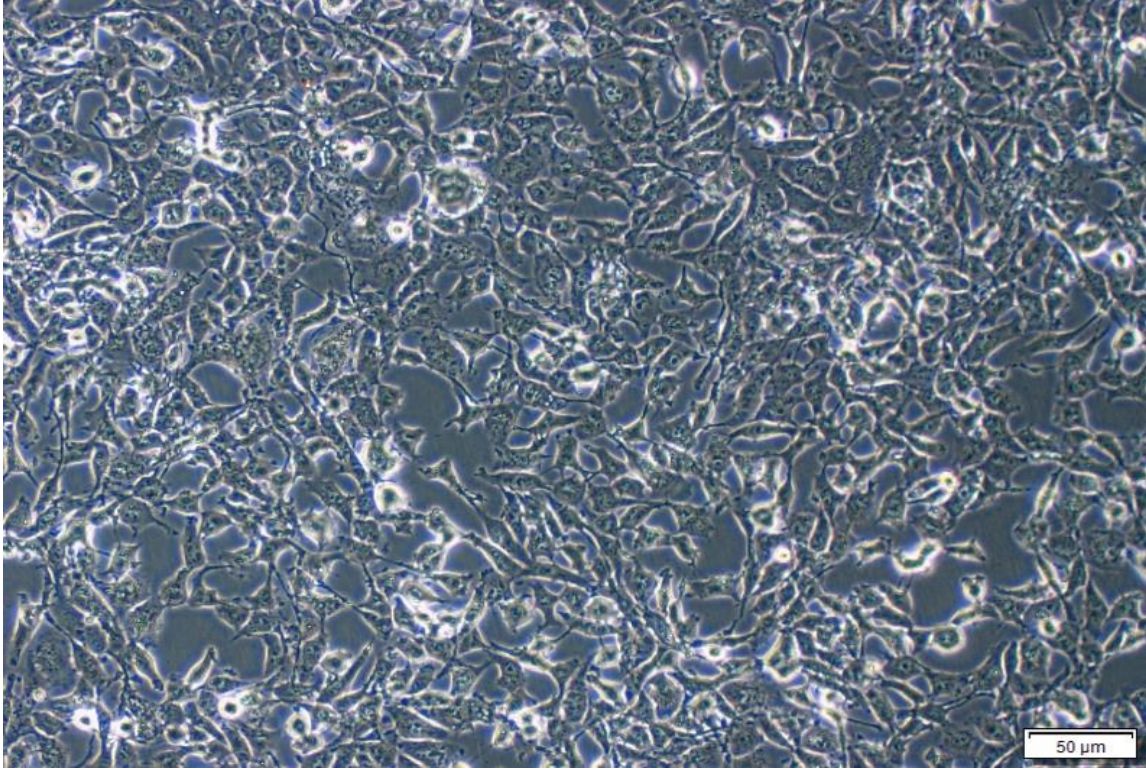
Tez çalışması kapsamında, geliştirilen kriyojel temelli affinite sisteminden geçirilerek ayrıştırılması hedeflenen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri hatlarının, ışık mikroskopunda çekilen görüntüleri, sırasıyla Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.'de verilmiştir.

MCF-7 meme kanseri hücreleri, lüminal A alt tipte, epitelyal fenotipte hücrelerken [178]; MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri, bazal (üçlü-negatif) alt tipte, mezenkimal fenotipte hücrelerdir. [184].

Demircan ve arkadaşları, 2019 yılında yayınladıkları çalışmada, buğday aglütinin lektinini, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hattı hücrelerinin değişen yüzey glikan değişimlerine bağlı ayrımını iki saat gibi kısa bir sürede yapmayı başarmışlardır [254]. Biz de çalışmamızda, maksimum inkübasyon süremizi 2 saat (120 dakika) olarak belirledik. İlk inkübasyon süremiz olan 30. dakikada dahi çalışmamızda kullandığımız kriyojel gruplarımız hücre bağlamaya başlamış, 90. dakikada ve deney sonlanana kadar geçen sürede en yüksek MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri bağlama başarısı elde edilmiştir.



Şekil 4.17. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü.



Şekil 4.18. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü.

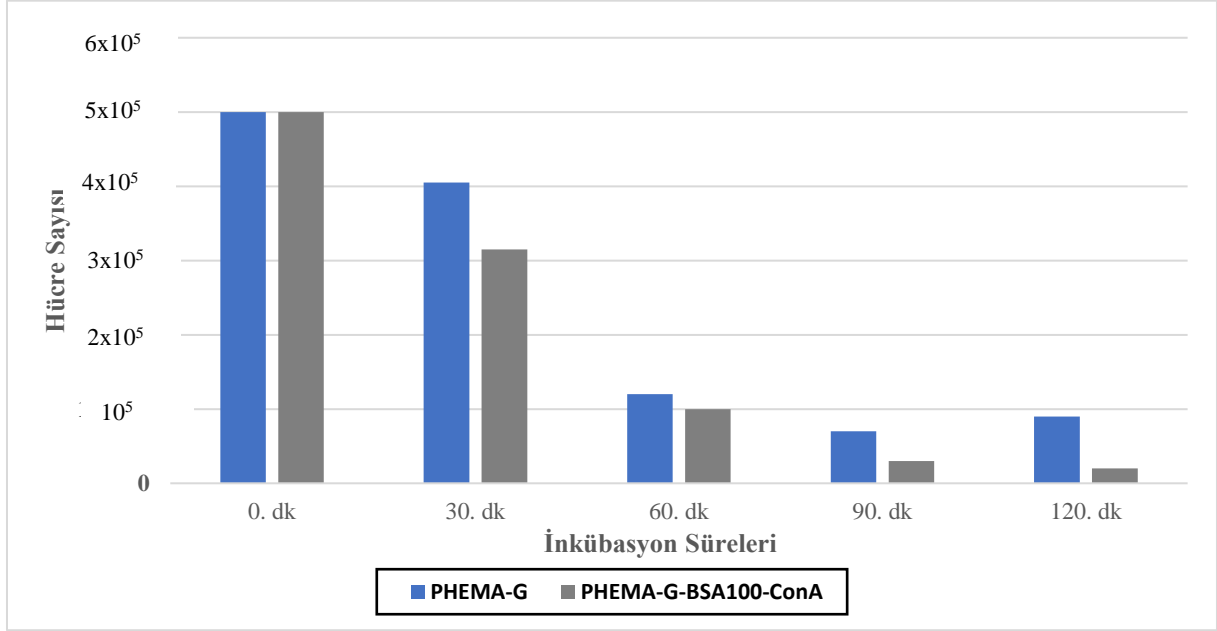
4.3. PHEMA-BSA kriyojeller ile *in-vitro* hücre kültürü deneyleri sonuçları

4.3.1. Tripan mavisi boyası ile hücre sayımı sonuçları

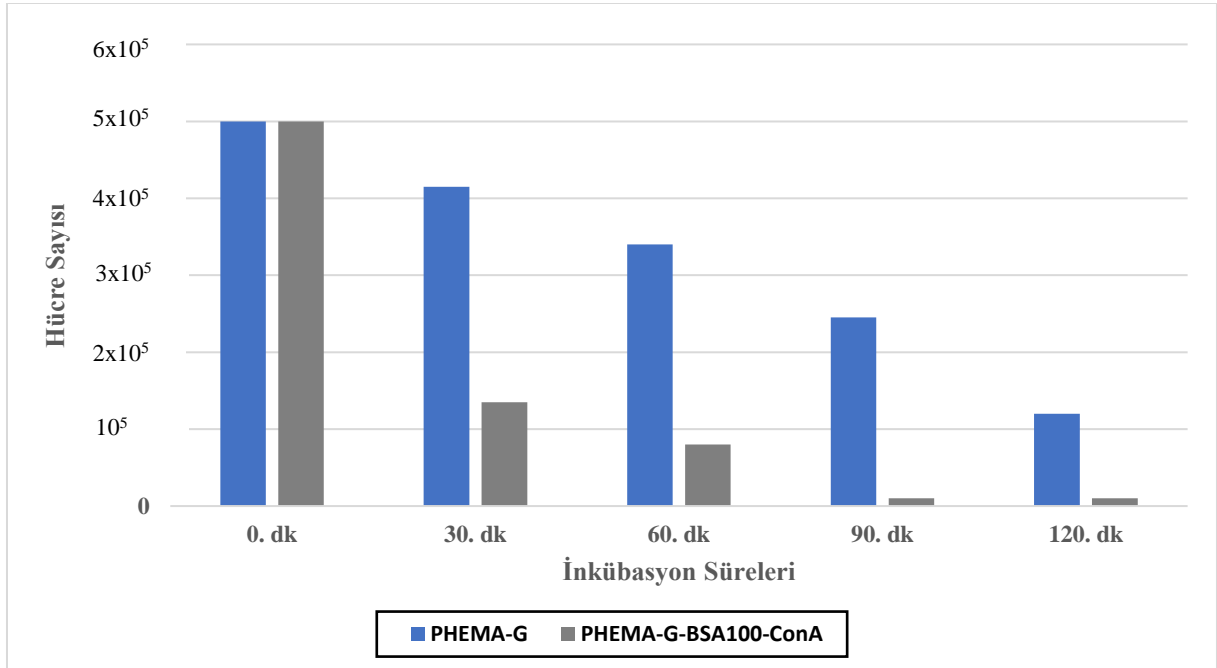
Farklı özellikteki kriyojel gruplarının, devamlı sistemde, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ile muamelesi kapsayan deney sisteminde, daha önce de bahsedildiği 30, 60, 90, 120 dakika olmak üzere 4 inkübasyon süresinin, her birinin sonlarında hücre süspansiyonundan örnek alınıp, tripan mavisi boyası ile boyanmıştır. Bu yöntemle sayımı gerçekleştirilen hücreler, kriyojelde bağlanamayıp, hücre süspansiyonunda bulunan hücreleri ifade etmektedir.

Şekil 4.19. ve Şekil 4.20.'de verilen grafiklerde görüldüğü üzere, PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojeli, her iki hücre grubu (MCF-7 ve MDA-MB-231) ile de oldukça başarılı sonuçlar vermeyi başarmıştır. Buna karşılık kontrol grubu olan PHEMA-G kriyojel, her ne kadar içeriğinde BSA ve ConA bulunmadığından affinite temelli bir ayrıştırma yapamasa da, sahip olduğu makrogözenekli yapısı sayesinde, PHEMA-G-BSA100-ConA grubu kadar olamasa da belirli bir düzeyde hücre bağlamayı başarabilmiştir. Bu açıdan bakıldığında hem boyut hem

affinite temelli kanser hücresi ayırımı yapabilme potansiyeline sahip olan deney düzeneğimizin, affinite temelli ayırımı daha etkin bir şekilde yapmayı başardığını söyleyebilmek mümkündür.



Şekil 4.19. Tripan mavisi boyası ile hücre süspansiyonundan MCF-7 meme kanseri hücresinin sayımı.



Şekil 4.20. Tripan mavisi boyası ile hücre süspansiyonundan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin sayımı.

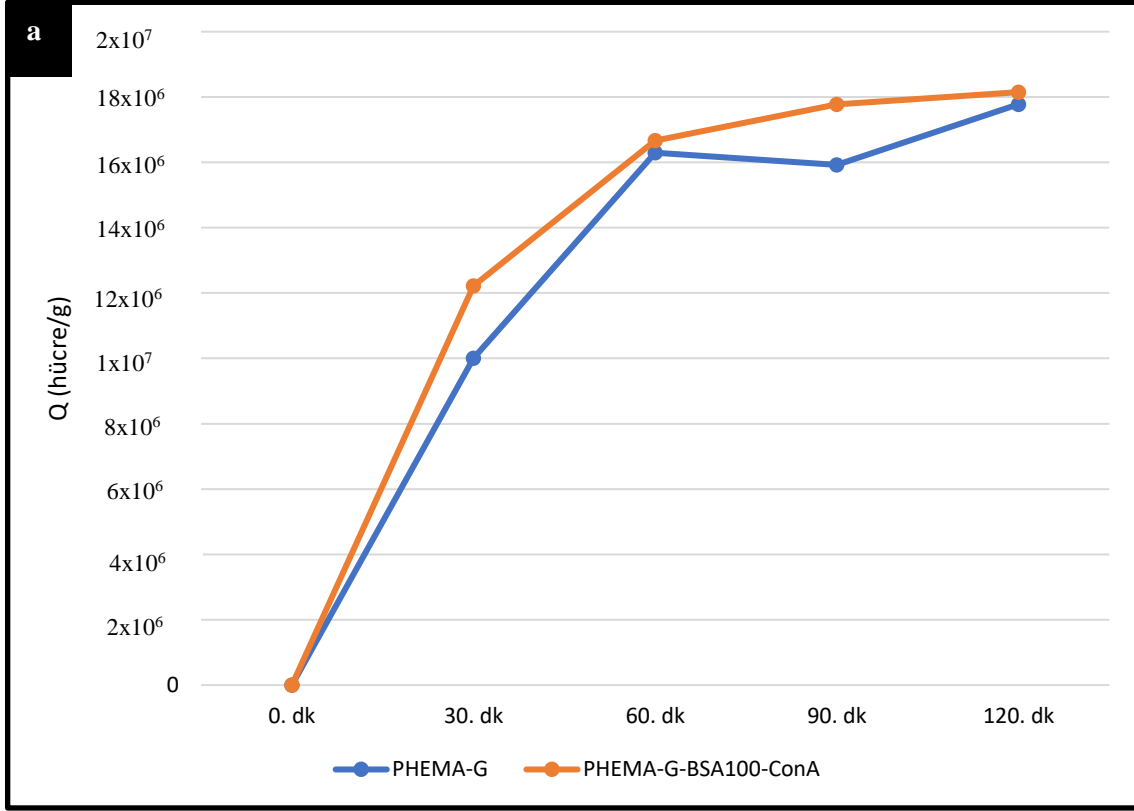
4.3.1.2. PHEMA-BSA kriyojellerin hücreleri bağlayabilme başarılarının değerlendirilmesi

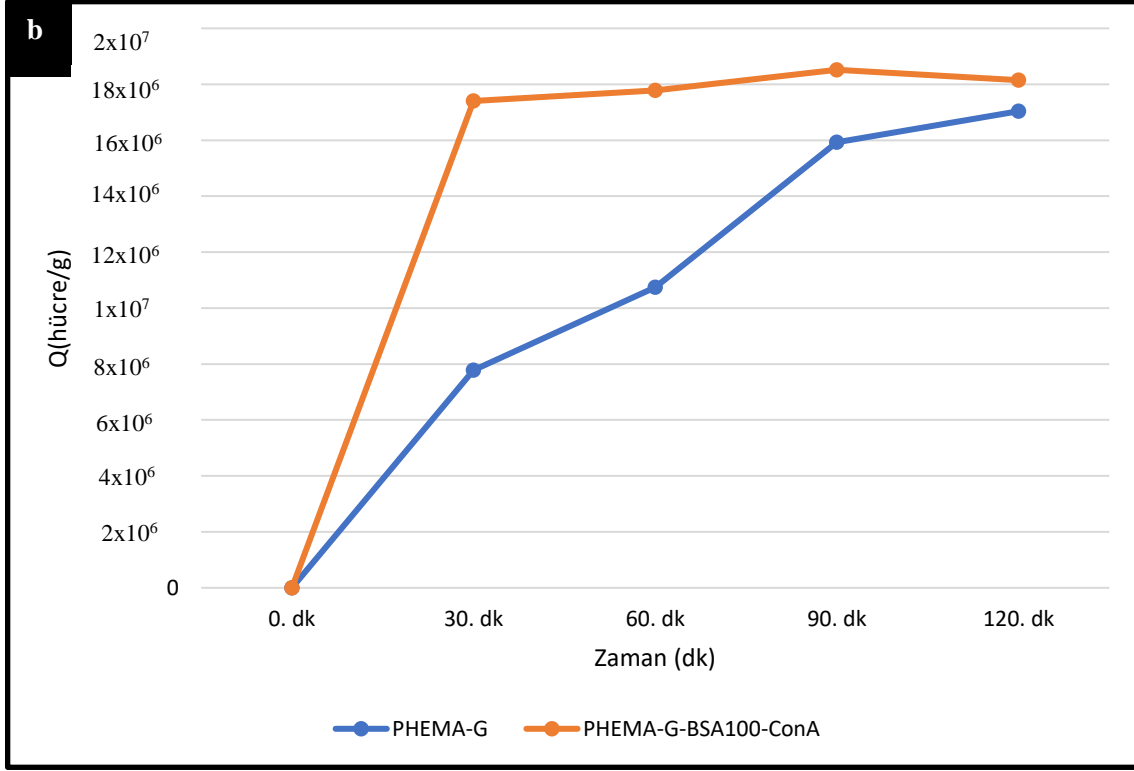
Yapılan hücre sayımının ışığında, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin, PHEMA-BSA kriyojel ve kontrol amaçlı kullanılan PHEMA kriyojel tarafından bağlayabilme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, 1 g polimer başına kaç mg hücre bağlandığı Şekil 4.21.'deki grafik üzerinden gösterilmiştir. Bu sayede, tez çalışması kapsamında hedeflenen PHEMA-BSA kriyojel affinite sistemi düzeneğinin başarısının değerlendirilmesi mümkün olmuştur.

Şekil 4.21.'de verilen grafiklerde görüldüğü üzere, henüz ilk inkübasyon süresi olan 30. dakikada dahi PHEMA-BSA kriyojel başarılı bir şekilde hücre bağlamayı başarmış ve ilerleyen inkübasyon sürelerinde bağlanan hücrelerde salıma rastlanmamakla birlikte, sistem MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerini bağlamaya devam etmiştir.

Daha sağlıklı bir kıyaslama yapabilmek adına, kontrol grubu olarak PHEMA-G kriyojel kullanılmıştır. PHEMA-G: İçeriğinde BSA bulunmayan ve Con A bağlanması gerçekleştirilmeyen bir grup olmasına rağmen, sahip olduğu geniş gözenekler sayesinde belli ölçüde hücre yakalamayı başarabilse de, MCF-7 hücrelerine karşı sergilediği başarıyı, MDA-MB-231 hücrelerine karşı sergilemeyi başaramamıştır. Bu, affinite temelli sistemimizde ligand içermeyen materyal için görmek istediğimiz sonuçlardır. Ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinin, kriyojeller tarafından bağlanması, tez kapsamımızda belirttiğimiz DTH yakalama hedefimizin gerçekleştirilmesi adına daha büyük önem taşıdığını da belirtmemiz gerekir. Bunun nedeni, genel bilgiler başlığı altında detaylı bir şekilde bahsedildiği gibi, MDA-MB-231, üçlü-negatif karakterde, tedavilere zor cevap veren, uzak organ metastazına eğilimli bir meme kanseri tipiyken; MCF-7, hormon bağımlı karakterde, tedavilere daha iyi cevap veren, daha ılımlı seyreden ve uzak organ metastazına eğilimi görece daha düşük bir meme kanseri tipi olmasıdır.

Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi, PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel grubu, hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerini bağlamada başarılı olmakla birlikte, MDA-MB-231 hücrelerini bağlamada henüz 30. dakikada dahi bağlamada oldukça başarılı olmuştur.





Şekil 4.21. a) MCF-7, b) MDA-MB-231 hücrelerinin kriyojel grupları tarafından bağlanma başarıları.

4.3.2. MTT ile canlılık analizi sonuçları

İki farklı amaca yönelik, iki MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan ilk MTT analizi ve diğer analiz deneylerinin ışığında diğer MTT analizi gerçekleştirilerek yapılan yorumlar doğrulanmıştır.

4.3.2.1. Con A'nın kanser hücresi yakalama başarısının MTT analizi ile değerlendirilmesi

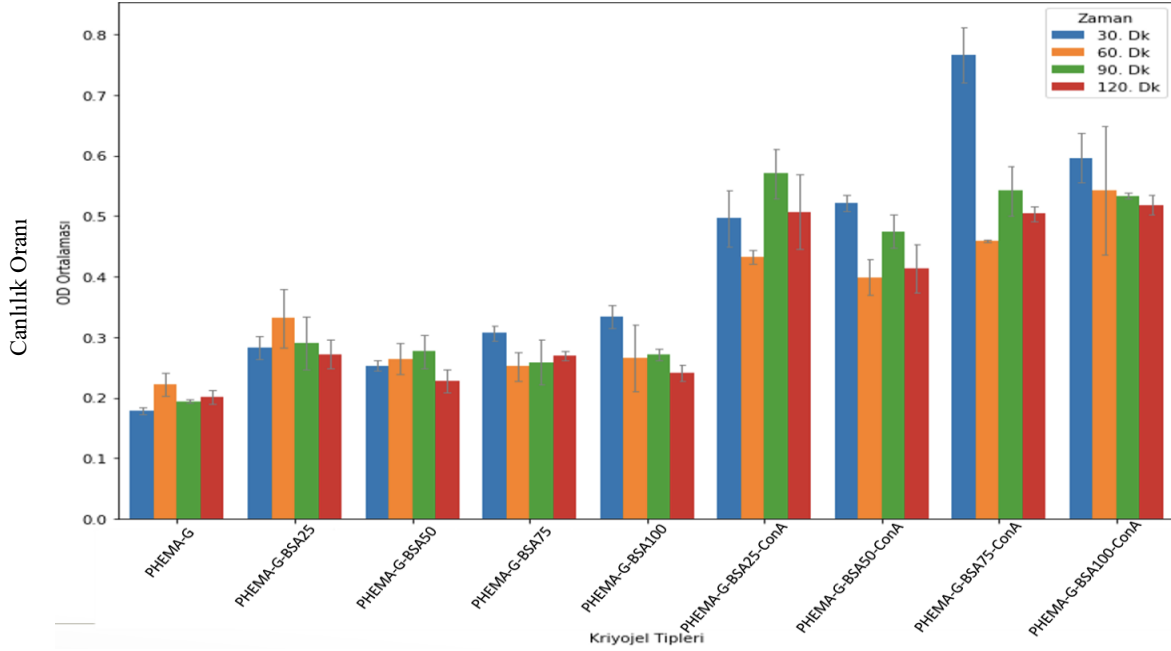
İlk aşamada yapılan MTT analizinin amacı: Tez kapsamında geliştirilmesi hedeflenen kriyojel temelli affinite sisteminde seçilen ligand olan Con A lektininin hücreleri yakalama başarısını test etmektir. Bu doğrultuda, MCF-7 ile hazırlanan hücre süspansiyonu, Çizelge 4.2.'de verilen, farklı özelliklere sahip 9 kriyojel grubundan, devamlı sistemde geçirilmiş ve 30, 60, 90, 120 dakika şeklinde seçilen dört inkübasyon süresinin, her birinin sonunda MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.2. Kriyojel grupları

KRIYOJEL GRUPLARI
PHEMA
PHEMA-G-BSA25
PHEMA-G-BSA50
PHEMA-G-BSA75
PHEMA-G-BSA100
PHEMA-G-BSA25-CONA
PHEMA-G-BSA50-CONA
PHEMA-G-BSA75-CONA
PHEMA-G-BSA100-CONA

Şekil 4.22.'de 9 farklı kriyojel grubunun MTT analizi sonucunda, kriyojel tarafından tutuklanan MCF-7 hücrelerinin % canlılıkları verilmiştir. Grafikte görüldüğü gibi, Con A lektini bağlanan gruplar, kanser hücrelerine affinite göstermiş ve belirgin bir yakalama başarısı sergilemiştir. Canlı hücre tutulması yüzdeleri karşılaştırıldığında, 30. dakikada tüm kriyojel gruplarının PHEMA-G kriyojele kıyasla, canlı hücre bağlanması yüzdelerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). 60. dakikada PHEMA-G-BSA50/75/100 kriyojel grupları, PHEMA-G-BSA kriyojele göre canlı hücre bağlanması açısından anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0.05$). Diğer tüm kriyojel grupları ise 60. dakikada anlamlı olarak daha yüksek canlı hücre bağlanması sergilemiştir ($p<0.05$). 90. dakikada PHEMA-G-BSA75 ile 120. dakikada PHEMA-G-BSA50 kriyojel grupları canlı hücre bağlanması açısından PHEMA-G kriyojele kıyasla anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0.05$). Buna karşılık, diğer tüm gruplar ile anlamlı olarak daha yüksek canlı hücre bağlanması sağlanmıştır ($p<0.05$). Con A çözeltisi hazırlama basamağında da protokolünden yararlandığımız Yavuz ve arkadaşlarının 2008'te yayınladıkları çalışmada, miyolama hücrelerini ayırtırmada Con A bağlı PHEMA kürecikleri kullanılmış ve bizim de MTT sonuçlarında gözlemlediğimiz gibi, çalışmada da artan Con A

konsantrasyonunun söz konusu kanser hücrelerini yakalamada daha iyi bir başarı elde ettiği bildirilmiştir [255].



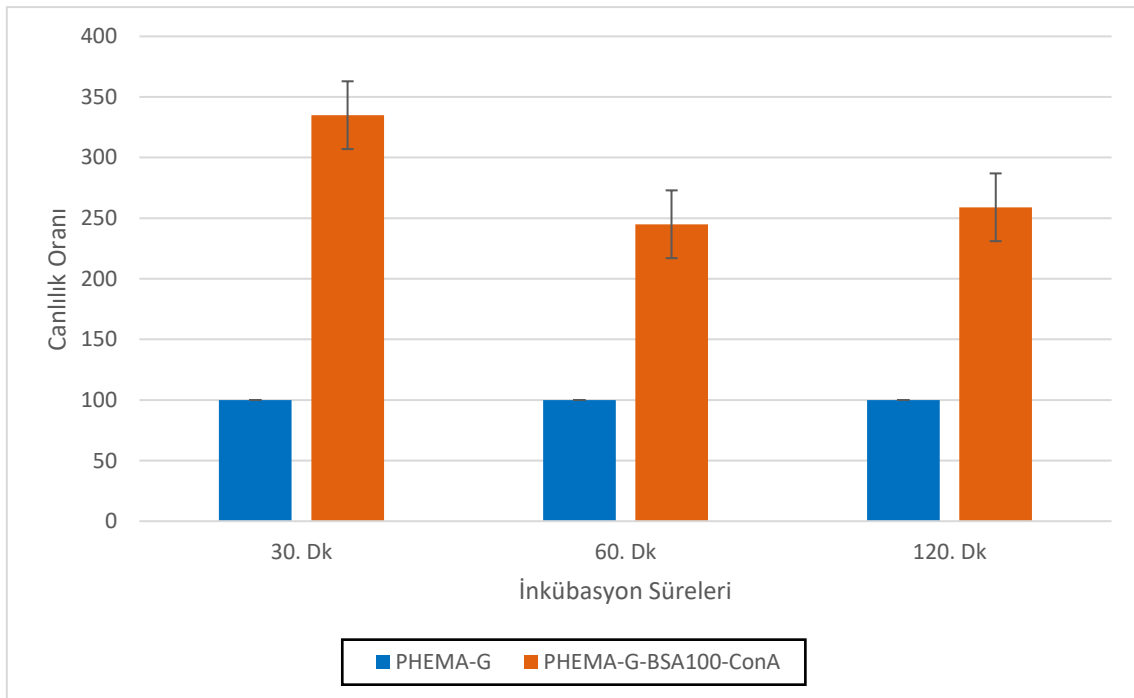
Şekil 4.22. Kriyojel gruplarının değişen inkübasyon süresine bağlı % canlılık analizi sonuçları.

4.3.2.2. PHEMA-BSA kriyojel affinite sisteminde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin bağlanma başarısının değerlendirilmesi için MTT analizi

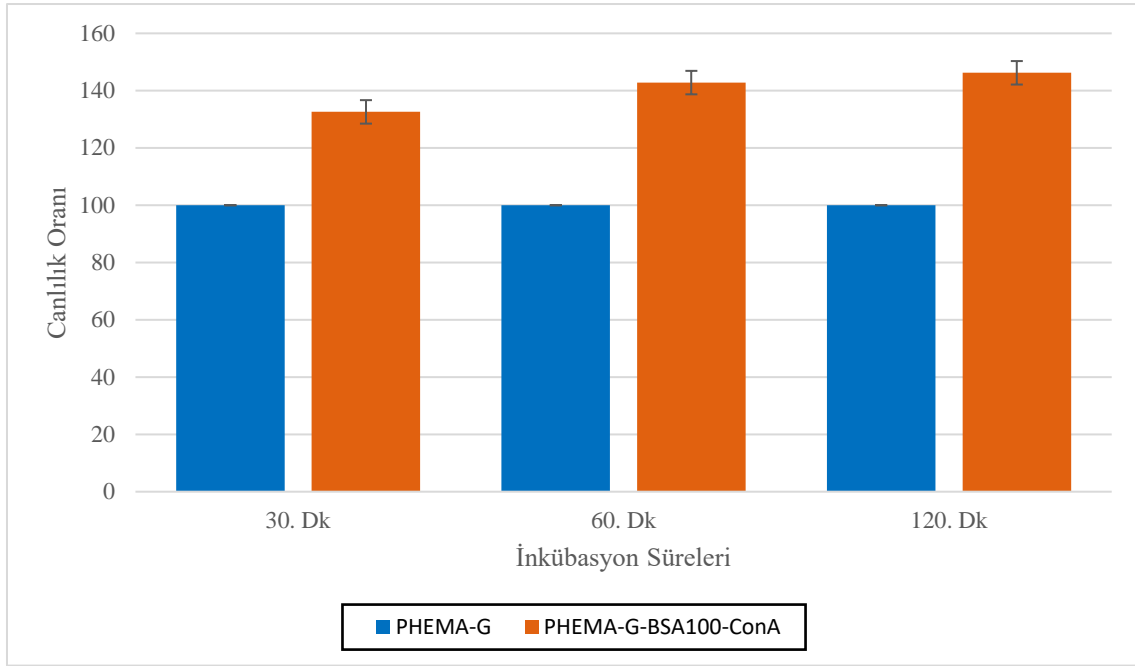
İkinci aşamada yapılan MTT analizinin amacı: Tez kapsamında analiz amaçlı yapılan deneylerde en iyi sonuç verdiği gözlenen, PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel grubunun, ideal affinite materyali olarak seçildiği deneyde, kontrol grubu olarak da PHEMA-G ile çalışılmıştır. Deney kapsamında, ayrı ayrı MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre süspansiyonları, devamlı sistemde, bahsedilen 2 kriyojel grubundan geçirilmiş ve 30, 60, 120 dakika şeklinde seçilen dört inkübasyon süresinin, her birinin sonunda MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Böylece farklı alt gruplara ait ve farklı fenotipik özellikler sergileyen iki farklı meme kanseri hücrelerinin, söz konusu kriyojel grupları tarafından bağlanma başarılarının karşılaştırılmasını mümkün kılmıştır.

Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.'te sırasıyla, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin MTT analizi sonucunda % canlılık grafikleri verilmiştir. MCF-7 meme kanseri hücre grubuyla ilişkili Şekil 4.22.'te verilen grafikte görüleceği gibi PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel

grubunun sergilediği en yüksek canlılık %335 ile 30. dakikada gözlenmiş olup, 60. dakikada % canlılığında düşüş gözlenirse de 120. dakikada tekrar artış söz konusu olmuştur. Bir diğer çalışma grubu olan MDA-MB-231 meme kanseri hücresi ile ilişkili Şekil 4.23.'te verilen grafikte görüleceği gibi, bağlanan hücrelerin canlılıkları, geçen inkübasyon sürelerine doğru orantılı olarak artış göstermiş olup PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel grubunun sergilediği en yüksek canlılık ise %146 ile 120. dakikada gözlenmiştir. Her iki hücre tipi için de geçerli olmak üzere, PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel ile yüzde canlılık oranları, 30, 60 ve 120. dakikalarda, PHEMA-G kriyojela kıyasla anlamlı olarak daha yüksektir ($p<0.05$). Bu veriler, PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel grubunun yalnızca iki farklı kanser hücresini bağlamakla kalmayıp, hem bir kere bağlama gerçekleştirdikten sonra hücreleri tekrar bırakmadığını hem de hücreleri canlı bir şekilde yakalamayı başardığını göstermektedir. Bu durum, bağlanarak ayrıştırılan tümör hücrelerinin incelenbilmesini ve üzerinde çalışma yapılabilmesini mümkün kılabilme konusunda da umut vaad etmektedir.



Şekil 4.23. PHEMA-G ve PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel gruplarında bağlanan MCF-7 hücrelerinin, değişen inkübasyon sürelerine bağlı % canlılık analizi sonuçları (Tüm inkübasyon süreleri için $p<0.05$).



Şekil 4.24. PHEMA-G ve PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel gruplarında bağlanan MDA-MB-231 hücrelerinin, değişen inkübasyon sürelerine bağlı % canlılık analizi sonuçları (Tüm inkübasyon süreleri için $p < 0.05$)

5. YORUM

- Tez çalışması kapsamında; içeriğinde ligand olarak Con A lektininin bulunduğu, PHEMA-BSA kriyojellerin, birincil dokudan ayrılıp dolaşıma karışarak uzak organ metastazına sebep olabilen meme kanseri hücrelerini bağlayarak bulunduğu ortamdan uzaklaştıracağı bir affinite sistemi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla hazırlanan PHEMA-BSA kriyojellerin, kriyojelasyon işlemleri; dondurma (-18°C 'de) - eritme tekniği (oda sıcaklığında) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, seçilen bu sentez tekniği sayesinde birbirleri ile bağlantılı geniş gözeneklere sahip kriyojeller elde edilebilmiştir.
- Hedeflenen affinite sistemi için en ideal kriyojel materyalini tespit edebilmek adına; kriyojellerin sentezlenme tekniği değiştirilmeksizin, yalnızca içeriklerinde bazı değişiklikler yapılarak, farklı özelliklere sahip on dört farklı kriyojel grubu oluşturulmuştur. Bunlar: PHEMA, PHEMA-BSA25, PHEMA-BSA50, PHEMA-BSA75, PHEMA-BSA100, PHEMA-G, PHEMA-G-BSA25, PHEMA-G-BSA50, PHEMA-G-BSA75, PHEMA-G-BSA100, PHEMA-G-BSA25-ConA, PHEMA-G-BSA50-ConA, PHEMA-G-BSA75-ConA, PHEMA-G-BSA100-ConA şeklindedir. Adlandırılmalarını etkileyen söz

konusu değişkenler ise, içeriklerinde; doğal bir polimer olan BSA'nın değişen konsantrasyonlarda bulunması veya bulunmaması, BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan gluteraldehitin bulundurması veya bulundurmaması, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin affinite gösterdiği bir ligand olan Con A lektinini bulundurması veya bulundurmaması durumlarıdır.

- Oluşturulan farklı özelliklerdeki kriyojel gruplarına, çeşitli karakterizasyon analizleri yapılarak kriyojel yapıları incelenmiş ve kriyojel-hücre *in-vitro* deneylerinde kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir. Böylece, başlangıçta bulunan farklı özelliklere sahip on kriyojel grubuna, elde edilen analiz sonuçları doğrultusunda çeşitli elemeler gerçekleştirilerek, geliştirilmesi hedeflenen sistem için en uygun, ideal kriyojel grubunun tespit edilebilmesi mümkün olmuştur.
- Sentezlenen farklı özelliklerdeki PHEMA-BSA kriyojel gruplarının, karakterizasyon analizleri yapılmış ve çıkan sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.
 - FTIR analizinin sonucunda, PHEMA-BSA ve PHEMA-G-BSA kriyojellerin, içeriklerine eklenen BSA'yı yapılarına etkin bir şekilde katabildikleri, BSA'nın karakteristik amid 1 ve 2 bantlarına doğru dalga boylarının kaymasının gözlenmesi sonucunda doğrulanmıştır.
 - Kriyojel gruplarının yıkama sularından, sentezlendikten 1 gece sonra alınan örneklerin spektrofotometrik ölçümleri sonucunda gerçekleştirilen BSA sızıntı sonuçlarında: İçeriğine BSA'nın çapraz bağlayıcısı olan gluteraldehit eklenerek dayanıklılaştırılan PHEMA-G-BSA kriyojel gruplarının, içeriklerinde gluteraldehit bulunmayan PHEMA-BSA gruplarına kıyasla; BSA'yı herhangi bir sızıntı olmaksızın yapılarına dahil etmede daha başarılı oldukları gözlenmiştir.
 - Şişme deneylerinin sonucunda, PHEMA-BSA kriyojellerin, PHEMA-G-BSA kriyojellere kıyasla, geniş ve birbirleri ile bağlantılı gözenekler oluşturma açısından

görece daha başarısız oldukları ortaya çıkmıştır. Ayrıca, PHEMA-BSA kriyojellerin, PHEMA-G-BSA kriyojellere kıyasla, daha dayanıksız ve buna bağlı olarak da jel bütünlüğünü korumada görece daha başarısız oldukları da gözlenmiştir.

- SEM ile görüntüleme analizinde, kriyojel gruplarının gözenek durumları ve yüzey özellikleri incelenmiş, şişme deneylerinde elde edilen sonuçları doğrular nitelikte sonuçlara rastlanmıştır: PHEMA-G-BSA kriyojellerin, artan BSA konsantrasyonu ile birlikte, birbirleri ile bağlantılı geniş gözenekler oluşturma başarılarının da arttığı gözlenmiştir. Buna karşılık PHEMA-BSA kriyojellerde düzensiz gözenek yapısı gözlenmiştir.
- Mikro-CT analizinde, şişme deneylerinde ve SEM görüntülemesinde en iyi gözenek özellikleri sergileyen PHEMA-G-BSA100 kriyojel grubunun ve kriyojel-hücre *in-vitro* deneylerinde kontrol grubu olmasına karar verilen PHEMA-G kriyojel grubunun gözenek boyutları ve dağılımları incelenmiş, böylece BSA varlığının kriyojellerin gözenekleri üzerindeki etkisi değerlendirilmek istenmiştir. Analiz sonucunda, PHEMA-G-BSA100 kriyojelinin gözenekliliğinin %84.8, gözenek boyutunun ise 15-145 µm arasında olduğu; PHEMA-G kriyojelinin gözenekliliğinin %79.7, gözenek boyutunun ise 15-173 µm arasında olduğu tespit edilmiştir. Böylece BSA varlığının kriyojel gözeneklerini olumlu bir şekilde etkilediği anlaşılmıştır. Normal şartlar altında gözeneklerden makrogözenek olarak bahsedebilmek için gözeneklerinin 10 µm'den geniş olması gerekmektedir. PHEMA gözenek genişliği ve gözeneklerinin arasındaki bağlantılarının zenginliği ile bilinen ve literatürde bu özellikleri sayesinde pek çok çalışmada yer alan bir materyal olmasına rağmen, PHEMA-BSA gözenek genişliği ile onu geçmeyi başararak oldukça tatmin edici bir başarı sergilemiştir. Ayrıca çalışma kapsamında akış çalışıldığı için bu geniş gözenekler negatif basınç probleminin de önüne geçmesi ile oldukça önem taşımaktadır.
- Con A'nın ligand olarak kriyojellere bağlanmasının değerlendirilmesinin sonucunda, PHEMA-G-BSA kriyojellerin, PHEMA-BSA kriyojellere kıyasla, çok daha etkin bir şekilde Con A'yı bağlayabildikleri gözlenmiştir. Bunun sebeplerinden biri de BSA'nın Con A lektininin bağlanması için ortamı daha kararlı hale getirerek bağlanmayı desteklemesi ve BSA'nın çapraz bağlayıcı olan glutraldehitin varlığının kriyojel yapısına BSA'nın daha

etkin bağlanmasını sağlayarak bu durumu desteklemesidir. Bu doğrultuda, karakterizasyon analizlerinde de göre başarısız olan PHEMA-BSA kriyojel grupları (PHEMA, PHEMA-BSA25, PHEMA-BSA50, PHEMA-BSA75, PHEMA-BSA100) ile deneyin ilerleyen kısımlarında hücre- kriyojel *in-vitro* deneylerinde çalışılmamaya karar verilmiştir.

- Karakterizasyon analizleri tamamlanan kriyojel gruplarından, başarılı olduğuna karar verilen, PHEMA-G-BSA kriyojel gruplarının (PHEMA-G, PHEMA-G-BSA25, PHEMA-G-BSA50, PHEMA-G-BSA75, PHEMA-G-BSA100), öncelikle yüzeyleri gluteraldehit ile aktive edilmiş, ardından ligand olan Con A lektini bağlanarak geliştirilen kriyojel temelli affinite sistemi, kriyojel-hücre *in-vitro* deneyleri için kullanılabilir hale getirilmiştir.
- PHEMA kriyojellerle yapılan *in-vitro* deneylerde, meme kanseri olarak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır. Her bir kriyojel grubunun tek bir diski başına, 5×10^5 MCF-7 veya MDA-MB-231 meme kanseri hücresi gelecek şekilde, 5 mL'lik hücre süspansiyonları hazırlanarak deneyin ön hazırlıkları tamamlanmıştır. Deney kapsamında, meme kanseri hücreleri, kriyojellerden, devamlı sistemde, 0.5 mL/dk akış hızında geçirilmiş ve değişen inkübasyon sürelerinde (30, 60, 90, 120 dakika), hücre süspansiyonu örnekleri alınarak analizler gerçekleştirilmiştir.
 - İnkübasyon sürelerinin sonlarında hücre süspansiyonundan alınana örnekler, tripan mavisi boyası ile boyanarak burker lamında, ışık mikroskobu altında sayımları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında PHEMA-G-BSA100 kriyojel grubunun, kontrol grubu olan PHEMA-G'ye kıyasla, hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerini bağlamadaki başarısının belirgin bir ölçüde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum Con A lektini kullanılarak kurulan affinite sisteminin hücre bağlamadaki başarısını kanıtlar niteliktedir.
 - Ayrıca tripan mavisi ile hücre sayımı sonuçlarının ışığında 1 g polimer başına kaç mg hücre bağlandığı hesaplanmıştır. Bunun sonucunda: MCF-7 hücre hattı ile yapılan deneyde 60. dakikadaki küçük sapma göz ardı edildiğinde, PHEMA-G-BSA100 kriyojel grubunun, kontrol grubuna kıyasla oldukça küçük bir oranla daha başarılı hücre bağladığı gözlenmiştir.

Çalışmamız kapsamında hedefimiz dolaşan tümör hücrelerinin kandan uzaklaştırılması olduğundan, bizim için metastatik karakterdeki MDA-MB-231 hücrelerinin hücre bağlama başarısı oldukça önemli olup, MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan deneylerde geçen zamana bağlı, PHEMA-G-BSA100 kriyojel grubunun, kontrol grubuna kıyasla belirgin bir hücre bağlama başarısı elde ettiği gözlenmiştir.

- Yapılan iki aşamalı MTT analizleri sonucunda, PHEMA-BSA kriyojellerinin hücrelerin tutunabilmesi adına gerekli biyouyumlu ortamı oluşturabilmesi ve MCF-7, MDA-MB-231 hücrelerinin PHEMA-BSA kriyojellere bağlanma başarıları değerlendirilmiştir.
 - İlk aşamada, içeriğinde ligand olarak Con A lektini bulunan ve bulunmayan kriyojel grupları arasındaki meme kanseri hücresi tutuklama başarısı test edilmiş ve içeriğinde Con A lektini bulunan kriyojel gruplarının, Con A bulundurmayanlara karşı oldukça belirgin bir üstünlük sağladıkları gözlenmiştir. Böylece hedeflenen kriyojel temelli affinite sisteminin, ligand varlığında başarıyla çalıştığı kanıtlanmıştır. Ayrıca bu veriler ışığında, kriyojellerin sahip oldukları geniş gözenek yapıları sayesinde bir diğer ayrıştırma tekniği olan boyut temelli ayrımı da belli bir düzeyde yapabildikleri fakat asıl ayrıştırma başarısını ligand varlığında affinite yolu ile başardıkları yorumunu yapabilmek de mümkündür.
 - İkinci aşamada ise, hedeflenen affinite sistemi için yapılan analizlere en iyi yanıtı veren, PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojel grubunun, değişen inkübasyon sürelerine bağlı MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanserlerini canlı olarak tutuklama başarısı, kontrol grubu olarak seçilen PHEMA-G ile kıyaslanarak değerlendirilmiş ve iki hücre tipi için de sergilediği başarı ile tez kapsamında hedeflenen materyal olduğu doğrulanmıştır.
- Tüm analizlerin sonucunda, içeriğinde en yüksek konsantrasyonda BSA ve onun çapraz bağlayıcısı gluteraldehit bulunan ve ligand olarak Con A lektini bağlanan PHEMA-G-BSA100-ConA kriyojelin metastatik karakterdeki MDA-MB-231 hücrelerini canlı olarak bağlamada henüz 30. Dakikada dahi yüksek başarı sergilediği ve literatürde bu iki meme

kanseri hücre hattını çalışan Demircan ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı çalışmada bu başarının 120. Dakikada sağlandığı göz önünde bulundurulduğunda bu bağlama işlemini kısa bir sürede etkin bir şekilde gerçekleştirmeyi başarmıştır. Ayrıca hücrelerin canlı bir şekilde yakalanmış olması, ilerleyen aşamalarda tümörün profillendirilmesi gibi kanser hücreleri ile çalışmak isteyen araştırmacılar için de potansiyel bir araştırma alanı sağlamaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. Int J Cancer, 2019. **144**(8): p. 1941-1953.
2. Kowalik, A., M. Kowalewska, and S. Gozdz, *Current approaches for avoiding the limitations of circulating tumor cells detection methods-implications for diagnosis and treatment of patients with solid tumors*. Transl Res, 2017. **185**: p. 58-84 e15.
3. Krebs, M.G., et al., *Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes*. Ther Adv Med Oncol, 2010. **2**(6): p. 351-65.
4. Zhang, J., K. Chen, and Z.H. Fan, *Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis*. Adv Clin Chem, 2016. **75**: p. 1-31.
5. Agashe, R. and R. Kurzrock, *Circulating Tumor Cells: From the Laboratory to the Cancer Clinic*. Cancers (Basel), 2020. **12**(9).
6. Sundling KE, Lowe AC. *Circulating Tumor Cells: Overview and Opportunities in Cytology*. Adv Anat Pathol. 2019 Jan;26(1):56-63. doi: 10.1097/PAP.000000000000217. PMID: 30325755.
7. Paterlini-Brechot, P. and N.L. Benali, *Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions*. Cancer Lett, 2007. **253**(2): p. 180-204.
8. Gold, B., et al., *Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology*. J Mol Diagn, 2015. **17**(3): p. 209-24.
9. Razavi, M., Y. Qiao, and A.S. Thakor, *Three-dimensional cryogels for biomedical applications*. J Biomed Mater Res A, 2019. **107**(12): p. 2736-2755.

10. Memic, A., et al., *Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications*. Advanced Therapeutics, 2019. **2**(4).
11. Percin, I., et al., *Macroporous PHEMA-based cryogel discs for bilirubin removal*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2013. **41**(3): p. 172-7.
12. Alkan, H., et al., *Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel*. Biochemical Engineering Journal, 2009. **45**(3): p. 201-208.
13. Boyd, W.C. and Shapleigh, E. (1954) *Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins)*. Science, 119, 419.
<https://doi.org/10.1126/science.119.3091.419>.
14. Ferriz-Martinez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., Blanco-Labra, A., & Garcia-Gasca, T. (2010). *The role of plant lectins in cancer treatment*. Nova Sci, 71-90.
15. De Mejia, E.G. and V.I. Prisecaru, *Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2005. **45**(6): p. 425-45.
16. Ahmed, E.M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*. J Adv Res, 2015. **6**(2): p. 105-21.
17. Nguyen, Q.V., et al., *Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review*. European Polymer Journal, 2015. **72**: p. 602-619.
18. ZOHOURIAN, M. M., & Kabiri, K. (2008). *Superabsorbent polymer materials: a review*.
19. Karacan, P. and O. Okay, *Ethidium bromide binding to DNA cryogels*. Reactive and Functional Polymers, 2013. **73**(3): p. 442-450.
20. Zhang, X.Z. and C.C. Chu, *Preparation of thermosensitive PNIPAAm hydrogels with superfast response*. Chem Commun (Camb), 2004(3): p. 350-1.
21. Wang, N., et al., *Synthesis of Phosphated K-Carrageenan and Its Application for Flame-Retardant Waterborne Epoxy*. Polymers (Basel), 2018. **10**(11).
22. Savina, I.N., M. Zoughaib, and A.A. Yergeshov, *Design and Assessment of Biodegradable Macroporous Cryogels as Advanced Tissue Engineering and Drug Carrying Materials*. Gels, 2021. **7**(3).
23. Hwang, Y., C. Zhang, and S. Varghese, *Poly(ethylene glycol) cryogels as potential cell scaffolds: effect of polymerization conditions on cryogel microstructure and properties*. J. Mater. Chem., 2010. **20**(2): p. 345-351.

24. Kanno, T. and H. Uyama, *Unique Ivy-Like Morphology Composed of Poly(lactic acid) and Bacterial Cellulose Cryogel*. ACS Omega, 2018. **3**(1): p. 631-635.
25. Swieszkowski, W., et al., *An elastic material for cartilage replacement in an arthritic shoulder joint*. Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1534-41.
26. Silva, S.S., J.F. Mano, and R.L. Reis, *Potential applications of natural origin polymer-based systems in soft tissue regeneration*. Critical Reviews in Biotechnology, 2010. **30**(3): p. 200-221.
27. Ulery, B.D., L.S. Nair, and C.T. Laurencin, *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*. J Polym Sci B Polym Phys, 2011. **49**(12): p. 832-864.
28. Akbarzadeh, R. and A.M. Yousefi, *Effects of processing parameters in thermally induced phase separation technique on porous architecture of scaffolds for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2014. **102**(6): p. 1304-15.
29. Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M., & Gough, J. E. (2003). *Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications*. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, 28(3), 165-172.
30. Sedlačik, T., et al., *Chondrogenic potential of macroporous biodegradable cryogels based on synthetic poly(α -amino acids)*. Soft Matter, 2018. **14**(2): p. 228-238.
31. Saylan and Denizli, *Supermacroporous Composite Cryogels in Biomedical Applications*. Gels, 2019. **5**(2).
32. Golunova, A., et al., *Toward structured macroporous hydrogel composites: electron beam-initiated polymerization of layered cryogels*. Biomacromolecules, 2015. **16**(4): p. 1146-56.
33. Rodrigues, S.C., et al., *Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications*. J Biomed Mater Res A, 2013. **101**(4): p. 1080-94.
34. Kamoun, E.A., E.S. Kenawy, and X. Chen, *A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings*. J Adv Res, 2017. **8**(3): p. 217-233.
35. He, Y., et al., *An Overview on Collagen and Gelatin-Based Cryogels: Fabrication, Classification, Properties and Biomedical Applications*. Polymers (Basel), 2021. **13**(14).

36. ODABAŞ, S., İlyas, İ. N. C. İ., & PİŞKİN, E. (2012). *Gelatin/oxide-dextran cryogels: In-vitro biocompatibility evaluations. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 40(4), 409-417.
37. Mahmoudian-Sani, M.R., et al., *The effect of mesenchymal stem cells combined with platelet-rich plasma on skin wound healing. J Cosmet Dermatol*, 2018. **17**(5): p. 650-659.
38. Ak, F., et al., *Macroporous silk fibroin cryogels. Biomacromolecules*, 2013. **14**(3): p. 719-27.
39. Andac, M., et al., *Molecularly imprinted composite cryogel for albumin depletion from human serum. J Mol Recognit*, 2012. **25**(11): p. 555-63.
40. Sun, S., et al., *Preparation of agarose/chitosan composite supermacroporous monolithic cryogels for affinity purification of glycoproteins. J Sep Sci*, 2012. **35**(7): p. 893-900.
41. Evtuyugin, V.G., et al., *Sorption of microorganisms by wide-porous agarose cryogels containing grafted aliphatic chains of different length. Microbiology*, 2009. **78**(5): p. 603-608.
42. Sharma, A., et al., *Three-dimensional supermacroporous carrageenan-gelatin cryogel matrix for tissue engineering applications. Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 478279.
43. Karimi, Z., et al., *Evaluation of the proliferation and viability rates of nucleus pulposus cells of human intervertebral disk in fabricated chitosan-gelatin scaffolds by freeze drying and freeze gelation methods. Adv Biomed Res*, 2015. **4**: p. 251.
44. Hixon, K.R., T. Lu, and S.A. Sell, *A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. Acta Biomaterialia*, 2017. **62**: p. 29-41.
45. Kangkamano, T., et al., *Chitosan cryogel with embedded gold nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes modified electrode for highly sensitive flow based non-enzymatic glucose sensor. Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017. **246**: p. 854-863.
46. Demirci, S., et al., *Chondroitin Sulfate-Based Cryogels for Biomedical Applications. Gels*, 2021. **7**(3).
47. Reichelt, S., et al., *Biocompatible polysaccharide-based cryogels. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014. **35**: p. 164-70.
48. Son, K.H. and J.W. Lee, *Synthesis and Characterization of Poly(Ethylene Glycol) Based Thermo-Responsive Hydrogels for Cell Sheet Engineering. Materials (Basel)*, 2016. **9**(10).

49. Tekin, K., et al., *Preparation and characterization of composite cryogels containing imidazole group and use in heavy metal removal*. *Reactive and Functional Polymers*, 2011. **71**(10): p. 985-993.
50. Hacker, M.C. and A.G. Mikos, *Synthetic Polymers*, in *Principles of Regenerative Medicine*. 2011. p. 587-622.
51. Iizawa, T., et al., *Synthesis of porous poly(N-isopropylacrylamide) gel beads by sedimentation polymerization and their morphology*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007. **104**(2): p. 842-850.
52. Yang, L., Chu, J. S., & Fix, J. A. (2002). *Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation*. *International journal of pharmaceutics*, 235(1-2), 1-15.
53. parhi, R., *Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review*. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2017. **7**(4): p. 515-530.
54. Henderson, T.M.A., et al., *Cryogels for biomedical applications*. *J Mater Chem B*, 2013. **1**(21): p. 2682-2695.
55. Akhtar, M.F., M. Hanif, and N.M. Ranjha, *Methods of synthesis of hydrogels ... A review*. *Saudi Pharm J*, 2016. **24**(5): p. 554-559.
56. Ozmen, M.M., et al., *A rapid and facile preparation of novel macroporous silicone-based cryogels via photo-induced thiol–ene click chemistry*. *Chemical Communications*, 2015. **51**(98): p. 17479-17482.
57. Dispinar, T., et al., *Redox-responsive degradable PEG cryogels as potential cell scaffolds in tissue engineering*. *Macromol Biosci*, 2012. **12**(3): p. 383-94.
58. Nair, D.P., et al., *The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry*. *Chemistry of Materials*, 2013. **26**(1): p. 724-744.
59. Lynn, D. M., & Langer, R. (2000). *Degradable poly (β -amino esters): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA*. *Journal of the American Chemical Society*, 122(44), 10761-10768.
60. Dainiak, M.B., et al., *Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007. **106**: p. 101-27.
61. Eggermont, L.J., et al., *Injectable Cryogels for Biomedical Applications*. *Trends Biotechnol*, 2020. **38**(4): p. 418-431.
62. Kasper, F.K., et al., *Synthesis of poly(propylene fumarate)*. *Nature Protocols*, 2009. **4**(4): p. 518-525.

63. Janik, H. and M. Marzec, *A review: Fabrication of porous polyurethane scaffolds*. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. **48**: p. 586-591.
64. De France, K.J., F. Xu, and T. Hoare, *Structured Macroporous Hydrogels: Progress, Challenges, and Opportunities*. *Adv Healthc Mater*, 2018. **7**(1).
65. Bencherif, S.A., T.M. Braschler, and P. Renaud, *Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry*. *J Periodontal Implant Sci*, 2013. **43**(6): p. 251-61.
66. Yetiskin, B., C. Akinci, and O. Okay, *Cryogelation within cryogels: Silk fibroin scaffolds with single-, double- and triple-network structures*. *Polymer*, 2017. **128**: p. 47-56.
67. Ye, J.L., *The Liquid-Solid Phase Transition Characteristic and Protein Binding Property of Composite Cryogel with Embedded Cellulose Beads*. *Advanced Materials Research*, 2013. **781-784**: p. 783-786.
68. Lozinsky, V.I. and O. Okay, *Basic Principles of Cryotropic Gelation*, in *Polymeric Cryogels*. 2014. p. 49-101.
69. Kirsebom, H., et al., *Modulating the Porosity of Cryogels by Influencing the Nonfrozen Liquid Phase through the Addition of Inert Solutes*. *Langmuir*, 2010. **26**(20): p. 16129-16133.
70. Plieva, F.M., et al., *Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels*. *Soft Matter*, 2005. **1**(4).
71. Ström, A., A. Larsson, and O. Okay, *Preparation and physical properties of hyaluronic acid-based cryogels*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015. **132**(29).
72. Lin, S., et al., *Influence of Physical Properties of Biomaterials on Cellular Behavior*. *Pharmaceutical Research*, 2011. **28**(6): p. 1422-1430.
73. Serex, L., et al., *Pore Size Manipulation in 3D Printed Cryogels Enables Selective Cell Seeding*. *Advanced Materials Technologies*, 2018. **3**(4).
74. Lim, H.L., et al., *Smart hydrogels as functional biomimetic systems*. *Biomater. Sci.*, 2014. **2**(5): p. 603-618.
75. Wang, B., et al., *Injectable nanohydroxyapatite-chitosan-gelatin micro-scaffolds induce regeneration of knee subchondral bone lesions*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 16709.
76. De Giglio, E., et al., *PHEMA-based thin hydrogel films for biomedical applications*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2011. **26**(4): p. 420-434.

77. Sun, Y., et al., *The role of laminins in cartilaginous tissues: from development to regeneration*. European Cells and Materials, 2017. **34**: p. 40-54.
78. Barik, D., K. Kundu, and M. Dash, *Montmorillonite stabilized chitosan-co-mucin hydrogel for tissue engineering applications*. RSC Adv, 2021. **11**(48): p. 30329-30342.
79. Dragusin, D.-M., et al., *Novel gelatin–PHEMA porous scaffolds for tissue engineering applications*. Soft Matter, 2012. **8**(37).
80. Lee, E.S. and Y.S. Youn, *Albumin-based potential drugs: focus on half-life extension and nanoparticle preparation*. Journal of Pharmaceutical Investigation, 2016. **46**(4): p. 305-315.
81. Ong, J., et al., *Albumin-based hydrogels for regenerative engineering and cell transplantation*. Biotechnology and Bioengineering, 2019. **116**(12): p. 3457-3468.
82. Zhang, R.X., et al., *Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks*. Nanoscale, 2017. **9**(4): p. 1334-1355.
83. Akdogan, Y., M.J. Junk, and D. Hinderberger, *Effect of ionic liquids on the solution structure of human serum albumin*. Biomacromolecules, 2011. **12**(4): p. 1072-9.
84. Akdogan, Y., et al., *EPR studies of intermolecular interactions and competitive binding of drugs in a drug-BSA binding model*. Phys Chem Chem Phys, 2016. **18**(32): p. 22531-9.
85. Rahimizadeh, P., S. Yang, and S.I. Lim, *Albumin: An Emerging Opportunity in Drug Delivery*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2020. **25**(6): p. 985-995.
86. Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., & Mattiasson, B. (2001). *The potential of polymeric cryogels in bioseparation*. *Bioseparation*, 10(4), 163-188.
87. Hage, D.S., *Chromatography*, in *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*. 2018. p. 1-32.
88. Coskun, O., *Separation techniques: Chromatography*. North Clin Istanbul, 2016. **3**(2): p. 156-160.
89. Vlach, E.G. and T.B. Tennikova, *Preparation of methacrylate monoliths*. J Sep Sci, 2007. **30**(17): p. 2801-13.
90. Peters, F.T., et al., *Method Development in Forensic Toxicology*. Current Pharmaceutical Design, 2018. **23**(36).

91. Luxminarayan, L., Sharma, N., Viswas, A., & Khinchi, M. P. (2017). A review on chromatography techniques. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 1-08.
92. Mallik, R. and D.S. Hage, *Affinity monolith chromatography*. *J Sep Sci*, 2006. **29**(12): p. 1686-704.
93. Erturk, G. and B. Mattiasson, *Cryogels-versatile tools in bioseparation*. *J Chromatogr A*, 2014. **1357**: p. 24-35.
94. Lozinsky, V.I., et al., *Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest*. *Trends in Biotechnology*, 2003. **21**(10): p. 445-451.
95. Le Noir, M., et al., *Macroporous molecularly imprinted polymer/cryogel composite systems for the removal of endocrine disrupting trace contaminants*. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1154**(1-2): p. 158-164.
96. Svec, F., *Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(6): p. 902-924.
97. Arvidsson, P., et al., *Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **986**(2): p. 275-290.
98. Erzenin, M., N. Unlu, and M. Odabasi, *A novel adsorbent for protein chromatography: supermacroporous monolithic cryogel embedded with Cu²⁺-attached sporopollenin particles*. *J Chromatogr A*, 2011. **1218**(3): p. 484-90.
99. Uygun, M., et al., *A new metal-chelated cryogel for reversible immobilization of urease*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013. **170**(8): p. 1815-26.
100. Tao, S.P., J. Zheng, and Y. Sun, *Grafting zwitterionic polymer onto cryogel surface enhances protein retention in steric exclusion chromatography on cryogel monolith*. *J Chromatogr A*, 2015. **1389**: p. 104-11.
101. Dogan, A., et al., *Evaluation of human interferon adsorption performance of Cibacron Blue F3GA attached cryogels and interferon purification by using FPLC system*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012. **893-894**: p. 69-76.
102. Rodriguez, E.L., et al., *Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years*. *Journal of Chromatography B*, 2020. **1157**.

103. Hage, D.S., et al., *Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments*. J Pharm Biomed Anal, 2012. **69**: p. 93-105.
104. Hage, D. S. (1999). *Affinity chromatography: a review of clinical applications*. *Clinical chemistry*, 45(5), 593-615.
105. Cuatrecasas, P., & Anfinsen, C. B. (1971). [31] *Affinity chromatography*. *Methods in enzymology*, 22, 345-378.
106. Noppe, W., et al., *Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds*. *Journal of Biotechnology*, 2007. **131**(3): p. 293-299.
107. Muronetz, V.I. and T. Korpela, *Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography*. *Journal of Chromatography B*, 2003. **790**(1-2): p. 53-66.
108. Shizuru, J.A., R.S. Negrin, and I.L. Weissman, *Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Clinical and Preclinical Regeneration of the Hematolymphoid System*. *Annual Review of Medicine*, 2005. **56**(1): p. 509-538.
109. Kodituwakku, A. P., Jessup, C., Zola, H., & Roberton, D. M. (2003). *Isolation of antigen-specific B cells*. *Immunology and cell biology*, 81(3), 163-170.
110. Gross, H. J., Verwer, B., Houck, D., Hoffman, R. A., & Recktenwald, D. (1995). *Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10⁻⁷*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(2), 537-541.
111. Oshiba, A., Renz, H., Yata, J. I., & Gelfand, E. W. (1994). *Isolation and characterization of human antigen-specific B lymphocytes*. *Clinical immunology and immunopathology*, 72(3), 342-349.
112. Tomlinson, M.J., et al., *Cell separation: Terminology and practical considerations*. *Journal of Tissue Engineering*, 2012. **4**.
113. Geifman-Holtzman, O., et al., *The clinical utility of fetal cell sorting to determine prenatally fetal E/e or e/e Rh genotype from peripheral maternal blood*. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. **183**(2): p. 462-8.
114. De Wynter, E. A., Coutinho, L. H., Pei, X., Marsh, J. C. W., Hows, J., Luft, T., & Testa, N. G. (1995). *Comparison of purity and enrichment of CD34⁺ cells from bone*

- marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem cells*, 13(5), 524-532.
115. Beaujean, F. (1997). Methods of CD34+ cell separation: comparative analysis. *Transfusion Science*, 18(2), 251-261.
 116. Racila, E., Euhus, D., Weiss, A. J., Rao, C., McConnell, J., Terstappen, L. W., & Uhr, J. W. (1998). Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4589-4594.
 117. Peters, C. and C.G. Steward, *Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines*. Bone Marrow Transplantation, 2003. 31(4): p. 229-239.
 118. Slatter, M.A., et al., *Outcome of boost haemopoietic stem cell transplant for decreased donor chimerism or graft dysfunction in primary immunodeficiency*. Bone Marrow Transplantation, 2005. 35(7): p. 683-689.
 119. Collins, D. P., Luebering, B. J., & Shaut, D. M. (1998). T-lymphocyte functionality assessed by analysis of cytokine receptor expression, intracellular cytokine expression, and femtomolar detection of cytokine secretion by quantitative flow cytometry. *Cytometry*, 33(2), 249-255.
 120. Payne, M. J., Campbell, S., Patchett, R. A., & Kroll, R. G. (1992). The use of immobilized lectins in the separation of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria* and *Salmonella* spp. from pure cultures and foods. *Journal of applied bacteriology*, 73(1), 41-52.
 121. Pretlow, T. G., & Pretlow, T. P. (1991). Sedimentation for the separation of cells. *Methods*, 2(3), 183-191.
 122. Pertoft, H. (2000). Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 44(1-2), 1-30.
 123. Boyum, A. (1977). Separation of lymphocytes, lymphocyte subgroups and monocytes: a review. *Lymphology*, 10(2), 71-76.
 124. Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry*, 48(10), 1819-1827.
 125. Givan, A. L. (2011). *Flow cytometry: an introduction*. *Flow cytometry protocols*, 1-29.

126. Šafařík, I., & Šafaříková, M. (1999). Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2), 33-53.
127. Delves, P. J., & Roitt, I. M. (2000). The immune system. *New England journal of medicine*, 343(1), 37-49.
128. Kumar, A. and A. Srivastava, *Cell separation using cryogel-based affinity chromatography*. *Nature Protocols*, 2010. 5(11): p. 1737-1747.
129. Hertz, C. M., Graves, D. J., Lauffenburger, D. A., & Serota, F. T. (1985). Use of cell affinity chromatography for separation of lymphocyte subpopulations. *Biotechnology and bioengineering*, 27(5), 603-612.
130. Afeyan, N. B., Gordon, N. F., Mazsaroff, I., Varady, L., Fulton, S. P., Yang, Y. B., & Regnier, F. E. (1990). Flow-through particles for the high-performance liquid chromatographic separation of biomolecules: perfusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 519(1), 1-29.
131. Wigzell, H., & Andersson, B. (1969). Cell separation on antigen-coated columns: elimination of high rate antibody-forming cells and immunological memory cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 129(1), 23-36.
132. Truffa-Bachi, P., & Wofsy, L. (1970). Specific separation of cells on affinity columns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(3), 685-692.
133. Kumar, A., et al., *Affinity binding of cells to cryogel adsorbents with immobilized specific ligands: effect of ligand coupling and matrix architecture*. *Journal of Molecular Recognition*, 2005. 18(1): p. 84-93.
134. Saleemuddin, M., & Husain, Q. (1991). Concanavalin A: a useful ligand for glycoenzyme immobilization—a review. *Enzyme and microbial technology*, 13(4), 290-295.
135. Sharon, N. (2007). Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2753-2764.
136. Ambrosi, M., N.R. Cameron, and B.G. Davis, *Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode*. *Org Biomol Chem*, 2005. 3(9): p. 1593-608.
137. O'Connor, B.F., D. Monaghan, and J. Cawley, *Lectin Affinity Chromatography (LAC)*. *Methods Mol Biol*, 2017. 1485: p. 411-420.

138. Qiu, R., & Regnier, F. E. (2005). *Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics*. *Analytical chemistry*, 77(9), 2802-2809.
139. Yang, Z. and W.S. Hancock, *Monitoring glycosylation pattern changes of glycoproteins using multi-lectin affinity chromatography*. *J Chromatogr A*, 2005. **1070**(1-2): p. 57-64.
140. Abhinav, K.V. and M. Vijayan, *Structural diversity and ligand specificity of lectins. The Bangalore effort*. *Pure and Applied Chemistry*, 2014. **86**(9): p. 1335-1355.
141. Surolia, A., Bishayee, S., Ahmad, A., Balasubramanian, K. A., Thambi-Dorai, D., Podder, S. K., & Bachhawat, B. K. (1975). *Studies on the interaction of concanavalin A with glycoproteins*. In *Concanavalin A (pp. 95-115)*. Springer, Boston, MA.
142. Suvarna, G., & Sharma, B. B. (2018). *Concanavalin-A potential glycoprotein*. *J Proteins Proteom*, 9(2), 77-90.
143. Li, L., et al., *Lectin-aided separation of circulating tumor cells and assay of their response to an anticancer drug in an integrated microfluidic device*. *Electrophoresis*, 2010. **31**(18): p. 3159-3166.
144. Brooks, S.A., *Strategies for analysis of the glycosylation of proteins: current status and future perspectives*. *Mol Biotechnol*, 2009. **43**(1): p. 76-88.
145. Wu, A.M., et al., *Lectins as tools in glycoconjugate research*. *Glycoconj J*, 2009. **26**(8): p. 899-913.
146. Shen, C.-H., *Quantification and Analysis of Proteins*, in *Diagnostic Molecular Biology*. 2019. p. 187-214.
147. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011. **61**(2): p. 69-90.
148. Langer, A., *A systematic review of PET and PET/CT in oncology: A way to personalize cancer treatment in a cost-effective manner?* *BMC Health Services Research*, 2010. **10**(1).
149. Hassanpour, S.H. and M. Dehghani, *Review of cancer from perspective of molecular*. *Journal of Cancer Research and Practice*, 2017. **4**(4): p. 127-129.
150. Jackson, A. L., & Loeb, L. A. (2001). *The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1-2), 7-21.

151. Loeb, K. R., & Loeb, L. A. (2000). *Significance of multiple mutations in cancer. Carcinogenesis, 21(3), 379-385.*
152. van Zijl, F., G. Krupitza, and W. Mikulits, *Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. Mutat Res, 2011. 728(1-2): p. 23-34.*
153. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. Cell, 2011. 147(2): p. 275-92.*
154. Méhes, G., et al., *Circulating Breast Cancer Cells Are Frequently Apoptotic. The American Journal of Pathology, 2001. 159(1): p. 17-20.*
155. Rossi, E., et al., *M30 Neoepitope Expression in Epithelial Cancer: Quantification of Apoptosis in Circulating Tumor Cells by CellSearch Analysis. Clinical Cancer Research, 2010. 16(21): p. 5233-5243.*
156. Weiss, L., & Ward, P. M. (1983). *Cell detachment and metastasis. Cancer and Metastasis Reviews, 2(2), 111-127.*
157. Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., Shete, S., Naftalis, E. Z., Huth, J. F., ... & Uhr, J. W. (2004). *Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clinical cancer research, 10(24), 8152-8162.*
158. Loizzi, V., et al., *Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 2017. 18(9).*
159. Bombonati, A. and D.C. Sgroi, *The molecular pathology of breast cancer progression. J Pathol, 2011. 223(2): p. 307-17.*
160. Goff, S.L. and D.N. Danforth, *The Role of Immune Cells in Breast Tissue and Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. Clin Breast Cancer, 2021. 21(1): p. e63-e73.*
161. Fernandez-Nogueira, P., et al., *Breast Mammographic Density: Stromal Implications on Breast Cancer Detection and Therapy. J Clin Med, 2020. 9(3).*
162. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021. 71(3): p. 209-249.*
163. Fisher, B., Jeong, J. H., Anderson, S., Bryant, J., Fisher, E. R., & Wolmark, N. (2002). *Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. The New England journal of medicine, 347(8), 567–575. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020128>*

164. Brewster, A.M., et al., *Residual risk of breast cancer recurrence 5 years after adjuvant therapy*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(16): p. 1179-83.
165. Kozlow, W. and T.A. Guise, *Breast Cancer Metastasis to Bone: Mechanisms of Osteolysis and Implications for Therapy*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2005. **10**(2): p. 169-180.
166. Jaouani, L., et al., *Unusual Metastasis From Breast Cancer: Case Report*. Cureus, 2021.
167. Welsh, J., *Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer*, in *Animal Models for the Study of Human Disease*. 2013. p. 997-1018.
168. Scope, A., et al., *Gene Expression Profiling and Expanded Immunohistochemistry Tests to Guide Selection of Chemotherapy Regimens in Breast Cancer Management: A Systematic Review*. International Journal of Technology Assessment in Health Care, 2017. **33**(1): p. 32-45.
169. Prat, A., et al., *Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer*. The Oncologist, 2013. **18**(2): p. 123-133.
170. Hollestelle, A., et al., *Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **121**(1): p. 53-64.
171. Tan, A. R., & Swain, S. M. (2008). *Therapeutic strategies for triple-negative breast cancer*. *The Cancer Journal*, 14(6), 343-351.
172. Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., & Brawley, O. W. (2002). *Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database*. *Breast cancer research and treatment*, 76(1), 27-36.
173. Perez, E.A., T. Patel, and A. Moreno-Aspitia, *Efficacy of ixabepilone in ER/PR/HER2-negative (triple-negative) breast cancer*. Breast Cancer Research and Treatment, 2010. **121**(2): p. 261-271.
174. van Maaren, M.C., et al., *10 year survival after breast-conserving surgery plus radiotherapy compared with mastectomy in early breast cancer in the Netherlands: a population-based study*. The Lancet Oncology, 2016. **17**(8): p. 1158-1170.
175. Waks, A.G. and E.P. Winer, *Breast Cancer Treatment: A Review*. JAMA, 2019. **321**(3): p. 288-300.
176. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. *Journal of the national cancer institute*, 51(5), 1409-1416.

177. Levenson, A. S., & Jordan, V. C. (1997). *MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line*. *Cancer research*, 57(15), 3071-3078.
178. Comşa, Ş., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). *The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research*. *Anticancer research*, 35(6), 3147-3154.
179. Perrot-Applanat, M. and M. Di Benedetto, *Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells*. *Cell Adhesion & Migration*, 2014. 6(6): p. 547-553.
180. Baguley, B. C., & Leung, E. (2011). *Heterogeneity of phenotype in breast cancer cell lines*. *Breast Cancer-Carcinog. Cell Growth Signal. Pathways*, 2, 732.
181. D'Anselmi, F., et al., *Microenvironment promotes tumor cell reprogramming in human breast cancer cell lines*. *PLoS One*, 2013. 8(12): p. e83770.
182. Sweeney, E.E., et al., *Models and mechanisms of acquired antihormone resistance in breast cancer: significant clinical progress despite limitations*. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2012. 9(2).
183. Guiu, S., et al., *Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement*. *Ann Oncol*, 2012. 23(12): p. 2997-3006.
184. Engebraaten, O., H.K.M. Vollan, and A.L. Borresen-Dale, *Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets*. *Am J Pathol*, 2013. 183(4): p. 1064-1074.
185. Fillmore, C.M. and C. Kuperwasser, *Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy*. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(2): p. R25.
186. Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nature medicine*, 3(7), 730-737.
187. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983-3988.
188. Carr, J. and I. Carr, *The origin of cancer metastasis*. *Can Bull Med Hist*, 2005. 22(2): p. 353-8.
189. Wiley, H. E., Gonzalez, E. B., Maki, W., Wu, M. T., & Hwang, S. T. (2001). *Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma*. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(21), 1638-1643.

190. Cho, H., et al., *Microfluidic technologies for circulating tumor cell isolation*. *Analyst*, 2018. **143**(13): p. 2936-2970.
191. Kalinichenko, V.V., et al., “*Sentinel*” *Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(10).
192. Ferreira, M.M., V.C. Ramani, and S.S. Jeffrey, *Circulating tumor cell technologies*. *Mol Oncol*, 2016. **10**(3): p. 374-94.
193. Galletti, G., et al., *Isolation of breast cancer and gastric cancer circulating tumor cells by use of an anti HER2-based microfluidic device*. *Lab Chip*, 2014. **14**(1): p. 147-56.
194. Kalinsky, K., et al., *Correlation of hormone receptor status between circulating tumor cells, primary tumor, and metastasis in breast cancer patients*. *Clinical and Translational Oncology*, 2015. **17**(7): p. 539-546.
195. Esmailsabzali, H., et al., *Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods*. *Biotechnol Adv*, 2013. **31**(7): p. 1063-84.
196. Ming, Y., et al., *Circulating Tumor Cells: From Theory to Nanotechnology-Based Detection*. *Frontiers in Pharmacology*, 2017. **08**.
197. Yu, M., et al., *Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization*. *Journal of Cell Biology*, 2011. **192**(3): p. 373-382.
198. de Bono, J.S., et al., *Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(19): p. 6302-9.
199. Jin, C., et al., *Technologies for label-free separation of circulating tumor cells: from historical foundations to recent developments*. *Lab Chip*, 2014. **14**(1): p. 32-44.
200. Hyun, K.A. and H.I. Jung, *Advances and critical concerns with the microfluidic enrichments of circulating tumor cells*. *Lab Chip*, 2014. **14**(1): p. 45-56.
201. Chin, W.-C., et al., *Single Cell Profiling of Circulating Tumor Cells: Transcriptional Heterogeneity and Diversity from Breast Cancer Cell Lines*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(5).
202. Lara, O., et al., *Enrichment of rare cancer cells through depletion of normal cells using density and flow-through, immunomagnetic cell separation*. *Experimental Hematology*, 2004. **32**(10): p. 891-904.

203. Yang, L., et al., *Optimization of an enrichment process for circulating tumor cells from the blood of head and neck cancer patients through depletion of normal cells*. Biotechnol Bioeng, 2009. **102**(2): p. 521-34.
204. Baccelli, I., et al., *Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(6): p. 539-44.
205. Pantel, K., Denève, E., Nocca, D., Coffy, A., Vendrell, J. P., Maudelonde, T., ... & Alix-Panabières, C. (2012). *Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases*. Clinical chemistry, 58(5), 936-940.
206. Franken, B., De Groot, M. R., Mastboom, W. J., Vermes, I., van der Palen, J., Tibbe, A. G., & Terstappen, L. W. (2012). *Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer*. Breast Cancer Research, 14(5), 1-8.
207. Cauley, C.E., et al., *Circulating Epithelial Cells in Patients with Pancreatic Lesions: Clinical and Pathologic Findings*. J Am Coll Surg, 2015. **221**(3): p. 699-707.
208. Crisan, D., Ruark, D. S., Decker, D. A., Drevon, A. M., & Dicarlo, R. G. (2000). *Detection of circulating epithelial cells after surgery for benign breast disease*. Molecular diagnosis, 5(1), 33-38.
209. Li, S., et al., *Circulating Tumor Cell Enumeration with a Combination of Epithelial Cell Adhesion Molecule- and Cell-Surface Vimentin-Based Methods for Monitoring Breast Cancer Therapeutic Response*. Clinical Chemistry, 2015. **61**(1): p. 259-266.
210. Dharmasiri, U., et al., *Highly efficient capture and enumeration of low abundance prostate cancer cells using prostate-specific membrane antigen aptamers immobilized to a polymeric microfluidic device*. Electrophoresis, 2009. **30**(18): p. 3289-300.
211. Dharmasiri, U., et al., *High-throughput selection, enumeration, electrokinetic manipulation, and molecular profiling of low-abundance circulating tumor cells using a microfluidic system*. Anal Chem, 2011. **83**(6): p. 2301-9.
212. Banko, P., et al., *Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood*. J Hematol Oncol, 2019. **12**(1): p. 48.
213. Teotia, A.K., H. Sami, and A. Kumar, *Thermo-responsive polymers*, in *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications*. 2015. p. 3-43.
214. Sheng, W., et al., *Capture, release and culture of circulating tumor cells from pancreatic cancer patients using an enhanced mixing chip*. Lab Chip, 2014. **14**(1): p. 89-98.

215. Yoon, H.J., et al., *Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets*. Nat Nanotechnol, 2013. **8**(10): p. 735-41.
216. Yoon, H.J., et al., *Tunable Thermal-Sensitive Polymer-Graphene Oxide Composite for Efficient Capture and Release of Viable Circulating Tumor Cells*. Adv Mater, 2016. **28**(24): p. 4891-7.
217. Sajay, B.N.G., et al., *Microfluidic platform for negative enrichment of circulating tumor cells*. Biomedical Microdevices, 2014. **16**(4): p. 537-548.
218. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., & Radbruch, A. (1990). *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, *11*(2), 231-238.
219. Xiong, K., et al., *Biomimetic Immuno-Magnetosomes for High-Performance Enrichment of Circulating Tumor Cells*. Adv Mater, 2016. **28**(36): p. 7929-7935.
220. Rodriguez, P.L., et al., *Minimal "Self" Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles*. Science, 2013. **339**(6122): p. 971-975.
221. Talasz, A. H., Powell, A. A., Huber, D. E., Berbee, J. G., Roh, K. H., Yu, W., ... & Davis, R. W. (2009). *Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device*. Proceedings of the National Academy of Sciences, *106*(10), 3970-3975.
222. Mikolajczyk, S.D., et al., *Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood*. Journal of Oncology, 2011. **2011**: p. 1-10.
223. Serrano, M. J., Ortega, F. G., Alvarez-Cubero, M. J., Nadal, R., Sanchez-Rovira, P., Salido, M., ... & Lorente, J. A. (2014). *EMT and EGFR in CTCs cytokeratin negative non-metastatic breast cancer*. Oncotarget, *5*(17), 7486.
224. Pecot, C.V., et al., *A Novel Platform for Detection of CK+ and CK- CTCs*. Cancer Discovery, 2011. **1**(7): p. 580-586.
225. Marrinucci, D., et al., *Cytomorphology of Circulating Colorectal Tumor Cells: A Small Case Series*. Journal of Oncology, 2010. **2010**: p. 1-7.
226. Harouaka, R.A., M. Nisic, and S.Y. Zheng, *Circulating tumor cell enrichment based on physical properties*. J Lab Autom, 2013. **18**(6): p. 455-68.
227. Hosokawa, M., Hayata, T., Fukuda, Y., Arakaki, A., Yoshino, T., Tanaka, T., & Matsunaga, T. (2010). *Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells*. Analytical chemistry, *82*(15), 6629-6635.

228. Yeh, Y.T., R.A. Harouaka, and S.Y. Zheng, *Evaluating a novel dimensional reduction approach for mechanical fractionation of cells using a tandem flexible micro spring array (tFMSA)*. Lab Chip, 2017. **17**(4): p. 691-701.
229. Harouaka, R.A., et al., *Flexible micro spring array device for high-throughput enrichment of viable circulating tumor cells*. Clin Chem, 2014. **60**(2): p. 323-33.
230. Hvichia, G.E., et al., *A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells*. Int J Cancer, 2016. **138**(12): p. 2894-904.
231. Gallant, J.N., et al., *Predicting therapy response in live tumor cells isolated with the flexible micro spring array device*. Cell Cycle, 2013. **12**(13): p. 2132-43.
232. Ma, Y., Hao, S., Wang, S., Zhao, Y., Lim, B., Lei, M., ... & Zhu, J. (2015). *A combinatory strategy for detection of live CTCs using microfiltration and a new telomerase-selective adenovirus*. Molecular cancer therapeutics, *14*(3), 835-843.
233. Matthew, E. M., Zhou, L., Yang, Z., Dicker, D. T., Holder, S. L., Lim, B., ... & El-Deiry, W. S. (2016). *A multiplexed marker-based algorithm for diagnosis of carcinoma of unknown primary using circulating tumor cells*. Oncotarget, *7*(4), 3662.
234. Lee, M.W., et al., *Clinical Application of Circulating Tumor Cells in Gastric Cancer*. Gut and Liver, 2019. **13**(4): p. 394-401.
235. Apel, P. (2001). *Track etching technique in membrane technology*. Radiation measurements, *34*(1-6), 559-566.
236. Wang, S., et al., *Highly efficient capture of circulating tumor cells by using nanostructured silicon substrates with integrated chaotic micromixers*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(13): p. 3084-8.
237. Kim, T.-H., et al., *FAST: Size-Selective, Clog-Free Isolation of Rare Cancer Cells from Whole Blood at a Liquid-Liquid Interface*. Analytical Chemistry, 2016. **89**(2): p. 1155-1162.
238. Maheswaran, S., et al., *Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(4): p. 366-377.
239. Balic, M., et al., *Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients*. Cytometry B Clin Cytom, 2005. **68**(1): p. 25-30.
240. Shen, Z., A. Wu, and X. Chen, *Current detection technologies for circulating tumor cells*. Chemical Society Reviews, 2017. **46**(8): p. 2038-2056.

241. Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., ... & Terstappen, L. W. (2004). *Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. Clinical cancer research, 10(20), 6897-6904.*
242. Zhou, M.D., et al., *Separable bilayer microfiltration device for viable label-free enrichment of circulating tumour cells.* Sci Rep, 2014. **4**: p. 7392.
243. Heitzer, E., et al., *Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing.* Cancer Res, 2013. **73**(10): p. 2965-75.
244. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel, *Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer.* Clin Chem, 2013. **59**(1): p. 110-8.
245. Zahn, H., et al., *Scalable whole-genome single-cell library preparation without preamplification.* Nat Methods, 2017. **14**(2): p. 167-173.
246. Kim, Y.R., et al., *Selective killing of circulating tumor cells prevents metastasis and extends survival.* Journal of Hematology & Oncology, 2018. **11**(1).
247. Derazshamshir, A., et al., *Molecularly Imprinted PHEMA-Based Cryogel for Depletion of Hemoglobin from Human Blood.* Macromolecular Chemistry and Physics, 2010. **211**(6): p. 657-668.
248. Okay, O. and V.I. Lozinsky, *Synthesis and Structure–Property Relationships of Cryogels,* in *Polymeric Cryogels.* 2014. p. 103-157.
249. Stockert, J.C., et al., *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets.* Acta Histochemica, 2012. **114**(8): p. 785-796.
250. Ong, J., et al., *Functionalisation of a heat-derived and bio-inert albumin hydrogel with extracellular matrix by air plasma treatment.* Scientific Reports, 2020. **10**(1).
251. Sargin, İ., *KİTOSAN/ter(GMA-MA-NTBA) POLİMER İLE MİKROKAPSÜL HAZIRLAMA VE KARAKTERİZASYONU.* Selcuk University Journal of Engineering ,Science and Technology, 2019. **7**(2): p. 524-535.
252. Retnakumari, A., et al., *Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging.* Nanotechnology, 2010. **21**(5): p. 055103.
253. Bayrak, G., et al., *Amino acid functionalized macroporous gelatin cryogels: Characterization and effects on cell proliferation.* Process Biochemistry, 2021. **110**: p. 100-109.

254. Demircan, G. and Y. Mater, *Effects of Fluorescent Marked Maackia Amurensis-Lectin-1 and Wheat Germ Agglutin on the Cell Surface Glycan Profiles in Two Different Breast Cancer Cell Lines*. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi, 2019. **82**(2).
255. Yavuz, H., et al., *Concanavalin A Binding on PHEMA Beads and Their Interactions with Myeloma Cells*. Journal of Macromolecular Science, Part A, 2009. **46**(2): p. 163-169.
256. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
257. Altunbaş, C. (2013). *Yüksek fruktozlu şurup üretimi için Concanavalin A bağlı süper makro gözenekli kriyojellere inulinaz immobilizasyonu* (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).