

**MEME KANSERİ HÜCRELERİYLE ÜÇ BOYUTLU
TÜMÖR MODELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE NOÇ
RESEPTÖRÜ İNHİBİTÖRÜNÜN UYGULANMASI**

**DEVELOPMENT OF 3D TUMOUR MODELS WITH
BREAST CANCER CELLS AND APPLICATION OF
NOTCH RECEPTOR INHIBITOR**

FARUK ÇAŞTABAN

PROF. DR AYŞE KEVSER ÖZDEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

FARUK ÇAŞTABAN'nın hazırladığı “**Meme Kanseri Hücreleriyle Üç Boyutlu Tümör Modellerinin Geliştirilmesi ve Noç Reseptörü İnhibitörünün Uygulanması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN

Başkan



Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

Danışman



Prof. Dr. Hülya Yavuz ERSAN

Üye



Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ

Üye



Doç. Dr. Naciye Dilara ZEYBEK

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak / /..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak

hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20 / 06 / 2019

F. ÇAŞTABAN

Faruk ÇAŞTABAN

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

20 / 06 / 2019
d. hastakall

Faruk ÇAŞTABAN

ÖZET

MEME KANSERİ HÜCRELERİYLE ÜÇ BOYUTLU TÜMÖR MODELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE NOÇ RESEPTÖRÜ İNİHİBİTÖRÜNÜN UYGULANMASI

Faruk ÇAŞTABAN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDE

Haziran 2019, 44 sayfa

Klinik öncesi çalışmalarda hastalık modelleri olarak hücre kültürleri vazgeçilmez araştırma araçlarından biridir. Tek tabaka (*Monolayer*) olarak oluşan İki boyutlu (2B) kültür doğal dokunun ekstraselüler matris (ESM) etkileşimlerini bulundurmaz. Dolayısıyla, hastalık modellemelerinde gerçekçi çözümler sunamamaktadır. Bu nedenle doku mühendisliği yaklaşımıyla geliştirilen üç boyutlu matrisler ile doğal ESM benzeri *in vitro* üç boyutlu (3B) tümör modelleri oluşturulması üzerinde çalışılmaktadır. Bu tez çerçevesinde, toplumda kadınlarda oldukça yaygın olarak görülen ve ölümcül patolojisi olan meme kanseri için üç boyutlu bir *in vitro* model oluşturmak ve oluşturulan modelde bir ilaç hedefi olan Noç reseptörün inhibisyonu hedeflenmiştir. Bunun için, tümör dokusu ekstraselüler matrisini taklit etmek amacıyla glikozaminoglikanlardan

(GAG) kondroitin sülfat ve hyalüronik asidi bileşiminde içeren hidrojel-nanofiber kompoziti aljinat tabanlı matrisler tasarlanmıştır ve glukoz kullanılarak oluşturulan yapıya porosite kazandırılmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı oluşturulan 3B matrislerde üretilmiştir. Jel matrislerde, yapılan taramalı elektron mikroskop görüntülerinde glukozla hazırlanan matrislerde istenen özellikte porlu yüzey özellikleri saptanmıştır. 3B matrislerle yapılan kültürde kullanılan matrislerin hepsinde hücre çoğalması 2B kültüre göre artmıştır, özellikle glukoz içerikli olanlarda hücre çoğalmasının en yüksek olduğu belirlenmiştir. Noç inhibisyonu, 2B kültürdeki hücrelerin çoğalmasını azaltırken 3B matristeki hücrelerin çoğalmasını istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkilememiştir. Aljinat-hyalüronik asit ve glukoz içeren matrislerde en iyi hücre çoğalması sağlanmıştır. Sonuç olarak, aljinat, hyalüronik asit, glukoz ve jelatin/kondroitin sülfat kompozit elektro-eğirilmiş fiber içeren matrislerin hücre dostu ve ekstraselüler matris benzeri yapılar oluşturduğu ve bunların ilaç geliştirme ve dozlama çalışmalarına uyarlanabilecek sistemler olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Üç boyutlu matris, kanser, MDA-MB-231 hücreleri, Noç reseptör, aljinat

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF 3D TUMOUR MODELS WITH BREAST CANCER CELLS AND APPLICATION OF NOTCH RECEPTOR INHIBITOR

Faruk ÇAŞTABAN

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Kevser Özden

June 2019, 44 pages

Tissue cultures as disease models are indispensable research tools in the preclinical studies. Two-dimensional (2D) culture that composed in the monolayer form cannot bear the extracellular interactions of the natural tissue. Therefore, it cannot present realistic solutions in the disease modelling. Because of that, scientist study on creating three-dimensional tumor models with the usage of three-dimensional (3D) matrixes that developed with the tissue engineering approach. Within the scope of this thesis statement, creating a three-dimensional in vitro model for breast cancer which is one of the widely observed and lethal pathology among women and inhibition of notch receptor on this model is targeted. For this, hydrogel-nanofiber composite, alginate-based matrixes are designed, and porosity introduced to the structure by using glucose. MDA-MB-

231 cells were cultured on 3D matrixes. Porous surfaces were obtained especially in glucose treated matrixes by scanning electron microscopy images. Cell proliferation is increased in the all cultures cultured in 3D matrixes in comparison to 2D cultures, cell proliferation is identified as the highest in the matrixes containing glucose. While notch inhibition decreased the proliferation in 2D cultures, it did not affect the proliferation of cells in 3D cultures, in a statistically significant way. The matrixes composed of alginate-hyaluronic acid and glucose provided the best cell proliferation. In conclusion, alginate, hyaluronic acid, glucose and gelatin/chondroitin sulphate composite fiber bearing matrixes identified as cell friendly and creating extracellular matrix mimetic systems suitable for drug development and dosing studies.

Keywords: Three-dimensional matrix, cancer, MDA-MB-231 cells, notch receptor, alginate

TEŞEKKÜR

Beni yetiőtiren, değerli öğretmenim ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN'e

Jürimde bulunarak bana zaman ayıran, değerli öğretmenlerim Prof. Dr. Nihal AYDOğAN, Prof. Dr. Hülya Yavuz ERSAN, Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ ve Doç. Dr. N. Dilara ZEYBEK'e

Öğrencilik yıllarımızın en güzel günlerini birlikte geçirdiğimiz, değerli dostum Umut Akça'ya

Beni her zaman destekleyen, güven veren ve her zaman güvendiğim CANIM ANNECİğİM, BABACIğİM ve BİRİCİK KARDEŐİME

Canı Gönülden Teşekkür Ederim...

Faruk Çayıtaban

Haziran 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

| | |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | x |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Biyomedikal Alanda Araştırma Yöntemlerine Genel Bakış | 3 |
| 2.2. Ekstraselüler Matris (ESM) | 5 |
| 2.3. Doku Mühendisliği ve İnsan Fizyolojisinin Modellenmesi | 7 |
| 2.3.1. Hidrojel İskeleler | 9 |
| 2.3.2. Elektro-Lif Çekimi | 10 |
| 2.4. Doğal biyopolimerler | 10 |
| 2.4.1. Aljinat (Alg) | 11 |
| 2.4.2. Jelatin (Jel) | 12 |
| 2.4.3. Hyalüronik Asit (HA) | 13 |
| 2.4.4. Kondroitin Sülfat (KS) | 13 |
| 2.5. Kanser | 14 |
| 2.5.1. Meme Kanseri | 15 |
| 2.5.2. Noç Hücre Sinyalleşmesi | 17 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR | 19 |
| 3.1. Malzemeler ve Hücre Hattı | 19 |
| 3.1.1. Kimyasal Malzemeler | 19 |
| 3.1.2. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı | 19 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları..... | 19 |
| 3.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması ve İnkübasyon Koşulları..... | 19 |
| 3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması | 20 |
| 3.2.3. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması | 21 |
| 3.3. Üç Boyutlu Matrislerin Hazırlanması..... | 21 |
| 3.3.1. Elektro-Lif Çekimi..... | 21 |
| 3.3.2. Elektro-Eğirilmiş Matların Sterilizasyonu..... | 21 |
| 3.3.3. Kompozit Matrislerin Hazırlanması..... | 22 |
| 3.4. Boyutlu Matrislerin Karakterizasyonu..... | 23 |
| 3.4.1. SEM: Taramalı Elektron mikroskopisi | 23 |
| 3.4.2. FTIR: <i>Fourier</i> Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi..... | 24 |
| 3.5. Üç Boyutlu Hücre Kültürü | 25 |
| 3.6. Hücre Çoğalmasının MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi ile İncelenmesi | 25 |
| 3.6.1. İstatistik Analizler | 26 |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 27 |
| 4.1. Üç boyutlu matrislerin özellikleri | 27 |
| 4.1.1. Matris Yüzeyinin Görüntüsü | 27 |
| 4.1.2. Matris yüzeyinin kimyasal yapısı | 29 |
| 4.2. Matriste Meme Kanseri Hücrelerinin Çoğalması..... | 30 |
| 4.2.1. γ -Sekretaz İnhibitörünün kültürlerde hücre çoğalmasına Etkisi..... | 32 |
| 5. YORUM..... | 35 |
| KAYNAKLAR..... | 37 |
| EKLER | 41 |
| EK 1 - İstatistik Analizler | 41 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 45 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. | Aljinat-hyalüronik asit hidrojel ve jelatin-kondroitin sülfat nanofiber matı içeren 3B Matris..... | 2 |
| Şekil 2.1. | Yeni bir tedavinin kliniğe yolculuğu..... | 4 |
| Şekil 2.2. | ESM ve ESM'den alınan hücrel sinyallerin konseptsel gösterimi . | 5 |
| Şekil 2.3. | ESM elemanlarının hiyerarşik sınıflandırması | 6 |
| Şekil 2.4. | Doku mühendisliği ve 3B kültür modellemesinin işleyişi | 9 |
| Şekil 2.5. | Elektro-lif çekimi konseptsel gösterimi..... | 10 |
| Şekil 2.6. | Aljinatın çapraz bağlanması (yumurta-kutu modeli)..... | 12 |
| Şekil 2.7. | Noç sinyal yolağı | 18 |
| Şekil 4.1. | Aljinat ve aljinat-glukoz hidrojellerin SEM görüntüsü | 27 |
| Şekil 4.2. | Jelatin-kondroitin sülfat nanofiberlerin SEM görüntüsü..... | 28 |
| Şekil 4.3. | Aljinat-hyalüronik asit nanofiber kompozitlerinin glukozlu ve glukozsuz hallerinin SEM görüntüleri..... | 28 |
| Şekil 4.4. | Aljinat-hyalüronik asit-jelatin-kondroitin sülfat, fiber içermeyen 3B matrisin SEM görüntüsü | 29 |
| Şekil 4.5. | Aljinat, aljinat-hyalüronik asit, aljinat-hyalüronik asit-fiber gruplarının FTIR analizi | 30 |
| Şekil 4.6. | 3B Matris ve 2B kültürlerde hücrelerin büyüme eğrileri | 31 |
| Şekil 4.7. | 3B Matris ve 2B kültürlerde hücre çoğalmasının standart sapmalar ile gösterimi..... | 32 |
| Şekil 4.8. | 2B kültürlerde γ -sekretaz inhibitörlü ve inhibitörsüz hücre çoğalması | 33 |
| Şekil 4.9. | γ -Sekretaz inhibitörünün, 3B ve 2B sistemlerde, hücre çoğalmasına etkisi | 34 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. | Meme kanseri hücrelerinin sınıflandırılması | 16 |
| Çizelge 3.1. | Çalışma içerisinde hazırlanan tüm matrisler..... | 22 |
| Çizelge 3.2. | Aljinat tabanlı jel öncüllerinin içerikleri | 23 |
| Çizelge 3.3. | SEM Analizlerinde incelenen matrisler | 24 |
| Çizelge 3.4. | FTIR Analizlerinde incelenen matrisler..... | 24 |
| Çizelge 3.5. | Üç boyutlu kültürlerde kullanılan matrisler..... | 25 |
| Çizelge 4.1. | 3B Kültürlerde kullanılan matrisler..... | 30 |
| Çizelge 4.2. | 2B Kültürlere göre 3B matrislerde hücre sayısının yüzde olarak artış miktarları | 31 |
| Çizelge 4.3. | Yüzde çoğalma inhibisyonu oranları | 34 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|-------------|---------------------------|
| Ca^{2+} | Kalsiyum Katyonu |
| μM | Mikromolar |
| $^{\circ}C$ | Santigrat derece sıcaklık |
| dk | Dakika |
| kV | Kilovolt |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| v | Hacim |
| w | Ağırlık |
| γ | Gama |

Kısaltmalar

| | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|
| 2B | İki Boyutlu |
| 3B | Üç Boyutlu |
| A | Aljinat hidrojel |
| ADAM | <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i> |
| ADAMTS | <i>A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs</i> |

| | |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AG | Glukoz ile porlandırılmış, aljinat hidrojel |
| AH | Aljinat-Hyalüronik asit kompoziti hidrojel |
| AHF | Jelatin-kondroitin sülfat nanofiberleri içeren, aljinat-hyalüronik asit kompoziti hidrojel |
| AHFG | Glukoz ile porlandırılmış, Jelatin-kondroitin sülfat nanofiberleri içeren, aljinat-hyalüronik asit kompoziti hidrojel |
| AHG | Glukoz ile porlandırılmış, aljinat-hyalüronik asit kompoziti hidrojel |
| AHJK | Nanofiber içermeyen, jelatin ve kondroitin sülfatın hidrojel öncülünde çözülerek eklendiği, aljinat-hyalüronik asit kompoziti hidrojel |
| Alg | Aljinat |
| CaCl ₂ | Kalsiyum Klorür |
| DMEM | Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| EGFR | Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü |
| ER | Östrojen Reseptörü |
| ESM | Ekstraselüler Matris |
| FTIR | <i>Fourier</i> Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| GAG | Glikozaminoglikan |
| HA | Hyalüronik Asit |
| HER2 | İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 |
| Jel | Jelatin |
| JelKS | Jelatin-Kondroitin Sülfat |
| KS | Kondroitin Sülfat |
| MMP | Matris Metaloproteinaz |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür |

| | |
|------------|-----------------------------------------------|
| PR | Progesteron Reseptörü |
| RGD dizisi | Arjinin–glisin–aspartik asit |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskobu |
| TIMP | <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinase</i> |

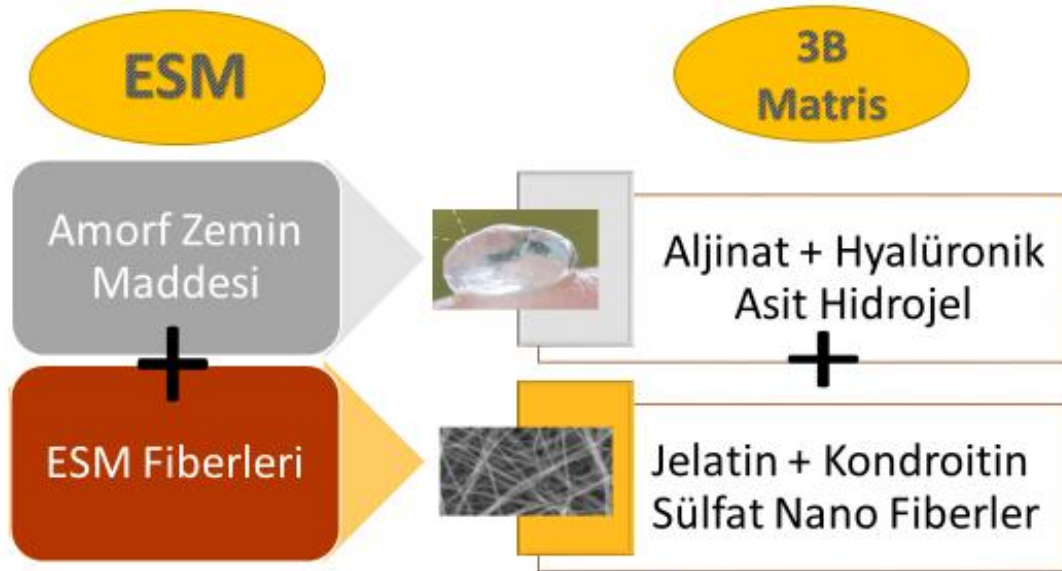
1.GİRİŞ

Hastalık modelleri, klinikte kullanılmak üzere ilaç geliştirilmesi ya da hastalığın biyolojik bilimlerde araştırılması ve gelişim aşamalarının keşfedilme süreçlerinde, deneysel çalışmaların yürütülebilmesi için temel araştırma araçlarıdır. Bu modeller insan hastalıklarında oluşan biyolojik süreçlere benzer koşulların, yapay olarak oluşturulması ile elde edilirler ve *in vitro* ve *in vivo* modeller olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Araştırma sürecinin bir test tüpü ya da kültür kabı içerisinde gerçekleştiği *in vitro* terimi ile ifade edilirken, *in vivo* kavramı araştırmanın hayvan denekler üzerinde yapıldığını ifade eder. Hayvanlar üzerinde geliştirilen *in vivo* modeller canlı üzerinde kurgulanmaları ve doğal doku, organ ve sistemleri içermeleri açısından, modellenen canlıdaki duruma daha yakındırlar. Şu an için en yaygın kullanılan, *in vitro* model olan ve tek tabaka (*Monolayer*) olarak oluşan iki boyutlu (2B) kültür, özellikle, doğal dokunun ekstraselüler matris (ESM) etkileşimlerini buldurumaması yönünden *in vivo* modellerle kıyaslandıklarında zayıf kalmaktadırlar. Ancak günümüzde doku mühendisliği diye adlandırılan yaklaşımda, gerçek ESM yapısını taklit eden, biyomimetik, üç boyutlu (3B) matrislerin geliştirilmesi ile daha gerçekçi, *in vitro* hastalık modelleri geliştirilmektedir. Bu 3B kültür modelleri, ucuz ve etkili olmalarının yanı sıra etik kaygılar oluşturmaması yönünden de çok önemli araştırma araçlarıdır.

Bu tez çerçevesinde modellenen meme kanseri, en sık karşılaşılan kanserlerden ve kadınlarda görülen en yaygın, ölümcül hastalıklardan biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre bir kadının hayatı boyunca meme kanserine yakalanma olasılığı %12,3'tür. 2012 yılında dünya çapında kadın hastalarda görülen tüm kanserlerin %25'ine karşı gelen 1,7 milyon yeni olgu tanımlanmıştır (ROJAS and STUCKEY 2016). Ölümün çoğu oluşan tümörden değil, kanserin diğer organlara metastazıyla gerçekleşmektedir. Noç, Wnt, SHH gibi birçok yolak, meme kanserinde, olası terapi hedefleri olarak çalışılmaktadır. Tümör mikro çevresi, tümör hücrelerinin davranışları üzerinde etkili olduğu için, bu hücreleri kültür kaplarında iki boyutlu olarak üretmek bilgi sağlamak için yeterli

olmamaktadır. Kanser hücrelerinin 3B biyomimetik yapılarda daha gerçeğe yakın modellerde çalışılması bir gerekliliktir.

Toplumda kadınlarda oldukça yaygın olarak görülen ve ölümcül bir patolojisi olan meme kanseri için üç boyutlu *in vitro* modeller oluşturmak amaçlanmaktadır. Bu bağlamda doğal malzemeler olan jelatin, aljinat, kondroitin sülfat ve hyalüronik asit içeren ESM benzeri yapı ve özellikle olan, metastatik meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını sağlayacak, fiber-hidrojel kompozit matrislerin geliştirilmesi (Şekil 1.1'deki gibi) ve bu sayede üç boyutlu tümör modellerinin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada, insan metastatik meme kanseri hücreleri, MDA-MB-231, oluşturulacak polimerik iskelelerde üç boyutlu kültürde üretilmiştir. Polimerik iskelelerin bileşimi tümör çevresi ve ekstraselüler matris benzeri olarak hazırlanmış polimerik ESM benzeri matrislerin yüzey yapısı, kimyasal yapısı incelenmiştir. İskeleler üzerinde üç boyutlu meme kanseri hücrelerine noç reseptörü inhibitörü (C26H41N3O5) uygulanmış ve hücre çoğalması MTT testi ile incelenmiştir.



Şekil 1.1. Aljinat-hyalüronik asit hidrojel ve jelatin-kondroitin sülfat nanofiber matı içeren 3B Matris

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyomedikal Alanda Araştırma Yöntemlerine Genel Bakış

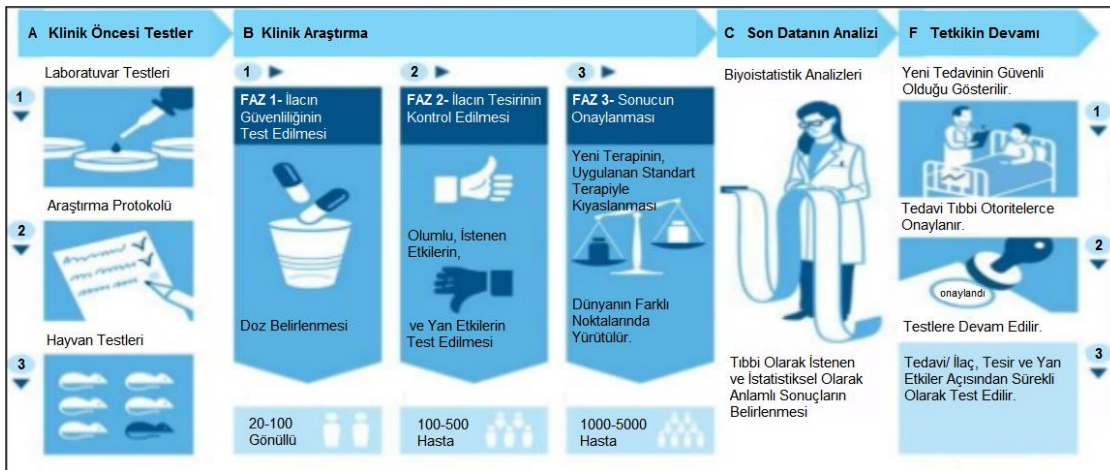
Biyomedikal alanda, önemli her ilerlemede amaç, hastalıklara çözüm bulmak, insan sağlığını iyileştirmek ve yaşam süresini uzatmak için tıbbi teknoloji ve yeni yaklaşımlar ortaya koymak olmuştur. Bu ilerlemeler ile günümüz biyomedikal alanında köklü gelişmeler yaşanmıştır. Sadece gözlemsel olarak yapılan araştırmalar, bilime önemli katkılar sağlasa da, biyomedikal alanda, deneysel çalışmalar kadar etkili değildirler. Deneysel çalışmalar, klinik öncesi araştırmaların temelini oluştururlar ve üzerinde kurgulanmak için, öncelikle *in vitro* ve devamında ise *in vivo* diye tabir edilen sistemlere ihtiyaç duyarlar (Khan et al. 2018). *In vitro* mana olarak sürecin, bir test tüpü, kültür kabı gibi canlı organizmanın dışında gerçekleştiğini ifade ederken, bu kavramın karşıtı olan *in vivo* terimi, sürecin canlı organizmada gerçekleştiğini ifade eder.

Kanser araştırmaları da dahil olmak üzere tedavi geliştirme sürecinde *in vitro* modeller olmazsa olmaz araştırma araçlarıdır. *In vitro* deneyler, mikroorganizmalar, izole edilmiş hücreler, biyolojik moleküller, hücre kültür sistemleri, doku kesitleri veya izole organlar üzerinde, yaratılan optimal koşullar altında, biyolojik sistemlerinin dışında yürütülür. Bu sistemler özellikle potansiyel ilaçların taranmasında avantaj sağlarlar (Khan et al. 2018). *In vitro* modellerin ilk aşamayı oluşturmasının bir mantığı da hayvan deneylerine başlamadan önce etinin de bir gereği olarak, geliştirilen tedavinin canlı sistemde araştırılmaya devam edilmeye değer olup olmadığının ortaya konmasıdır. Klinik öncesi araştırmaların devamını ise, genellikle *in vivo*, yani hayvan deneyleri izler.

In vivo, hayvan denemeleri diye de tabir edilen, bu kısımda gerekli etik izinler alınarak patolojik durum model organizmalarda oluşturulmaya çalışılır. Özellikle son yıllarda genetik alanında yaşanan gelişmeler sayesinde fare genetiğinde yapılan manipülasyonlar ile daha anlamlı modeller ortaya çıkmaya başlamıştır; dolaşım sistemi hastalıklarından, Alzheimer Hastalığına, karaciğer, kolon gibi

kanser tiplerine varan çok sayıda geliştirilmiş modeller mevcuttur. Fare dışında, çeşitli sıçan, domuz, zebra balığı gibi türler üzerinde geliştirilmiş çokça model bulunmaktadır. İn vivo araştırmaların bir önemi de olası toksik etkilerin bir canlı sistemde, insan denemelerinden önce ortaya çıkartılmak istenmesidir (Khan et al. 2018).

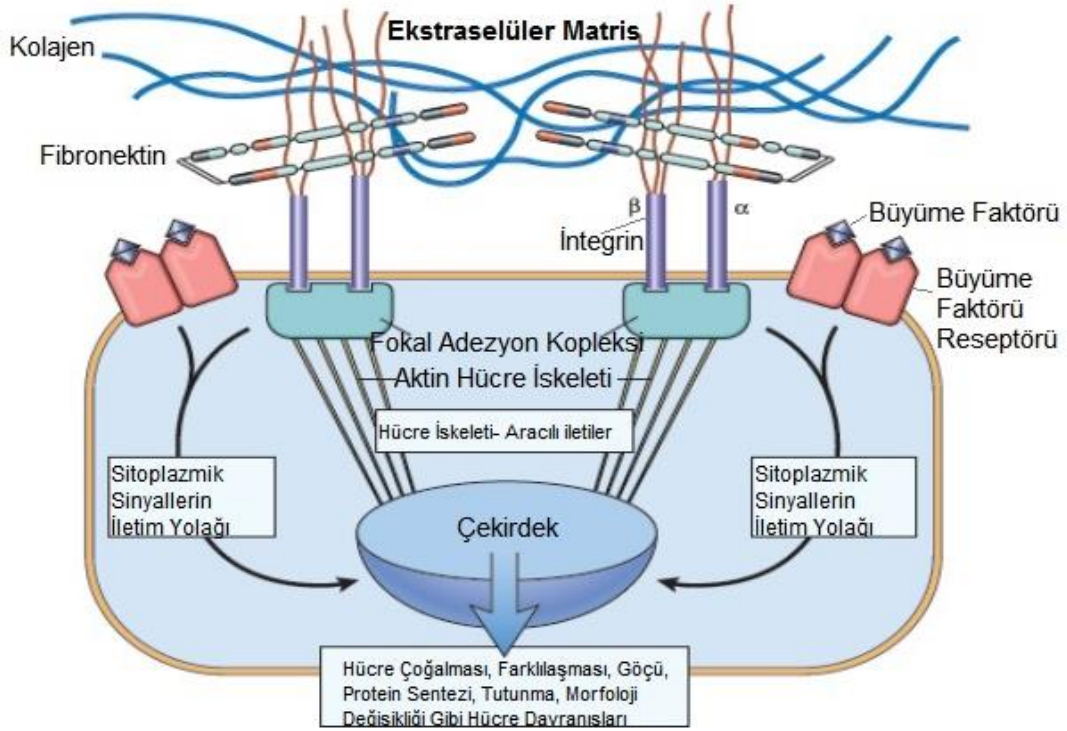
Klinik araştırmaya geçildiğinde ise artık ilaç, insanların kullanımı için uygun görülmeyle başlanmış olsa da, olası yan etkilerinden şüphelenilmektedir. Bu nedenle faz 1, klinik araştırmalarda küçük bir gönüllü grubu üzerinde ilaç küçük dozlarda denenmeye başlanarak dozaj ve ilacın güvenilirliği test edilir. Faz 2’de artık ilaç, daha büyük bir gönüllü hasta gurubu üzerinde denenmeye başlanır. Daha net bir hedef kitlesi, tedavinin uygun olmayacağı hasta gurubu, tedavinin daha etkili olması için gereken dozlama stratejisinin belirlenmesi yapılırken, yan etkiler de takip edilmeye devam edilir. Faz 3’te ise faz 2’den de daha büyük dünyanın farklı bölgelerine dağılmış paralel çalışılan bir hasta gurubu ile randomize şekilde, araştırılan tedavi ya da araştırma zamanında klinikte kullanılan standart tedaviyi uygulayarak kıyaslama yapılır (Council 2010). Tedavi tüm fazları geçip tıbbi otoritelerce onaylansa da ilacın tesiri ve yan etkileri hasta takiplerine devam edilerek kaydedilmeye devam edilir. Genel bir tedavi veya bir ilacın klinikte standart bir tedaviye dönüştüğü bu süreç Şekil 2.1’de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Yeni bir tedavinin kliniğe yolculuğu (Anonim 2017)

2.2. Ekstraselüler Matris (ESM)

Ekstraselüler matris, bol miktarda su tutabilen ve jel benzeri özellikleri olan, glikozaminoglikanlar (GAG), proteoglikanlar ve glikoproteinlerin oluşturduğu yapı ve bu yapının içerisinde bulunan; kolajen, elastin gibi özgül protein ipliklerin oluşturduğu, kompleks üç boyutlu ağ örgüsüdür. Bu ortam, hücrelerin çoğalma ve farklılaşmalarını düzenleyen, biyokimyasal ve fiziksel sinyaller sağladığı gibi üç boyutlu yapı içerisinde her yönden sinyal alabilecek şekilde, birbirleriyle iletişimde olmalarını da sağlar (Andersen et al. 2015). Bu iletişim ilgili gen ekspresyonlarını değiştirerek hücre davranışını şekillendirmektedir (Şekil 2.2).

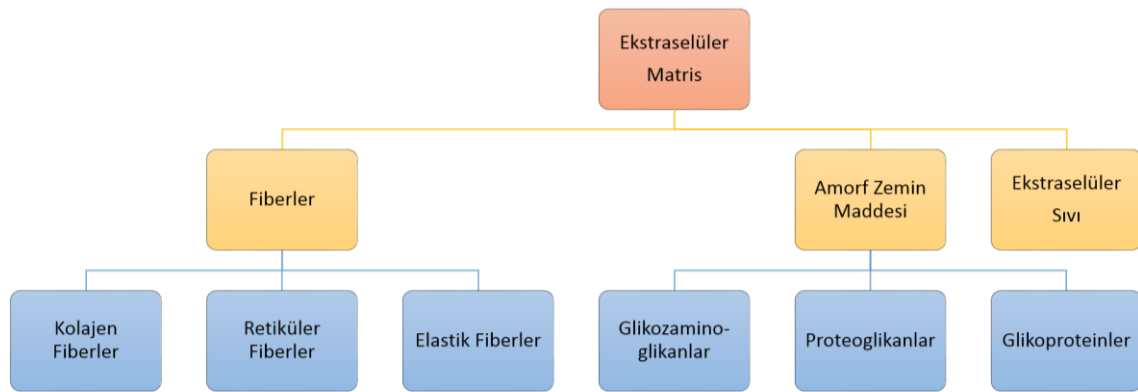


Şekil 2.2. ESM ve ESM'den alınan hücresel sinyallerin konseptsel gösterimi

GAG, proteoglikanlar ve glikoproteinlerin oluşturduğu jel benzeri yapıya amorf zemin maddesi denir; ESM fibrilleri ve hücreler, bu yapıya gömülü halde bulunurlar. GAG'lar tekrarlayan disakkaritlerden oluşan lineer polimerlerdir. Bu disakkaritlerin, bir monomeri heksozamin iken diğeri heksüronik asittir. Tümü sülfatlanmıştır (hyalüronik asit hariç), dolayısıyla negatif yüklüdürler. Proteoglikanlar ise, çekirdek bir protein ve üzerine kovalent bağlanmış

GAG'lardan oluşun yapısal bileşenlerdir (Gartner and Hiatt 2012). Bu ESM elemanları hücre tutunması, çoğalması ve göçü gibi önemli davranışları direkt ya da sinyal molekülleri ile etkileşerek düzenleyebilirler. Ayrıca birçok habis tümör çeşidinde, ESM'in proteoglikan ve glikozaminoglikan sentezinde artış görüldüğüne dair iddialar bulunmaktadır (Asimakopoulou et al. 2008; Liu et al. 2016; Yahya et al. 2014). Glikoproteinler ise hücre zarı ve ESM'de bulunarak; hücreler arası, hücre-ESM olmak üzere daha çok tanıma ve iletişim fonksiyonu üstlenen glikozillenmiş proteinlerdir.

ESM fibrilleri dokulara, hücreler için tutunma yüzeyi sağlayarak; destek, esneklik gibi özellikler kazandırır. ESM fibrillerinin kompozisyonu, dokuya özgü mekanik özellikleri birinci dereceden etkiler. Bunlar, kolajen, retiküler ve elastik fibriller olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Kolajen, ESM'nin en sık rastlanan, aynı zamanda yapısal esnemez fibrilleridir. ESM fiberlerine hücre tutunmasının, en bilinen örneği, kolajenin içerdiği RGD dizilerinin (arjinin–glisin–aspartik asit) integrin denilen glikoproteinler aracılığıyla, hücreler tarafından tanınmasıdır. Kolajen fiberlerin dışında, daha ince ve dallanır yapıda olan retiküler fibriller ve elastin zincirlerinden meydana gelen, kalın ve esneme özelliğine sahip elastik fibriller bulunmaktadır (Ross and Pawlina 1979). ESM elemanlarının hiyerarşik olarak sınıflandırılması Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. ESM elemanlarının hiyerarşik sınıflandırması

ESM sürekli bir yapım ve yıkım döngüsü içerisinde. Bir yandan yıkılırken, bir taraftan yeniden üretilir. Matris metaloproteinaz (MMP), disintegrin ve metaloproteinaz (ADAM: *a disintegrin and metalloproteinase*), trombospondin motifleri içeren disintegrin ve metaloproteinaz (ADAMTS: *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), ve metaloproteinazların doku inhibitörü (TIMP: *tissue inhibitors of metalloproteinase*); adı verilen enzimler bu döngüde çeşitli roller oynayan moleküllerdir. ADAM, daha çok hücre-hücre tutunmasını engellerken, ADAMTS özellikle proteoglikanların yıkımında rol oynar. MMP'lerin hedefi ise çeşidine göre birçok ESM elemanı olabilir. Örneğin, MMP-3 ve -10'un hedefi proteoglikanlar ve fibronektin, laminin gibi glikoproteinler iken; MMP- 1 kolajen III, MMP-13, kolajen I ve II, MMP-2 ve -9 ise denatüre kolajen olan jelatinin yıkımını üstlenir. TIMP'lerse bu enzimlerin inhibisyonundan sorumludur. Bu döngüde dengenin bozulması, birçok doğuştan gelen bozukluk, çeşitli hastalık ve kanserin ortaya çıkmasına sebep olabilir (Lu et al. 2011). Özellikle, çeşitli MMP ve bunların TIMP'ler ile incelenen dokuda bulunma oranlarının (MMP/TIMP oranı) artışı ESM yıkımının bir işareti ve kanserde metastazın gelişiminin belirtisi olarak çokça araştırılmaktadır ve önemli biyobelirteçlerdir (Liu et al. 2016; Lu et al. 2011; Tang et al. 2017; Tency et al. 2012).

2.3. Doku Mühendisliği ve İnsan Fizyolojisinin Modellenmesi

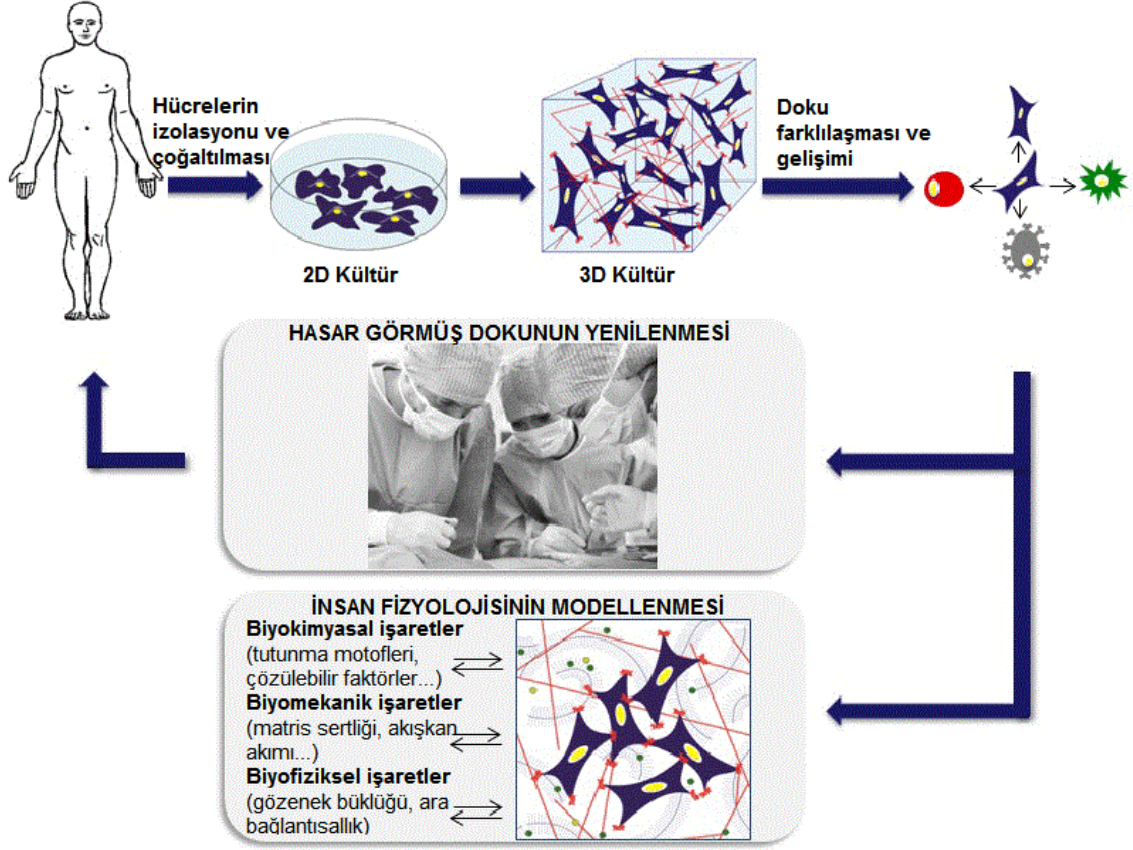
İn vitro çalışma denildiğinde akla ilk gelen, polistiren (TCP) hücre kültür kaplarının kullanımını içeren; iki boyutlu (2B), tekkatmanlı (*monolayer*) kültür yöntemidir. Bu kültür kaplarının alt yüzeyleri hücre tutunmasını mümkün kılan özel kaplamalara sahiptir. Özellikle tutunmaya dayalı olarak üreyebilen hücre hatları ve primer kültürlerin çoğaltılması için kullanılırlar. Esasen iki boyutlu kültür, canlı sistemde görülen hücre-ESM etkileşiminin bulunmaması nedeniyle, orijinal dokudaki gibi gerçekçi bir model ortaya koyamamaktadır. Bu bağlamda doku mühendisliği yaklaşımıyla geliştirilen (Şekil 2.4), doku iskelesi diye tanımlanan doğal, sentetik veya kompozit biyomalzemelerden oluşan matrisler kullanılarak, daha gerçekçi 3B modeller geliştirilmektedir (Caddeo et al. 2017). Doku mühendisliği ilk kez

Robert Langer ve Joseph P. Vacanti tarafından, mühendislik yaklaşımının, biyolojik bilimlerde kullanılması sayesinde geliştirilen biyolojik substitütifler ile bir biyolojik fonksiyonu restore eden, devamlılığını sağlayan ya da doku işleyişini geliştiren, multi-disipliner alan olarak tanımlanmıştır (Langer and Vacanti 1993). Günümüzde de aynı yaklaşım ile 3B modellerde, hasta dokuyu modelleyerek, hastalık gelişim sürecinin daha iyi anlaşılmasında ve olası tedavilerin geliştirilmesinde kullanım alanı bulmaktadır (Caddeo et al. 2017).

Üç boyutlu sistemler serbestçe yüzen hücre kümelerinden başlayıp geliştirilen, daha etkin, doğal ya da sentetik biyomalzeme matrisleri ve hatta hücrelerinden arındırılmış organ ve dokuları kullanan sistemlere kadar çeşitlenir. Böylece fizyolojik açıdan daha anlamlı hücre-hücre ve hücre-ESM etkileşimi hedeflenebilmektedir (Fong et al. 2016). Bu sistemlerde sağlıklı ya da hasta kişilerden elde edilmiş hücre hatları veya izole hücrelerin kültürleri yapılır. Bunlar, çeşitli embriyonik kök hücreler, yetişkin bireylerden elde edilen mezenkimal kök hücreler veya kanser hücreleridir. Son yıllarda sıkça tercih edilmeye başlanan hücre tiplerinden biri de, endüklenen pluripotent kök hücrelerdir (IPSC), büyüme faktörleri kullanılarak farklılaşmış hücrelere, kök hücre özelliği kazandırılması ile elde edilirler. Kişiselleştirilmiş tıp denilen kişinin hastalığına ilişkin en efektif tedavinin belirlenmesi ve uygulanmasını içeren yaklaşımda, 3B modellerin özel bir önemi vardır. Örneğin, bizzat hastanın patolojik durumundan hızlı modellerin elde edilmesiyle ve modelde hızlı tedavi/ilaç taraması yapılarak, yan etkiler minimuma indirilmiş halde, hastaya en etkili çözüm sunulabilecektir.

İn vivo modellerin kullanımı beraberinde getirdiği maliyet ve etik izin gereksinimi nedenleriyle araştırmaların yapılmasını zorlaştırmaktadır. Bu bağlamda önem kazanan üç boyutlu (3B) kültür sistemleri, gelecek araştırmalarda *in vivo* sistemlere alternatif yaratabilecektir. Daha gelişmiş *in vivo* modeller oluşturmak amacı ile 3B matrislerin hayvan deneklere nakledildiği ve tümör gibi patolojik dokuların oluşturulduğu yaklaşımlar da mevcuttur (Tang et al. 2017). 3B *in vitro* modellerin, gelecekte geliştirilecek daha kompleks ve biyoreaktörleri (kültür sıvısının 3B matrisler içerisinde perfüze edilmesi) kullanan sistemler ile *in vivo*

modellerin yerini, tamamen alabileceği de ön görülmektedir. Klinik öncesi araştırma metotlarındaki bu gelişmeler, yeni tedavilerin, klinik araştırmalara daha emin ve güvenli şekilde geçmesini sağlayacaktır.



Şekil 2.4. Doku mühendisliği ve 3B kültür modellemesinin işleyişi (Castells-Sala et al. 2013)

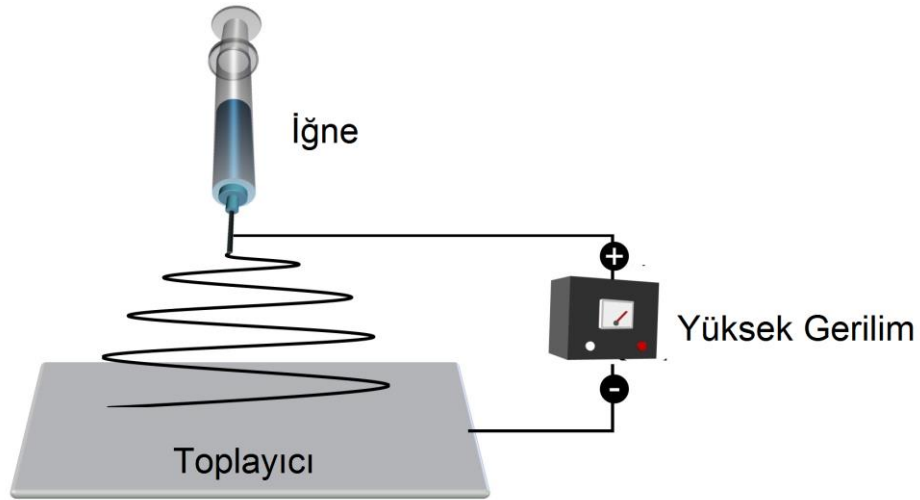
2.3.1. Hidrojel İskeleler

Doğal ekstraselüler matriste bulunan amorf zemin maddesine benzerlik gösteren jel yapısı sayesinde yüksek su tutma kapasiteleri ve hücrelere besin, oksijen taşınmasında gösterdikleri verimlilik ile hidrojel matrisler bu anlamda araştırmalarda tercih edilen biyomateryallerdendir (Cavo et al. 2016; Song et al. 2014). Sentetik ya da doğal hidrofilik polimerlerin, fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanmasıyla elde edilen ağ örgüsü ile tanımlanan yapıya hidrojel denir. Şekil, porosite, yüzey morfolojisi ve boyut gibi özelliklerinin kolay kontrol edilebilir olması açısıyla, ESM yapısının taklit edilmesi ve vaskülarizasyonun sağlanması gibi doku mühendisliğindeki önemli amaçlara hizmet edebilir. Doğal veya sentetik

polimerlerin birlikte kullanılması ile elde edilebilen kompozit hidrojellerin oluşturulması da araştırılan önemli konulardan biridir.

2.3.2. Elektro-Lif Çekimi

Fiberlerden oluşturulmuş biyomateryal iskeleler, fibröz yapıları morfolojik olarak ESM'nin kolajen fiberine benzediği için, doku mühendisliğinde ayrı bir yere sahiptir. Bu bağlamda elektro-lif çekimi ile elde edilmiş fiberler, nano-ölçekli yapılarıyla, boyutsal olarak kolajen fiberlere olan benzerlikleriyle, özellikle öne çıkarlar (Burdick and Mauck 2011). Bu yöntem, kullanılan polimer ve eğirme koşullarına bağlı olarak, yarıçapı mikrometreden, nanometrelere kadar inebilen fiberler, üretebilen etkili bir yöntemdir. Hazırlanan polimer çözeltisinin püskürtüldüğü iğne ve toplayıcı arasında uygulanan yüksek gerilim ile çekerek inceltilmesi esasına dayanır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Elektro-lif çekimi konseptsel gösterimi (Topuz and Uyar 2018)

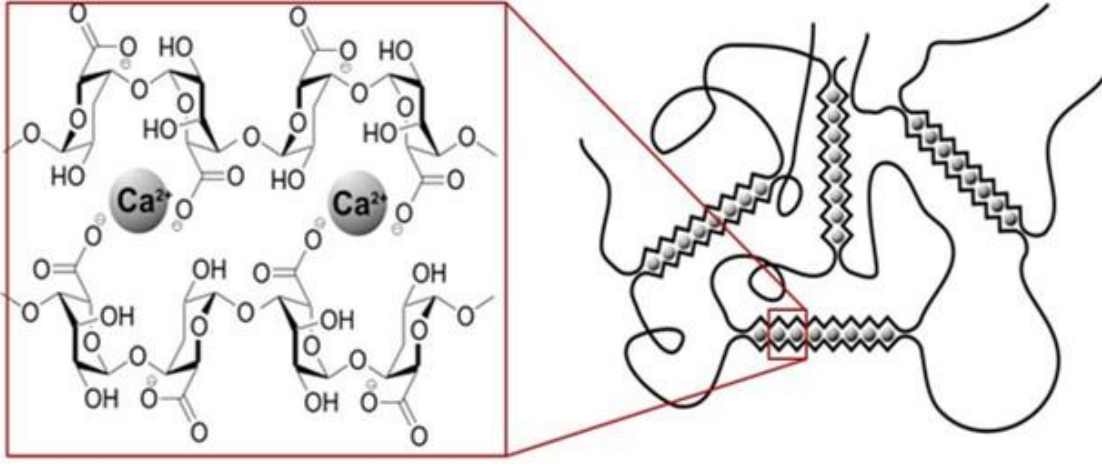
2.4. Doğal biyopolimerler

Doğal polimerler çeşitli canlı kaynaklardan izole edilir; polinükleotid, polipeptid, polisakkarit yapılarında olabilirler (El-Sherbiny and Yacoub 2013). Örneğin, ipek fibrioni ipek böceğinden, kitosan deniz kabuklularından elde edilir, aljinat ise

kahverengi alglerin bir ürünüdür ve bu doğal polimerler doku mühendisliğinde kullanım alanları bulurlar. Doğal malzemeler genellikle, biyoyıkılabilirler; doku gelişimini, onarımını ve çevre doku ile entegrasyonunu desteklerler (Burdick and Mauck 2011). Doğal biyopolimerlerden oluşan ESM'in, gerçek elemanlarının da izolasyonu ve doku mühendisliğinde iskele bileşiminde kullanılması sıklıkla başvurulan yaklaşımlardan biridir. Hyalüronik asit, kondroitin sülfat gibi glikozaminoglikanlar, ESM fiberlerinden kolajenler ve denatüre formu olan, jelatin 3B matris tasarımlarında tercih edilen biyopolimerlerdendir.

2.4.1. Aljinat (Alg)

Aljinat (Alg), kahverengi alglerden (ör. *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*) ve belirli bakterilerden elde edilen doğal, biyoyumlu bir polisakkarittir, 1–4- β -D-mannüronik asit (M) ve α -L-glüküronik asit (G) monomerlerinden oluşan blok yapılarına sahiptir; genellikle kopolimer GG ve MM blokları ve alterne eden MG bloğu olmak üzere üç tip blok yapısını bulundurabilir. Hücre ve protein enkapsülasyon uygulamaları ve doku mühendisliğinde araştırılan matrislerden biridir (Burdick and Mauck 2011). En önemli özelliklerinden biri CaCl_2 çözeltisi gibi divalent iyon (genellikle Ca^{2+}) içeren ortamda, fiziksel çapraz bağlanarak, hidrojel oluşturabilmesidir. G birimleri ile iyonlar arasında gerçekleşen bu çapraz bağlanma şekli yumurta-kutu (*egg-box*) modeli (Şekil 2.6) olarak bilinmektedir (Utech and Boccaccini 2016). Aljinatta çapraz bağlamanın kolaylığının yanında istenildiği zaman şelatör ajanlar ile jelin bozulabilmesi ve hücrelerin izole edilmesi işlemleri de kolay bir şekilde yapılabilir (Caliari and Burdick 2016).



Şekil 2.6. Aljinatın çapraz bağlanması (yumurta-kutu modeli) (Shaari and Kamarudin 2019)

Chavo et. al. meme kanseri hücrelerinin yumuşak matrislerde yüksek canlılık ve çoğalma gösterdiğini göstermiştir, aljinat kullanımının bir başka faydası da matris sertliğinin çapraz bağlamada kullanılan Ca^{2+} iyonu konsantrasyonu değiştirilerek ayarlanabilmesidir (Cavo et al. 2016). Anyonik bir polisakkarit olan aljinat, ESM'nin doğal glikozaminoglikanlarına yapısal olarak benzerlik gösterir, yüksek bir osmotik basınç yakalanmasına, böylece matriste yüksek su miktarı ve iyi besin, atık alışverişi sağlanır (Jeuken et al. 2016; Xu et al. 2014). Jelleşmesi ve çözülmesi fizyolojik koşullarda herhangi bir toksisite göstermeden meydana gelir. Xu ve ekibi, istenen matris sertliğinin hesaplanabilmesi için matematiksel bir model geliştirmiştir. Önceki çalışmalarında da aljinat hidrojelin kanser kök hücresi benzeri hücrelerin çoğaltılması için uygun olduğunu göstermişlerdir. Aljinat kullanılarak tümör mikroortamının hipoksi ve matris sertliği gibi özellikleri taklit edilebileceğini önermişlerdir (Xu et al. 2014).

2.4.2. Jelatin (Jel)

Jelatin (Jel), tıbbi, farmasötik ve yemek sanayisinde geniş kullanım alanları bulan doğal bir polimerdir (Oraby et al. 2013). Hayvan kökenli olup, kolajenin seyreltik bir asit çözeltisi içerisinde denatüre edilmesi ile elde edilir ve polimerleri sarmal polipeptidler halindedir. Sığır ya da domuz derisinden elde edilir. Dolayısıyla tip I

kolajenden elde edilen polipeptidleri içerir ve soğutulunca yapısını oluşturan polipeptidler kısmen, üçlü helikslere renatüre olarak üç boyutlu bir hidrojel ağı oluştururlar (Utech and Boccaccini 2016). Tip I kolajen insan vücudunun en çok bulunan yapısal proteindir (Panzavolta et al. 2011). Jelatin, içerdiği RGD dizilerine (arjinin–glisin–aspartik asit) integrinler aracılığıyla hücre adezyonu sağlar (Zhao et al. 2013).

2.4.3. Hyalüronik Asit (HA)

Hyalüronik asit (HA) sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır ve tekrarlayan D-gluküronik asit ve N-asetil-D-glukozamin disakkarit birimlerinden oluşur. Fetüs ve yeni doğan dokularındaki yüksek bulunma oranı ve yara iyileşmesinde rol oynaması nedenleriyle doku mühendisliği alanında en sık araştırılan GAG'lardan biridir. HA yetişkin memelilerin deri, göbek bağı, eklem sıvısı da dahil olmak üzere neredeyse tüm dokularında bulunan bir ESM elemanıdır (Naahidi et al. 2017). Hyalüronik asit, birçok hücre zarı reseptörleriyle de etkileşebilir. Bu etkileşimler genelde tutunma, göç, çoğalma ve morfogenez gibi hücre davranışları ile sonuçlanır (Celikkin et al. 2017).

HA birçok tümör mikroortamında artış gösterir. Tang ve ekibi, çalışmasında aljinat-hyalüronik asit hidrojel içerisinde 3B tümör sferoidleri oluşturmuş, EMT (epitel mezenkim dönüşümü) ile ilgili belirteçler 3B kültürdeki hücrelerde artış göstermiş, proanjyogenik büyüme faktörleri ve metastaz ile ilgili MMP ekspresyonları artmıştır (Tang et al. 2017).

2.4.4. Kondroitin Sülfat (KS)

Kondroitin Sülfat (KS), sülfatlanmış bir glikozaminoglikandır (GAG) ve genellikle proteoglikanların protein kısmına bağlı olarak bulunur. KS, gluküronik asit ve N-asetilgalaktozaminoglikan birimlerinden meydana geldiğinden galaktozaminoglikan olarak da adlandırılır. ESM'nin ve hücre yüzeylerinin en önemli bileşenlerinden birisidir. Çeşitli sinyal moleküllerinin fonksiyonlarına dahil olduğu ve gelişimsel süreçte önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca, büyüme

faktörlerinin hızlı yıkıma uğramalarını engelleyerek aktif konformasyonlarını korur ve biyoyumlu bir biyopolimerdir (Kwon and Han 2016).

Liu ve ekibi metastaz gelişiminde, kondroitin sülfat sentezinin anormal artış gösterdiği, tümör mikroortamını taklit etmek üzere ALG-KS hidrojel partiküller üretmiştir. Araştırmacılar Ca^{2+} iyonlarının hem aljinat hem de KS zincirlerine aynı anda bağlanarak asimetrik yumurta-kutu modeli adını verdikleri yapıyı oluşturarak çapraz bağlanabildiğini, böylece hibrit bir jel iskelet oluştuğunu bildirmiştir. Jelin mekanik özelliği incelendiğinde yapıya KS eklenmesi ile 3 gün DMEM kültür ortamında bekletildiğinde ALG-KS partiküller ALG partiküllere göre daha fazla Ca^{2+} iyonunu yapısında tutabilmiştir. Çalışılan HCCLM3 karaciğer kanser hücreleri ve SAS dil kanseri hücre canlılıklarının arttığı görülmüştür. Kondroitin sülfat, ayrıca hücrelerin metabolizmasını hızlandırmış ve ALG-KS halinde de daha iyi bir geçirgenlik sergilemiş ve hücrelere madde transferini arttırmıştır. MMP'lerin de gen ekspresyonları bu hidrojellerde artmıştır (Liu et al. 2016).

2.5. Kanser

Kanser, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin deaktivasyonunu takip eden kontrolsüz hücre büyümesidir. Onkogenler, normal koşullarda, hücre çoğalması, farklılaşmasında görevli genlerdir ve proto-onkogen diye adlandırılırlar (Haites 2001). Onkogenlerin ortaya çıkışlarında mutasyonlar, kromozomal translokasyonlar, delesyonlar etkiliyken; proliferasyon ve farklılaşma ile alakalı bu genlerin ekspresyonlarında herhangi bir anomali ve sinyalleşme mekanizmalarındaki bozukluk da kanserin ortaya çıkışında etkili olabilir (Sarkar et al. 2013).

Kanserin, proliferatif sinyali sürdürmek, büyüme baskılayıcı faktörlerden etkilenmemek, invazyon ve metastaz gibi yayılım mekanizmalarını aktifleştirmek, replikatif immortalityyi sağlamak, tümör dokusunda damarlanmayı uyarmak ve hücre ölüm mekanizmalarına karşı dayanıklılık sağlaması gibi özellikleri tanımlanmıştır (Hanahan and Weinberg 2011). Bir kanserin agresifliğine göre, bu

özelliklerden bir ya da birkaçını sağlaması beklenebilir. İnvazif, metastatik kanserler vücutta diğer sistemlere yayılım gösterebilmeleri nedeniyle tedavi süreci en zorlu olan kanser tipleridir. Metastaz süreci, hücre adezyon proteinlerinin aşağı regülasyonunu ve hücre motilitesini arttıran reseptörlerin yukarı regülasyonunu içerir (Sarkar et al. 2013). Böylece kanser hücreleri ortaya çıktıkları dokudan göç ederek, yeni tümörlerin ortaya çıkmasına neden olurlar.

2.5.1. Meme Kanseri

Meme kanseri en sık karşılaşılan kanserlerden ve kadınlarda görülen en yaygın ölümcül hastalıklardan biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre bir kadının hayatı boyunca meme kanserine yakalanma olasılığı %12,3'tür. 2012 yılında dünya çapında kadın hastalarda görülen tüm kanserlerin %25'ine karşı gelen 1,7 milyon yeni olgu tanımlanmıştır (ROJAS and STUCKEY 2016). Ölümlerin çoğu oluşan tümördense, kanserin diğer organlara metastazıyla gerçekleşmektedir. Meme kanseri tümörlerinde bulunan hem tümör içi, hem de tümörler arası heterojenite tanı ve tedavi süreçlerinde önemli bir zorluk olarak ortaya çıkar (Song et al. 2016).

Heterojenitenin sınıflandırılması (Çizelge 2.1), histolojik tipi, tümör derecesine, lenf düğümü durumu ve ER (Östrojen Reseptörü), HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2) gibi reseptörlerin ekspresyonlarına göre yapılı ve bunlara göre tanımlanmış beş ana sınıf bulunmaktadır. Bunlar, bazal, klodin-düşük (*claudin-low*), lüminal A, lüminal B ve HER2 (Çizelge 2.3) tipleridir. Genellikle endokrin cevabı verebilen Lüminal A ve B fenotiplerinden, lüminal A proliferasyonda rol oynayan Ki-67 proteinini düşük bir seviyede eksprese ederken, lüminal B'de ekspresyon yüksektir. Lüminal A kemoterapiye genellikle cevap verebilirken, lüminal B'de bu durum değişkenlik gösterebilir. Lüminal A, HER2 negatif iken Lüminal B pozitifdir. Klodin-düşük fenotipi; Ki-67, E-kaderin, klodin-3,-4,-7, ekspresyonlarını düşük seviyelerde gösterirken, orta seviyede kemoterapi cevabı verebilirler. HER2 fenotipi, yüksek Ki-67 eksprese eder, *trastuzumab* etken maddesi ve kemoterapiye cevap verebilir. Bazal fenotipi ise EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) ve/veya sitokeratin 5/6 pozitif,

endokrin cevabı oluşturmayan genellikle kemoterapiye cevap verebilir (Holliday and Speirs 2011).

Çizelge 2.1. Meme kanseri hücrelerinin sınıflandırılması (Holliday and Speirs 2011)

| Sınıflandırma | İmmünoprofil | Diğer Karakterleri | Örnek Hücre Hatları |
|---------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Lüminal A | ER+, PR+/-, HER2- | Ki-67 düşük, endokrin+, kemoterapi+ | MCF-7, T47D, SUM185 |
| Lüminal B | ER+, PR+/-, HER2+ | Ki-67 yüksek, endokrin+, kemoterapi değişken, HER2+, trastuzumab+ | BT474, ZR-75 |
| Bazal | ER-, PR-, HER2- | EGFR+ ve/veya sitokeratin 5/6+, endokrin-, kemoterapi+ | MDA-MB-468, SUM190 |
| Klodin-Düşük | ER-, PR-, HER2- | Ki-67, E-kaderin, Klaudin-3, -4, -7, düşük, kemoterapi orta | BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315 |
| HER2 | ER-, PR-, HER2+ | Ki-67 yüksek, trastuzumab+, kemoterapi+ | SKBR3, MDA-MB-453 |

Bazal fenotipi, ER, PR (Progesteron Reseptörü) ve HER2 ekspresyonlarının olmadığını belirtmek için kullanılabilir ve üçlü negatif diye de adlandırılabilir. Bazal ve üçlü fenotipler arasında benzerlikler bulunsa da bu terimler tam anlamıyla aynı durumu ifade etmeyebilirler, birbirlerinin yerine kullanıldıkları çalışmalar bulunmaktadır. Bazal fenotip, daha çok, immünohistokimyasal analizlere göre ekspresyonun olmadığı durumu ifade eder iken, üçlü negatif *microarray* analizleri sonucuna göre ekspresyonun olmadığı durumunu belirtir. Üçlü negatif meme kanserleri, ve bazal kanserler için henüz, birleştirici bir tanımlama yapılamamaktadır (Badve et al. 2010). Üçlü negatif meme kanserinin, klinikte seyrini takip etmesi zordur ve genellikle metastatik tümörler oluştururlar (Clementz et al. 2011).

Her alt gurubun farklı tedavi yaklaşımları, tedavilere farklı cevapları ve farklı hücre hattı modelleri bulunmaktadır (Çizelge 2.1). Meme kanser fenotiplerinin sınıflandırılması araştırma süreci ve klinikte yardımcı olsa da tümör içi heterojenite bundan fazladır ve birçok fenotipi birlikte bulundurabilirler. Bu anlamda oluşturulacak meme kanseri modellerinde farklı fenotiplerden hücre hatlarının birlikte ko-kültür edilmesi önerilmiştir (Holliday and Speirs 2011). Östrojen, progesteron, insan epidermal büyüme faktörü reseptörlerine karşı ajanların keşfedilmesi ve tedavide kullanılmasıyla etkili tedavilerin gelişmesine rağmen bu yollardan ideal şekilde faydalanılması ve kaçınılmaz olan ilaç dayanıklılığına sahip tümörlerin engellenmesi, klinikte önemli sorunlar olarak yer almaktadır (Stopeck et al. 2012).

2.5.2. Noç Hücre Sinyalleşmesi

Normal doku kararlı iç dengesinin sağlanmasında, hücre bölünmesi ve ölümü önemli fizyolojik olaylardır. Döngünün bozulması kanserin ortaya çıkmasına neden olur. Bu döngüde ve ilgili sinyal yollarında rol oynayan her gen, olası bir onkogendir ve ekspresyon durumları hem bir kanser belirteci, hem de olası bir tedavi hedefi olabilir.

Sağlıklı bir dokunun hücrelerinin, hücre döngüsünde, DNA hasarı, çeşitli kontrol mekanizmaları ile takip altındadır. Bu mekanizmalar, DNA bütünlüğünü kontrol eder, hücre döngüsünün devam etmesini sağlar, gerekirse onarım ya da apoptoz yollarının aktivasyonunu sağlar. Hücre döngüsünde oluşan uygunsuzluklar, kanser gelişimine neden olur. Kanserde kontrolsüz hücre bölünmesi, hücre döngüsünün farklı düzeylerinde rol oynayan proteinlerden kaynaklı olabilir; CDK (Sikline Bağlı Kinaz), siklin, CDKI (Sikline Bağlı Kinaz İnhibitörü) CDK substrat. Kontrol noktalarında oluşan defektler de mutasyonlara, kromozom hasarlarına ve/veya aneuploidiye yol açarak tümör oluşumuna neden olur.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Malzemeler ve Hücre Hattı

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Asetik asit, DMSO, fetal bovin serumu, glukoz, hyalüronik asit sodyum tuzu, kalsiyum klorür (CaCl_2), kondroitin sülfat A sodyum tuzu, L-glutamin Çözeltisi, MTT, penisilin-streptomisin, sodyum aljinat, tripsin-EDTA, yüksek glukozlu, Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı, γ -Sekretaz inhibitörü ($\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5$), Sigma-Aldrich; T-25 (25cm^2 'lik) kültür kapları, hücre dondurma tüpleri, 96'lık ve 24'lük mikrolakalar Corning; T-75 (75cm^2 'lik) kültür kapları, 14ml ve 50ml steril tüpler İsolab; jelatin tip B ise Fisher Scientific marka kullanılmıştır.

3.1.2. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattı

MDA-MB-231 epitelyal adenokarsinomdur. ER–, PR–, HER2– ekspresyonlarının üçünü de bulundurmadığından üçlü negatif diye de adlandırılabilir. Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü ile ilgili prosedürler bu bölümde verilmiştir. EuroClone Aura B4 laminer akışlı mikrobiyolojik güvenlik kabini ile steril çalışma koşulları sağlanmış, inkübasyonlar, Sanyo MCO-18AC (UV) inkübatörde yapılmıştır. Nüve NF 800, çok amaçlı tezgâh üstü santrifüj ile hücre çöktürme ve yıkamaları yapılmıştır. Mikroskopik incelemeler ve hücre sayımları Olympus CKX53 invert mikroskopta yapılmıştır.

3.2.1. Kültür Ortamının Hazırlanması ve İnkübasyon Koşulları

Yüksek glukozlu, Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamına, %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin eklenerek stok hazırlanmış, yapılacak

çalışmalar için 50mL'lik tüplere bölünmüştür ve +4 °C'de saklanmıştır. Aksi söylenmediği takdirde, tüm kültür çalışmaları bu ortam kullanılarak yapılmıştır.

Tezdeki bütün kültürler 37 °C , %5 CO₂ , %95 nemli inkübatör ortamında kültürlenmiştir. Hücreler, günlük rutin mikroskopik kontrollerden geçirilmiş, olası kontaminasyon, ortamın asitliği, bulanıklığı görsel olarak takip edilmiştir.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre doluluk oranları (*confluency*), rutin mikroskopilerle kontrol edilir gerekliyse medyum eklenerek beslenir. Kültürlerin genellikle üçüncü günlerinde pasajlamaları yapılmıştır. Prosedürde kullanılacak, PBS, tripsin-EDTA, ve kültür ortamı 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda önceden ısıtılmıştır.

Eski ortam pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırılır. Kültür ortamında bulunan serumun tripsin-EDTA'yı inhibe etmemesi ve metabolik atıkların ve olası ölü hücrelerin uzaklaştırılması için PBS yıkaması (2ml) yapılır. 2ml Tripsin eklenerek etüvde 5-10dk inkübe edilir. Hücrelerin yüzer hale gelip gelmediği, mikroskop altında belirli aralıklarla, kontrol edilir, tripsinin olası toksik etkilerinin engellenmesi için bu adım kısa tutulmaya çalışılır. Hücreler yüzer hale gelmiş ise pipet yardımıyla, steril bir 25ml'lik tüpe alınır, üzerine 4-5ml ortam eklenir. 1200 devir de 3dk süreyle, santrifüj edilerek, hücreler çöktürülür. Süpernatant uzaklaştırılır ve yeni ortam eklenir. Hafif bir pipetleme ile hücreler dağıtıldıktan sonra, yeni kültür kaplarına bölünürler, yeni ortam ile beslenerek, toplam ortam 3ml'ye tamamlanır.

Kültürler ihtiyaca dayalı olarak T-25 ya da T-75 kültür kaplarında yapılmıştır. Bu bölümdeki metod T-25 kap üzerinden verilmiştir. T-75'de kullanılan PBS, tripsin-EDTA ve yeni ortamın miktarları 3 katına çıkartılır.

3.2.3. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Kültürde kullanılan ortamın %30'u DMSO olacak şekilde, hücre dondurma ortamı hazırlanır. Hücrelerin pasajlanması bölümünde anlatıldığı şekilde hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp santrifüj ile çöktürüldükten sonra ek olarak bir PBS yıkaması yapılır. Bu adımda süpernatant atılır ve 4-5ml PBS içerisinde pelet çözülür ve 1200 devir 3dk olarak aynı şekilde çöktürülür. Pelet önceden hazırlanmış, dondurma ortamında hafifçe pipetlenerek çözülür ve hücre dondurma tüplerine bölünür ve buzda bekletilir. Tüpler üzerine ilgili etiketlemeler yapıldıktan sonra üzerine, ani soğumayı engellemek ve buz kristallerinin oluşumunu engellemek için havlu kâğıt sarılır ve dondurma işlemi +4°C, -20 °C, -80 °C olmak üzere kademeli olarak yapılır.

Diğer çalışmalarda kullanılmak üzere öncelikle hücreler çoğaltılmış ve dondurularak sıvı azotta bir hücre stoğu yapılmıştır.

3.3. Üç Boyutlu Matrislerin Hazırlanması

Karakterizasyon ve 3B hücre kültürlerinde kullanılan matrislerin hazırlanışı bu bölümde açıklanmıştır.

3.3.1. Elektro-Lif Çekimi

Jelatin-kondroitin (JelKS) sülfat kompoziti nano fiberler elde etmek için, hazırlanan %25 (v/v) asetik asit su çözeltisinde %30 jelatin, %10 kondroitin sülfat çözülerek eğirme öncülü hazırlanmıştır. Eğirme işlemi, 6,5cm iğne-toplayıcı uzaklığı, 3,4ml/h çözelti püskürme hızı ve 18kV gerilim ile TOBB Üniversitesi Biyomedikal Mühendislik Bölümünde yapılmıştır.

3.3.2. Elektro-Eğirilmiş Matların Sterilizasyonu

Hazırlanan nanofiberlerin 3B kültürde kullanılmak üzere sterilizasyonu bir gerekliliktir. Öncelikle sterilizasyon prosedüründe kullanılmak üzere %85, %75 etil alkol ve %2 penisilin-streptomisin çözeltileri steril ultrapür su içerisinde hazırlanır.

Hazırlanmış matlar bisturi yardımıyla 5mm²'lik boyutlarda kesilerek, 96'lık kültür kaplarının kuyularına yerleştirilir. Sırası ile 15dk %85, 15dk ise %70 alkolde bekletilir. Alkol adımının ardından antibiyotikli steril su ile 3 yıkama yapılır ve son olarak UV altında antibiyotikli su içerisinde bir gece bekletilir. Prosedür steril koşullarda laminer akışlı mikrobiyolojik güvenlik kabini içerisinde uygulanmıştır.

3.3.3. Kompozit Matrislerin Hazırlanması

Çalışma içerisinde karakterizasyon ve 3B kültür bölümlerinde kullanılmak üzere çeşitli bileşimlerde 3B matrisler hazırlanmıştır. Bu matrislerin bileşimleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma içerisinde hazırlanan tüm matrisler

| 3B Matrisler | Aljinat | Jelatin | Hyalüronik Asit | Kondroitin Sülfat | Nano Fiber (JeIKS) | Glukoz |
|--------------|---------|---------|-----------------|-------------------|--------------------|--------|
| 1. A | X | | | | | |
| 2. AG | X | | | | | X |
| 3. AH | X | | X | | | |
| 4. AFG | X | | | | X | X |
| 5. AHF | X | | X | | X | |
| 6. AHG | X | | X | | | X |
| 7. AHFG | X | | X | | X | X |
| 8. AJHK | X | X | X | X | | |

Matrisleri oluşturmak için aljinat tabanlı jel öncülleri Çizelge 3.2'te verilen oranlarda hazırlanmıştır. Bu adımda, 37 °C sıcaklığa ayarlanmış manyetik karıştırıcıda doğal polimerler tozları ve örneğe göre glukoz saf suda çözülmüştür. Fiziksel çapraz bağlamada kullanılacak CaCl₂ çözeltisi ise konsantrasyonu 0,1M olacak şekilde saf suda hazırlanmıştır. Kültürde kullanılacak jel öncülleri ve CaCl₂ çözeltisi otoklavlanarak, steril hale getirilmiştir. Jel öncülleri fiberlerin üstüne eklenmiş (100µl) ve CaCl₂ çözeltisi ile fiziksel çapraz bağlama yapılarak jelleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Aljinat tabanlı jel öncüllerinin içerikleri

| | <i>Aljinat</i> | <i>Jelatin</i> | <i>Hyalüronik Asit</i> | <i>Kondroitin Sülfat</i> | <i>Glukoz</i> |
|----------------------|----------------|----------------|------------------------|--------------------------|---------------|
| <i>Konsantrasyon</i> | %2 (w/v) | 0.75mg/ml | 5mg/ml | 0.25mg/ml | 2mg/ml |

Karakterize edilecek örnekler saf su ile 3 kere yıkanmıştır. Glukozlu örneklerin yapılarındaki glukozun uzaklaştırılması için bir gece saf suda bırakılmıştır. Örnekler bir gece kurumaya bırakılmıştır.

Hücre kültüründe kullanılacak örneklerin hazırlanması, laminer akışlı mikrobiyolojik güvenlik kabini içerisinde, steril koşullarda yapılmış ve önceden sterilize edilen fiberler kullanılmıştır. Steril CaCl₂ çözeltisi ile yapılan çapraz bağlamanın ardından, örnekler saf su ile 3 kere yıkanmış, bir gece saf suda bırakılmıştır ve ardından matrislere hücre ekimleri yapılmıştır.

3.4. Boyutlu Matrislerin Karakterizasyonu

Matrislerin yüzey görüntüleme ve kimyasal analizleri, SEM (taramalı elektron mikroskopisi) ve FTIR (*Fourier* Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) yöntemleriyle yapılmıştır. Karakterizasyonlar Orta Doğu Üniversitesi merkez laboratuvarında, hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

3.4.1. SEM: Taramalı Elektron mikroskopisi

Mikroskopi için hazırlanan matrisler, dış laboratuvardan tarafımıza verilen randevu dahilinde incelenmiş ve fotoğraflanmıştır. Öncelikle Çizelge 3.3'te verilen kurutulmuş matrisler ve tek başına nanofiber mat bu bölümde incelenmiştir.

Çizelge 3.3. SEM Analizlerinde incelenen matrisler

| 3B Matrisler | Aljinat | Jelatin | Hyalüronik Asit | Kondroitin Sülfat | Nano Fiber (JelKS) | Glukoz |
|--------------|---------|---------|-----------------|-------------------|--------------------|--------|
| 1. A | X | | | | | |
| 2. AG | X | | | | | X |
| 3. AHF | X | | X | | X | |
| 4. AHFG | X | | X | | X | X |
| 5. AJHK | X | X | X | X | | |
| 6. F (JelKS) | | | | | X | |

İncelenecek malzemeler yapışkan bakır bant ile elektron mikroskopu stablarına yapıştırılmış ve vakum içerisinde altın kaplama yapılmıştır. İncelemeler QUANTA 400F yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskopunda yapılmış, örnekler 250x, 5000x, 10.000x ve 20.000x büyütme ile fotoğraflanmıştır. Nanofiber çapları yazılım ile ölçülmüştür.

3.4.2. FTIR: *Fourier* Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Çalışmanın bu kısmı için hazırlanan sadece aljinat (A), aljinat-hyalüronik asit (AH) ve aljinat-hyalüronik asit-nano fiber (AHF) bileşimli 3B matrislerin FTIR (Çizelge 3.4) analizleri IFS 66v/S vakum FT-IR cihazı ile kurumun prosedürlerince yapılmış, veri formatında tarafımıza raporlanmıştır. Grafikleme Microsoft Excel programında yapılmıştır.

Çizelge 3.4. FTIR Analizlerinde incelenen matrisler

| 3B Matrisler | Aljinat | Hyalüronik Asit | Nano Fiber (JelKS) |
|--------------|---------|-----------------|--------------------|
| 1. A | X | | |
| 2. AH | X | X | |
| 3. AHF | X | X | X |

3.5. Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Tek katmanlı 2B kültürde hücreler pasajlanarak çoğaltılmıştır. Tripsin-EDTA ile kültür kabı yüzeyinden kaldırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Hemasitometre ile hücre sayımı yapılmış, her matris tipinden (Çizelge 3.5) dört örnek ve bir dördü de kontrol (2B) olacak şekilde 96'lık kültür kaplarının kuyularına toplam 10.000 hücre olmak üzere ekimle yapılmıştır.

Çizelge 3.5. Üç boyutlu kültürlerde kullanılan matrisler

| 3B Matrisler | Aljinat | Hyalüronik Asit | Nano Fiber (JelKS) | Glukoz |
|--------------|---------|-----------------|--------------------|--------|
| 1. AHG | X | X | | X |
| 2. AFG | X | | X | X |
| 3. AHF | X | X | X | |
| 4. AHFG | X | X | X | X |

Deneyle üç günlük planlanmış ve her günün MTT okuması için γ -sekretaz inhibitörünü eklememek ya da eklenmek üzere, ayrı iki kültür kabı (ilk gün hariç), her gün için hazırlanmıştır. γ -Sekretaz İnhibitörü (C26H41N3O5) bir kültür günü geçirmiş hücrelere, toplam kültür ortamlarındaki konsantrasyonu 50 μ M olacak şekilde hesaplanmış ve ortam içerisinde çözülmüş halde verilmiştir.

3.6. Hücre Çoğalmasının MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) Yöntemi ile İncelenmesi

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür), PBS içerisinde konsantrasyonu 5mg/ml olmak üzere çözülmüş ve 0.22 μ m şırınga filtresinden geçirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Kullanılmak üzere 15ml folyo sarılmış tüplerde, -20°C'de saklanmıştır.

Birinci, ikinci ve üçüncü kültür günlerinin ardından, matrislerin içinde bulunduğu ortam atılır. PBS yıkaması yapılmış ve her kuyuya 50 μ l MTT eklenmiştir. Bir saat MTT ile yapılan inkübasyonun ardından MTT uzaklaştırılmış, kuyulara 200 μ l

DMSO eklenmiştir. Okumalar için yeni bir 96'lık kaba, her örnek için 100µl'den ikişer örnek alınmıştır. Okumalar 570nm absorbands okumasına ayarlanmış, Molecular Devices marka SpectraMax m2 model mikropłaka okuyucusunda yapılmıştır.

3.6.1. İstatistik Analizler

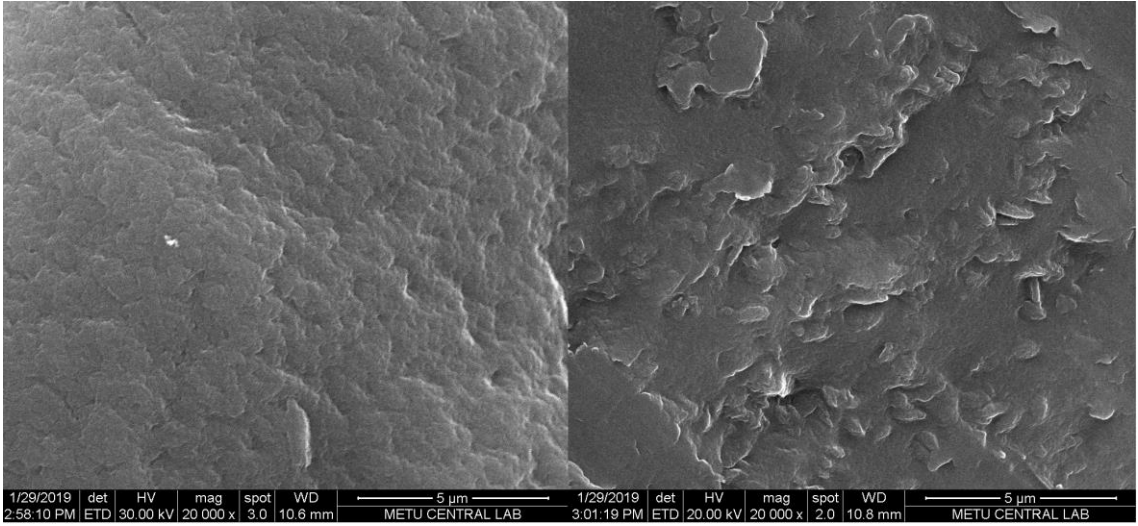
İstatistik analizler Minitab programı kullanılarak yapılmıştır. Genel regresyon modeli oluşturulmuştur. Tukey ikili kıyaslamaları yapılarak istatistiksel anlamlılık gösterilmiştir ve 2B kültürlerde inhibitör etkisi, 2-örnek t-testi ile analiz edilmiştir. Test sonuçları ve tüm grupların ortalamaları EK-1 içerisinde verilmiştir.

4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Üç boyutlu matrislerin özellikleri

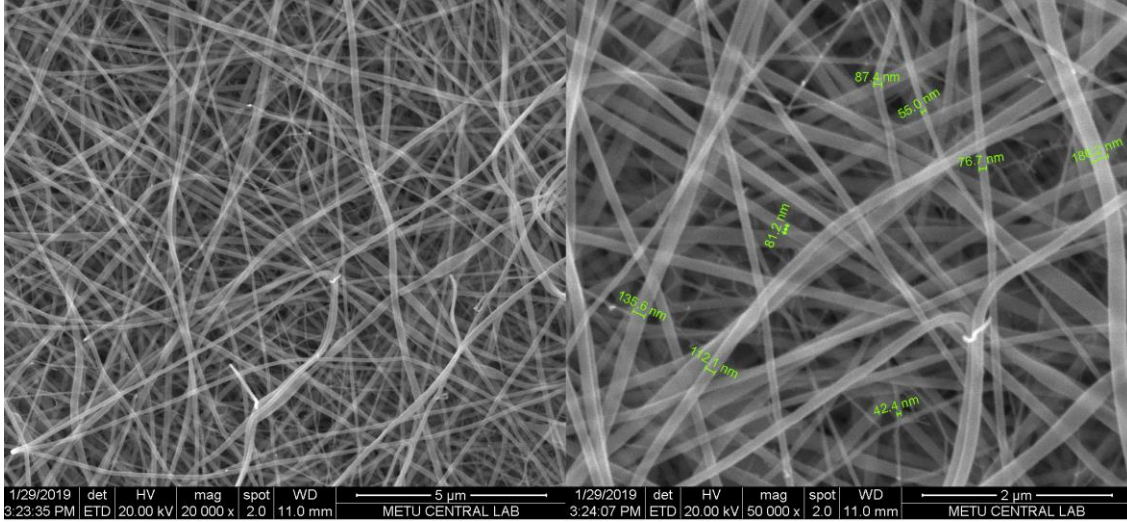
4.1.1. Matris Yüzeyinin Görüntüsü

Aljinat hidrojel üniform ve düz bir morfoloji sergilemiştir. 20.000 büyütme de dahi por yapılarına rastlanmamıştır. Aljinat-glukoz hidrojellerde ise girintili çıkıntılı bir yüzey ve por yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.1).



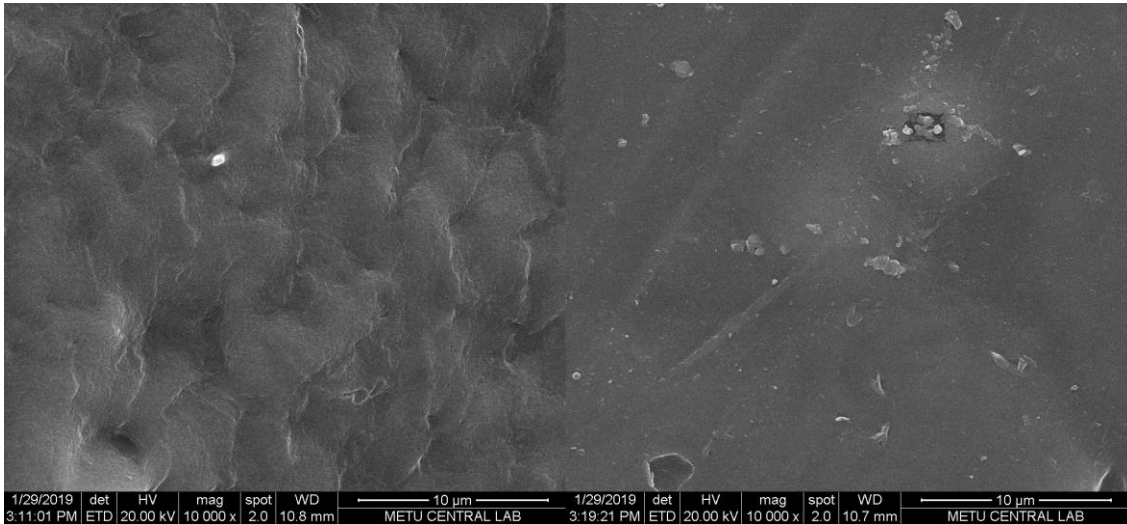
Şekil 4.1. Aljinat ve aljinat-glukoz hidrojellerin SEM görüntüsü, 20.000x

Elektro-lif çekimi ile elde edilmiş jelatin-kondroitin sülfat (JeKS) fiberlerin (Şekil 4.2), nanometrik skalada, devamlı ve düzgün oldukları gözlenmiştir. Ortalama fiber çapı 98,7nm'dir. Nanofiberlerin hidrojel içerisine gömülmesi ile kompozit matrisler elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Jelatin-kondroitin sülfat nanofiberlerin SEM görüntüsü 20.000x, 50.000x, yazılımla yapılan çap ölçümleri sağdaki şekilde belirtilmiştir.

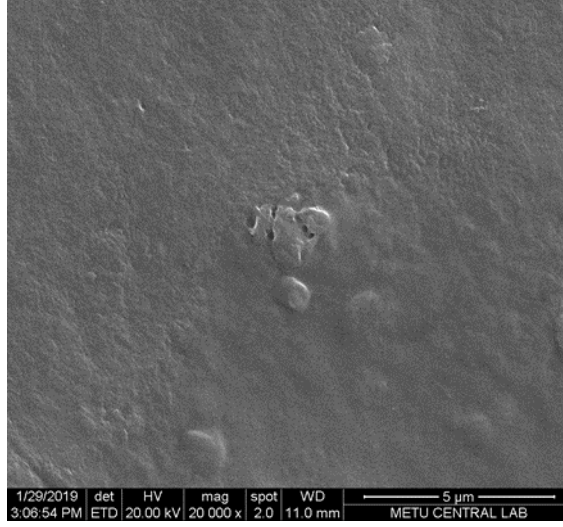
Aljinat-hyalüronik asit kompozitlerinin glukozlu ve glukozsuz halleri (Şekil 4.3) arasında önemli yüzey farklılıkları görülmüştür. Glukozsuz örnekte yüzey üniform ve düz iken, glukozlu örnek girintili çıkıntılı ve porlu bir yüzey özelliğine sahiptir.



Şekil 4.3. Aljinat-hyalüronik asit nanofiber kompozitlerinin glukozlu ve glukozsuz hallerinin SEM görüntüleri, 10.000X

Aljinat- Hyalüronik asit- nanofiber mat örneği, jelatin ve kondroitin sülfatın jel öncülünde çözülerek oluşturulduğu Aljinat-Hyalüronik asit-jelatin-kondroitin sülfat

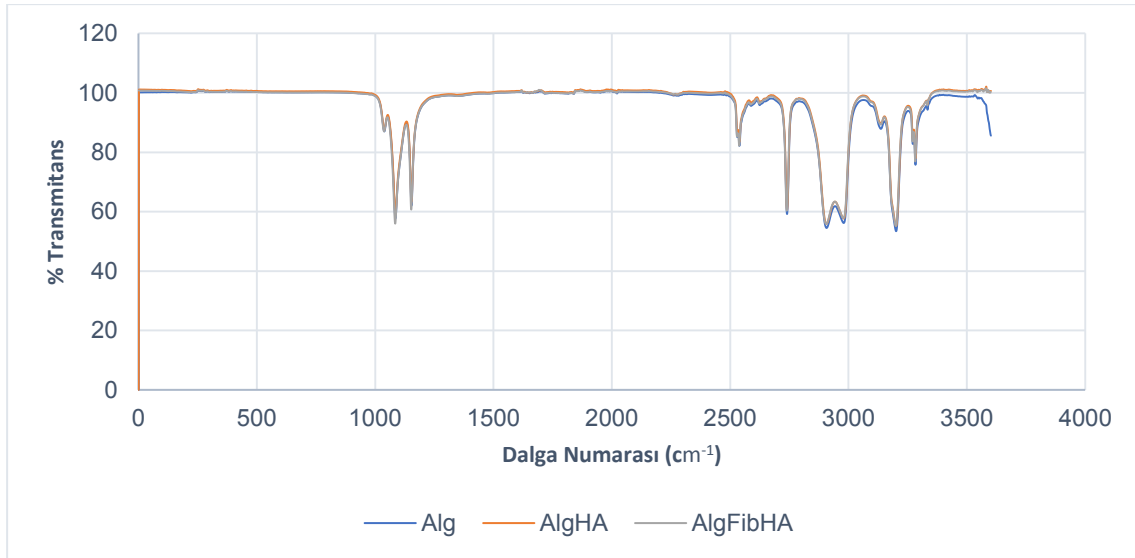
grubuyla (Şekil 4.4) yüzey özelliği açısından benzerlik göstermiştir ve görünümde fiberlerden kaynaklı bir değişim görülmemiştir.



Şekil 4.4. Aljinat-hyalüronik asit-jelatin-kondroitin sülfat, fiber içermeyen 3B matrisin SEM görüntüsü, 20.000X

4.1.2. Matris yüzeyinin kimyasal yapısı

İncelenen üç matrisinde, FTIR analizi (Şekil 4.5) sonucunda, yüzeyleri benzer bir kimyasal yapı göstermiştir.



Şekil 4.5. Aljinat, aljinat-hyalüronik asit, aljinat-hyalüronik asit-fiber gruplarının FTIR analizi

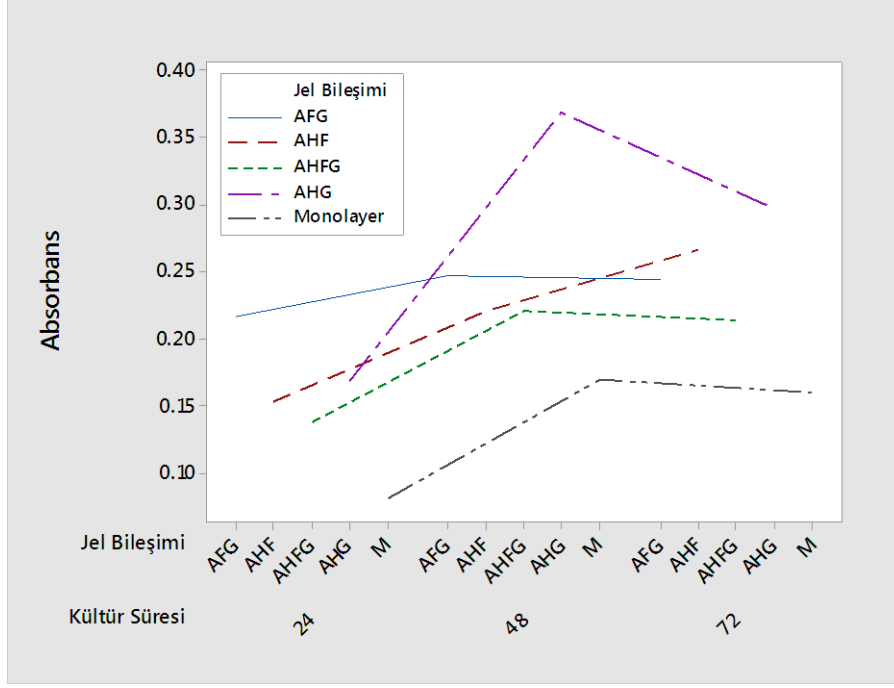
4.2. Matriste Meme Kanseri Hücrelerinin Çoğalması

Sonuçlar verilirken, Çizelge 4.1’de verilen kısaltmalar ile örneklerden bahsedilmiştir.

Çizelge 4.1. 3B Kültürlerde kullanılan matrislerin kısaltma ve içerikleri

| 3B Matrisler | Aljinat | Hyalüronik Asit | Nano Fiber (JelKS) | Glukoz |
|--------------|---------|-----------------|--------------------|--------|
| 1. AHG | X | X | | X |
| 2. AFG | X | | X | X |
| 3. AHF | X | X | X | |
| 4. AHFG | X | X | X | X |

Hücre çoğalması tüm gruplarda tipik S tipi büyüme şeklindedir (Şekil 4.6), 48 saatin sonunda hücre sayısı gruplarda platoya ulaşmıştır. 48 saat sonunda 2B hücre kültürüne göre %116,83 daha fazla hücre miktarı ile tüm gruplar arasında maksimum değere ulaşan AHG grubunda hücre sayısı 72’nci saatin sonunda %19,42 oranında azalış göstermiştir. 3B matrislerde yapılan kültürlerde hücre çoğalması, 2B kültürüne göre genel olarak fazla olmuştur. 2B kültürüne göre matrislerde hücre sayısının yüzde olarak artış miktarları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

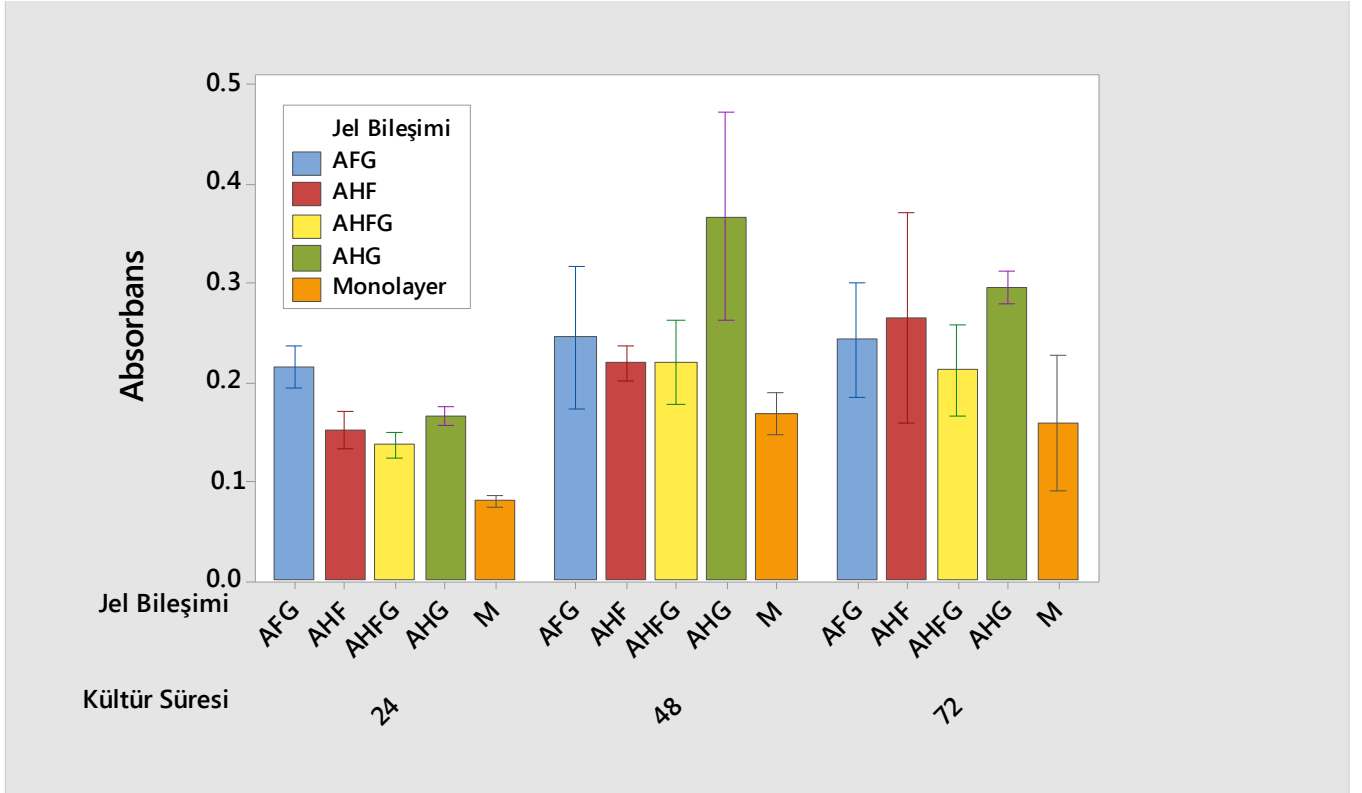


Şekil 4.6. 3B Matris ve 2B kültürlerde hücrelerin büyüme eğrileri

Tekkatmanlı kültürlerle göre hücre sayısının 3B matrislerde hücre çoğalmasının % artış miktarları (Çizelge 4.2) de verilmiştir. 24 saatin sonunda 2B kültüre oranla en fazla hücre sayısı artışı AFG jellerde %168,02'dir. 48 saatin sonunda ise AHG gurubunda %116,84'tür. 72 saatin sonunda ise %86,34 artış ile AHG jeller en iyi performansı sunmuştur. Matris çeşitleri ve 2B kültürlerde hücre çoğalması standart sapmalar ile bar grafiği olarak da gösterilmiştir (Şekil 4.7).

Çizelge 4.2. 2B Kültürlere göre 3B matrislerde hücre sayısının yüzde olarak artış miktarları

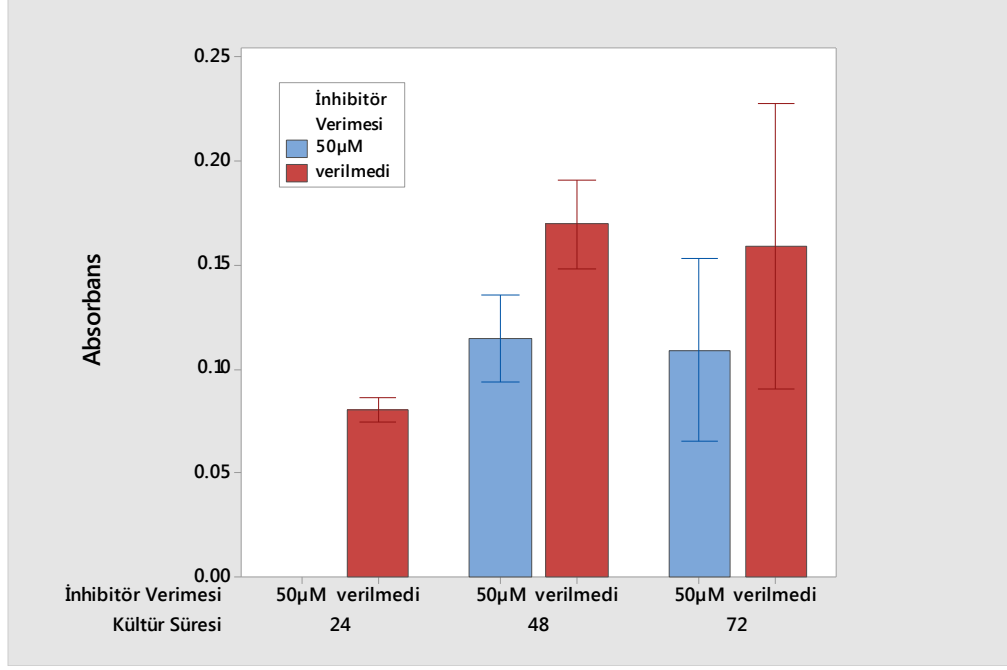
| | AHF | AFG | AHFG | AHG |
|---------|--------|---------|--------|---------|
| 24 Saat | %88,25 | %168,02 | %69,84 | %107,20 |
| 48 Saat | %29,42 | %44,90 | %30,16 | %116,84 |
| 72 Saat | %67,17 | %53,21 | %42,95 | %86,34 |



Şekil 4.7. 3B Matris ve 2B kültürlerde hücre çoğalmasının standart sapmalar ile gösterimi

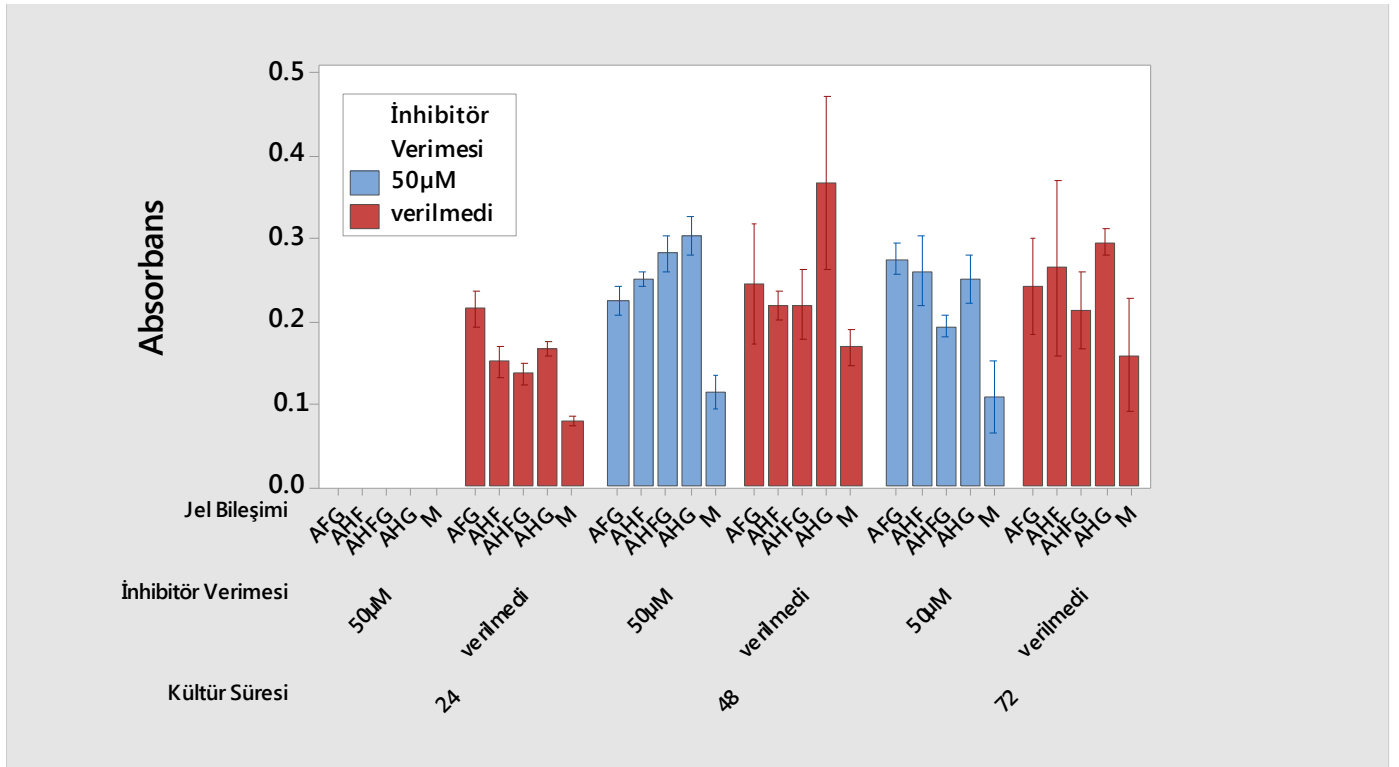
4.2.1. γ -Sekretaz İnhibitörünün kültürlerde hücre çoğalmasına Etkisi

24 saatin sonunda hücrelere toplam medyumda 50 μ M olacak şekilde, inhibitör eklenmiştir. İnhibitör en iyi etkiyi verilmesinden sonra 24 ve 48'inci saatlerde sırası ile %32,39 ve saatte %31,29 olmak üzere 2B kültürlerde göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 2B kültürlerde γ -sekretaz inhibitörlü ve inhibitörsüz hücre çoğalmasının standart sapmalar ile gösterimi, 48 ve 72'nci saatler inhibitör verildikten sonraki 24 ve 48'inci saatlerdir.

Yüzde inhibisyonu oranları Çizelge 4.3'te verilmiş, verilen negatif değerler, inhibitörlü gruplarda hücre çoğalmasının fazla olduğunu ifade etmektedir. Üç boyutlu matrislerde yapılan kültürlerin γ -Sekretaz İnhibitöründen etkilenme oranları iki boyutlu matrislere göre daha düşüktür. Üç boyutlu matrislerde en fazla inhibisyon yine hücre çoğalmasının en fazla olduğu nanofiber içermeyen AHG matrislerde görülmüştür.



Şekil 4.9. γ -Sekretaz inhibitörünün, 3B ve 2B sistemlerde, hücre çoğalmasına etkisinin standart sapmalar ile gösterimi

Çizelge 4.3. 3B Matrisler ve 2B kültürde yüzde çoğalma inhibisyon oranları, negatif değerler, inhibitörlü gruplarda hücre çoğalmasının fazla olduğunu ifade etmektedir.

| | 48'inci saat | 72'nci saat |
|----------------|--------------|-------------|
| AHF | %-14,88 | %1,88 |
| AFG | %7,955 | %-13,10 |
| AHFG | %-2,47 | %8,92 |
| AHG | %17,56 | %14,81 |
| 2B (Monolayer) | %32,39 | %31,29 |

5. YORUM

Bu tez çerçevesinde, toplumda kadınlarda oldukça yaygın olarak görülen ve ölümcül patolojisi olan meme kanseri için üç boyutlu bir *in vitro* model oluşturmak ve oluşturulan modelde bir ilaç hedefi olan Noç reseptörün inhibisyonu hedeflenmiştir. Bunun için, tümör dokusu ekstraselüler matrisi taklit etmek amacıyla glikozaminoglikanlardan (GAG) kondroitin sülfat ve hyalüronik asidi bileşiminde içeren hidrojel-nanofiber kompoziti aljinat tabanlı matrisler tasarlanmıştır ve glukoz kullanılarak oluşturulan yapıya porosite kazandırılmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı oluşturulan 3B matrislerde üretilmiştir. Çalışmaların sonuçları ve literatüre olası katkıları aşağıda sıralı olarak belirtilmiştir.

1. Üç boyutlu kültürlerde iki boyutlu kültüre göre meme kanseri hücreleri daha çok çoğalmıştır. Dolayısıyla, kanser hücrelerinin gerçek ESM'ine benzer bir ortamda 2B *in vitro* deney koşullarındakinden daha fazla çoğaldığı saptanmıştır. Tümör çevresi incelemeleri ile ilgili literatüre destekleyici yönde katkı sağlanmıştır.
2. Oluşturulan matrislerden glukoz ile porlu yapı kazandırılmış olanlarda en yüksek hücre çoğalması gözlenmiştir. Bu yöntem ile 3B matrislere, pratik bir şekilde, hücre çoğalmasını destekleyici morfolojiler kazandırılabilir.
3. Noç reseptör inhibisyonunun hücre çoğalması üzerindeki etkisi tüm deney gruplarında gösterilmiştir.
4. İnhibitör etkisinin en fazla 2B kültürde (%32) görülmüştür, bu durum 2B kültürün gerçek koşulları yansıtmadığı fikrini desteklemiştir.
5. Jelatininin sahip olduğu biyoaktif RGD (arjinin–glisin–aspartik asit) dizilerinin hücre yüzeyindeki integrinlerle etkileşerek hücre tutunmasında etkili olduğu düşünülmüştür.
6. Doğal ekstraselüler matris (ESM) bileşeni olan ve metastazda matriste miktarı artış gösteren kondroitin sülfat ve hyalüronik asit matrisin jel bileşenine eklenmesiyle gerçek tümör ortamına benzerlik kazandırılmıştır.

7. Oluşturulan üç boyutlu matrislerin yüzey özellikleri SEM ile incelendiğinde glukoz ile por oluşturmanın etkin olduğu saptanmıştır.
8. Elektro-eğirilmiş jelatin-kondroitin sülfat kompozit fiberlerin aljinat jel içinde tutuklanması özgün olup hücre iskelesi oluşturma ile ilgili literatüre katkıda bulunmuştur.
9. Ekstraselüler matris benzeri yapı oluşturma çalışmalarına hem porlu hidrojel yapısı, hem de kolajen biyomimetik yapı olarak denatüre kolajen olan jelatini ve elektro-lif çekimi ile oluşturulan nanofiberlerin beraber kullanılmış olması ile literatüre katkıda bulunmuştur.
10. İlaç tarama ve dozlama araştırmalarına literatürde katkı sağlanmış ve bu konuda yapılacak çalışmalarda kullanılabilir matris yapıları geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Andersen, T., Auk-Emblem, P., Dornish, M., 2015. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays* 4(2), 133-161.
- Anonim, 2017. What We've Learned From Nuedexta Clinical Trials. What We've Learned From Nuedexta Clinical Trials. Congaree Pharmacy, <https://www.congareepharmacy.com/tag/nuedexta-clinical-trials/>. (Erişim tarihi: 11 Mayıs 2019)
- Asimakopoulou, A.P., Theocharis, A.D., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., 2008. The biological role of chondroitin sulfate in cancer and chondroitin-based anticancer agents. *In vivo* 22(3), 385-389.
- Badve, S., Dabbs, D.J., Schnitt, S.J., Baehner, F.L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., Palacios, J., Rakha, E.A., Richardson, A.L., Schmitt, F.C., Tan, P.-H., Tse, G.M., Weigelt, B., Ellis, I.O., Reis-Filho, J.S., 2010. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology* 24, 157.
- Burdick, J.A., Mauck, R.L., 2011. *Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Review of the Past and Future Trends*. Springer Vienna.
- Caddeo, S., Boffito, M., Sartori, S., 2017. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 5(40).
- Caliari, S.R., Burdick, J.A., 2016. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature methods* 13(5), 405-414.
- Castells-Sala, C., Alemany-Ribes, M., Fernández-Muiños, T., Recha, L., López-Chicón, P., Aloy-Reverté, C., Caballero-Camino, J., Márquez-Gil, A., Semino, C., 2013. Current applications in Tissue Engineering.
- Cavo, M., Fato, M., Peñuela, L., Beltrame, F., Raiteri, R., Scaglione, S., 2016. Microenvironment complexity and matrix stiffness regulate breast cancer cell activity in a 3D in vitro model. *Scientific Reports* 6, 35367.
- Celikkin, N., Rinoldi, C., Costantini, M., Trombetta, M., Rainer, A., Swieszkowski, W., 2017. Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. Appl.* 78, 1277-1299.
- Clementz, A.G., Rogowski, A., Pandya, K., Miele, L., Osipo, C., 2011. NOTCH-1 and NOTCH-4 are novel gene targets of PEA3 in breast cancer: novel therapeutic implications. *Breast Cancer Research* 13(3), R63.

- Council, N.R., 2010. The Prevention and Treatment of Missing Data in Clinical Trials. The National Academies Press, Washington, DC.
- Fong, E.L.S., Harrington, D.A., Farach-Carson, M.C., Yu, H., 2016. Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. *Biomaterials* 108, 197-213.
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 2012. Color Atlas and Text of Histology. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Haites, N., 2001. Oncogenes. In: Brenner, S., Miller, J.H. (Eds.), *Encyclopedia of Genetics*, pp. 1370-1372. Academic Press, New York.
- Hanahan, D., Weinberg, Robert A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5), 646-674.
- Holliday, D.L., Speirs, V., 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* 13(4), 215.
- Jeuken, R., Roth, A., Peters, R., van Donkelaar, C., Thies, J., van Rhijn, L., Emans, P., 2016. Polymers in Cartilage Defect Repair of the Knee: Current Status and Future Prospects. *Polymers* 8(6), 219.
- Khan, A., Waqar, K., Shafique, A., Irfan, R., Gul, A., 2018. Chapter 18 - In Vitro and In Vivo Animal Models: The Engineering Towards Understanding Human Diseases and Therapeutic Interventions. In: Barh, D., Azevedo, V. (Eds.), *Omics Technologies and Bio-Engineering*, pp. 431-448. Academic Press.
- Kwon, H.J., Han, Y., 2016. Chondroitin sulfate-based biomaterials for tissue engineering. *Turk. J. Biol.* 40(2), 290-299.
- Langer, R., Vacanti, J., 1993. Tissue engineering. *Science* 260(5110), 920-926.
- Li, L., Zhao, F., Lu, J., Li, T., Yang, H., Wu, C., Liu, Y., 2014. Notch-1 Signaling Promotes the Malignant Features of Human Breast Cancer through NF- κ B Activation. *PLOS ONE* 9(4), e95912.
- Liu, Y., Wang, S., Sun, D., Liu, Y., Liu, Y., Wang, Y., Liu, C., Wu, H., Lv, Y., Ren, Y., Guo, X., Sun, G., Ma, X., 2016. Development of a Biomimetic Chondroitin Sulfate-modified Hydrogel to Enhance the Metastasis of Tumor Cells. *Scientific Reports* 6, 29858.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., Werb, Z., 2011. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(12), 10.1101/cshperspect.a005058 a005058.
- Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H., Dixon, B., Chen, P., 2017. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 35(5), 530-544.
- Nwabo Kamdje, A.H., Seke Etet, P.F., Vecchio, L., Muller, J.M., Krampera, M., Lukong, K.E., 2014. Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic targeting of the microenvironment. *Cellular Signalling* 26(12), 2843-2856.

- Oraby, M.A., Waley, A.I., El-Dewany, A.I., Saad, E.A., El-Hady, M.A., 2013. Electrospun gelatin nanofibers: effect of gelatin concentration on morphology and fiber diameters.
- Panzavolta, S., Gioffrè, M., Focarete, M.L., Gualandi, C., Foroni, L., Bigi, A., 2011. Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomaterialia* 7(4), 1702-1709.
- Ross, M.H., Pawlina, W., 1979. *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*, 6th Edition. Lippincott.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., Longacre, M., 2013. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 14(10), 21087-21113.
- Shaari, N., Kamarudin, S.K., 2019. Recent advances in additive-enhanced polymer electrolyte membrane properties in fuel cell applications: An overview.
- Song, H.H., Park, K.M., Gerecht, S., 2014. Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. *Advanced drug delivery reviews* 79-80, 19-29.
- Song, J.-L., Chen, C., Yuan, J.-P., Sun, S.-R., 2016. Progress in the clinical detection of heterogeneity in breast cancer. *Cancer Medicine* 5(12), 3475-3488.
- Stopeck, A.T., Brown-Glaberman, U., Wong, H.Y., Park, B.H., Barnato, S.E., Gradishar, W.J., Hudis, C.A., Rugo, H.S., 2012. The role of targeted therapy and biomarkers in breast cancer treatment. *Clinical & Experimental Metastasis* 29(7), 807-819.
- Tang, Y., Huang, B., Dong, Y., Wang, W., Zheng, X., Zhou, W., Zhang, K., Du, Z., 2017. Three-dimensional prostate tumor model based on a hyaluronic acid-alginate hydrogel for evaluation of anti-cancer drug efficacy. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 28(14), 1603-1616.
- Tency, I., Verstraelen, H., Kroes, I., Holtappels, G., Verhasselt, B., Vanechoutte, M., Verhelst, R., Temmerman, M., 2012. Imbalances between Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs) in Maternal Serum during Preterm Labor. *PLOS ONE* 7(11), e49042.
- Topuz, F., Uyar, T., 2018. Electrospinning of Cyclodextrin Functional Nanofibers for Drug Delivery Applications. *Pharmaceutics* 11(1), 6.
- Utech, S., Boccaccini, A.R., 2016. A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers. *Journal of Materials Science* 51(1), 271-310.

- Xu, X.-x., Liu, C., Liu, Y., Yang, L., Li, N., Guo, X., Sun, G.-w., Ma, X.-j., 2014. Enrichment of cancer stem cell-like cells by culture in alginate gel beads. *Journal of Biotechnology* 177, 1-12.
- Yahya, R.S., El-Bindary, A.A., El-Mezayen, H.A., Abdelmasseh, H.M., Eissa, M.A., 2014. Biochemical evaluation of hyaluronic acid in breast cancer. *Clin Lab* 60(7), 1115-1121.
- Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y., Fu, J., 2013. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering.

EKLER

EK 1 - İstatistik Analizler

3B matrisler ve 2B kültürlerin inhibitörlü ve inhibitörsüz MTT sonuçla ortalamaları

| <i>İnhibitör verilmesi</i> | 24h | 48h | | 72h | |
|----------------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | Normal Ortam | Normal Ortam | 50µM γ-Sekretaz | Normal Ortam | 50µM γ-Sekretaz |
| <i>AFG</i> | 0.2162 | 0.2457 | 0.2262 | 0.2436 | 0.2755 |
| <i>AHF</i> | 0.15186 | 0.2195 | 0.25217 | 0.2658 | 0.2608 |
| <i>AHFG</i> | 0.137 | 0.2208 | 0.2834 | 0.213 | 0.194 |
| <i>AHG</i> | 0.16714 | 0.3677 | 0.30317 | 0.29629 | 0.2524 |
| <i>M</i> | 0.08067 | 0.1696 | 0.11467 | 0.159 | 0.1093 |

Minitab istatistik yazılımının çıktıları değiştirilmeden verilmiştir.

Farklı 3B matrislerde hücre çoğalması

| General Linear Model: Absorbans versus Kültür Süresi, Jel Bileşimi | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------|--------|-----------|------------------------|---------|---------|
| Method | | | | | |
| Factor coding (-1, 0, +1) | | | | | |
| Factor Information | | | | | |
| Factor | Type | Levels | Values | | |
| Kültür Süresi | Fixed | 3 | 24, 48, 72 | | |
| Jel Bileşimi | Fixed | 5 | AFG, AHF, AHFG, AHG, M | | |
| Analysis of Variance | | | | | |
| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
| Kültür Süresi | 2 | 0.16824 | 0.084122 | 48.39 | 0.000 |
| Jel Bileşimi | 4 | 0.18443 | 0.046108 | 26.53 | 0.000 |
| Error | 77 | 0.13385 | 0.001738 | | |
| Lack-of-Fit | 8 | 0.04824 | 0.006030 | 4.86 | 0.000 |
| Pure Error | 69 | 0.08561 | 0.001241 | | |
| Total | 83 | 0.53453 | | | |
| Model Summary | | | | | |
| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) | | |
| 0.0416924 | 74.96% | 73.01% | 69.78% | | |

Coefficients

| Term | Coef | SE Coef | T-Value | P-Value | VIF |
|---------------|----------|---------|---------|---------|------|
| Constant | 0.20952 | 0.00471 | 44.50 | 0.000 | |
| Kültür Süresi | | | | | |
| 24 | -0.06117 | 0.00622 | -9.84 | 0.000 | 1.38 |
| 48 | 0.03497 | 0.00703 | 4.97 | 0.000 | 1.35 |
| Jel Bileşimi | | | | | |
| AFG | 0.02740 | 0.00980 | 2.80 | 0.007 | 1.95 |
| AHF | 0.00468 | 0.00930 | 0.50 | 0.616 | 1.87 |
| AHFG | -0.01895 | 0.00980 | -1.93 | 0.057 | 1.95 |
| AHG | 0.05825 | 0.00892 | 6.53 | 0.000 | 1.82 |

Regression Equation

Absorbans = 0.20952 - 0.06117 Kültür Süresi_24 + 0.03497 Kültür Süresi_48
+ 0.02620 Kültür Süresi_72 + 0.02740 Jel Bileşimi_AFG
+ 0.00468 Jel Bileşimi_AHF
- 0.01895 Jel Bileşimi_AHFG + 0.05825 Jel Bileşimi_AHG
- 0.07138 Jel Bileşimi_M

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

| Obs | Absorbans | Fit | Resid | Std Resid | |
|-----|-----------|--------|---------|-----------|---|
| 44 | 0.1890 | 0.2719 | -0.0829 | -2.10 | R |
| 49 | 0.4070 | 0.3027 | 0.1043 | 2.63 | R |
| 50 | 0.4330 | 0.3027 | 0.1303 | 3.28 | R |
| 58 | 0.1190 | 0.2404 | -0.1214 | -3.05 | R |
| 61 | 0.3320 | 0.2404 | 0.0916 | 2.30 | R |
| 80 | 0.0800 | 0.1643 | -0.0843 | -2.11 | R |

R Large residual

Comparisons for Absorbans

Tukey Pairwise Comparisons: Kültür Süresi

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

| Kültür Süresi | N | Mean | Grouping |
|---------------|----|----------|----------|
| 48 | 21 | 0.244494 | A |
| 72 | 27 | 0.235722 | A |
| 24 | 36 | 0.148355 | B |

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons: Jel Bileşimi

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

| Jel Bileşimi | N | Mean | Grouping |
|--------------|----|----------|----------|
| AHG | 18 | 0.267773 | A |
| AFG | 14 | 0.236926 | A B |
| AHF | 16 | 0.214207 | B C |
| AHFG | 14 | 0.190569 | C |

M 22 0.138145 D
Means that do not share a letter are significantly different.

48 Saatin sonunda inhibitörlü ve inhibitörsüz 2B kültürlerin kıyaslanması

Two-Sample T-Test and CI: Absorbans, İnhibitör Verimesi
 Method

μ_1 : mean of Absorbans when İnhibitör Verimesi = 50 μ M
 μ_2 : mean of Absorbans when İnhibitör Verimesi = verilmedi
 Difference: $\mu_1 - \mu_2$
Equal variances are not assumed for this analysis.

Descriptive Statistics: Absorbans

| İnhibitör Verimesi | N | Mean | StDev | SE Mean |
|--------------------|---|---------|---------|---------|
| 50 μ M | 3 | 0.11467 | 0.00850 | 0.0049 |
| verilmedi | 5 | 0.1696 | 0.0172 | 0.0077 |

Estimation for Difference

| Difference | 95% CI for Difference |
|------------|-----------------------|
| -0.05493 | (-0.07843, -0.03143) |

Test

Null hypothesis $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$
 Alternative hypothesis $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

| T-Value | DF | P-Value |
|---------|----|---------|
| -6.01 | 5 | 0.002 |

48 Saatin sonunda inhibitörlü ve inhibitörsüz 3B matrislerin kıyaslanması

General Linear Model: Absorbans versus Jel Bileşimi, ... İnhibitör Verimesi
 Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

| Factor | Type | Levels | Values |
|--------------------|-------|--------|------------------------|
| Jel Bileşimi | Fixed | 5 | AFG, AHF, AHFG, AHG, M |
| İnhibitör Verimesi | Fixed | 2 | 50 μ M, verilmedi |

Analysis of Variance

| Source | DF | Adj SS | Adj MS | F-Value | P-Value |
|--------------------|----|----------|----------|---------|---------|
| İnhibitör Verimesi | 1 | 0.000632 | 0.000632 | 0.46 | 0.501 |
| Jel Bileşimi | 4 | 0.146479 | 0.036620 | 26.67 | 0.000 |
| Error | 40 | 0.054914 | 0.001373 | | |
| Lack-of-Fit | 4 | 0.027169 | 0.006792 | 8.81 | 0.000 |
| Pure Error | 36 | 0.027745 | 0.000771 | | |
| Total | 45 | 0.202099 | | | |

Model Summary

| S | R-sq | R-sq(adj) | R-sq(pred) | | | |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|--------------|------|--|
| 0.0370520 | 72.83% | 69.43% | 63.85% | | | |
| Coefficients | | | | | | |
| Term | Coef | SE Coef | T-Value | P-Value | VIF | |
| Constant | 0.24179 | 0.00550 | 43.98 | 0.000 | | |
| İnhibitör Verimesi | | | | | | |
| 50µM | -0.00377 | 0.00556 | -0.68 | 0.501 | 1.03 | |
| Jel Bileşimi | | | | | | |
| AFG | -0.0065 | 0.0110 | -0.59 | 0.560 | 1.50 | |
| AHF | -0.0019 | 0.0106 | -0.18 | 0.856 | 1.47 | |
| AHFG | 0.0142 | 0.0110 | 1.29 | 0.206 | 1.50 | |
| AHG | 0.0880 | 0.0106 | 8.28 | 0.000 | 1.47 | |
| Regression Equation | | | | | | |
| Absorbans | = 0.24179 - 0.00377 İnhibitör Verimesi_50µM + 0.00377 İnhibitör Verimesi_verilmedi - 0.0065 Jel Bileşimi_AFG - 0.0019 Jel Bileşimi_AHF + 0.0142 Jel Bileşimi_AHFG + 0.0880 Jel Bileşimi_AHG - 0.0937 Jel Bileşimi_M | | | | | |
| Fits and Diagnostics for Unusual Observations | | | | | | |
| Obs | Absorbans | Fit | Resid | Std Resid | | |
| 13 | 0.4070 | 0.3335 | 0.0735 | 2.13 | R | |
| 14 | 0.4330 | 0.3335 | 0.0995 | 2.88 | R | |
| <i>R Large residual</i> | | | | | | |

| İnhibitör Verimesi | | | |
|----------------------------------------------------------------------|----|----------|----------|
| Verimesi | N | Mean | Grouping |
| verilmedi | 21 | 0.245559 | A |
| 50µM | 25 | 0.238020 | A |
| <i>Means that do not share a letter are significantly different.</i> | | | |
| Jel Bileşimi | | | |
| Bileşimi | N | Mean | Grouping |
| AHG | 10 | 0.329754 | A |
| AHFG | 9 | 0.255974 | B |
| AHF | 10 | 0.239854 | B |
| AFG | 9 | 0.235308 | B |
| M | 8 | 0.148058 | C |
| <i>Means that do not share a letter are significantly different.</i> | | | |

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Faruk aştaban
Doğum yeri : Kadıköy
Doğum tarihi : 16.11.1992
Medeni hali : Bekar
Yazışma adresi : Orhanlar Mah. Yalı Cad. No:2/5 Kdz. Ereğli
/Zonguldak
Telefon : +90 535 893 44 42
Elektronik posta adresi : faruk.castaban@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EğİTİM DURUMU

Lisans : Orta Doğu Teknik Üniversitesi/Ankara- Biyoloji
Bölümü (2011-2016)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi/Ankara- Biyomühendislik
Anabilim Dalı (2016-2019)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 24.06.2019

Tez Başlığı / Konusu: MEME KANSERİ HÜCRELERİYLE ÜÇ BOYUTLU TÜMÖR MODELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE NOÇ RESEPTÖRÜ İNHİBİTÖRÜNÜN UYGULANMASI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 41 sayfalık kısmına ilişkin, 24/06/2019 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %4'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Faruk ÇAŞTABAN
Öğrenci No: N16123967
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı: Yüksek Lisans
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

24.06.2019
F. Çastaban

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Kerem
Prof. Dr. Ayşe Kerem Özden

(Unvan, Ad Soyad, İmza)