



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DENİZEL CANLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN İNSAN GLİOBLASTOMA U87MG
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nebahat Buşra AKSOY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Murat PEKMEZ**

Temmuz, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 26.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Murat PEKMEZ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Betül KARADEMİR YILMAZ
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2022-39238 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez dönemim boyunca gerek kişisel hayatımda gerekse tez çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorluklar, yaşadığım aksaklıklara rağmen her zaman bana anlayışla yaklaşan, sorunlarımı çözmemde yardımcı olan, ders dönemimin pandemiye denk gelmesiyle tanışma fırsatı bulamamak bile danışman hocam olmayı kabul edip bana kendimi geliştirme ve deneyim kazanma fırsatı veren, bilgi ve birikimiyle yolumu aydınlatan sevgili danışman hocam **Doç. Dr. Murat PEKMEZ'** e teşekkür ediyorum.

Proteomik çalışma grubuna dahil olduğum ilk günden itibaren, deney çalışmalarımı planlamada bana yardımcı olan, çalışmalarda uyguladığımız yöntemleri bana öğreten ve bilgilendiren, bana karşı her zaman anlayışlı ve yardımcı olan desteğini ve yardımlarını ömrüm boyunca asla unutamayacağım, ondan öğrendiklerimin ileriki çalışma hayatımda bana yol göstereceğine inandığım, adeta ikinci danışmanım olan hocam **Uzman Moleküler Biyolog Yunus AKSÜT'**e tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

Birlikte aynı çalışma grubunda olmaktan büyük keyif aldığım, aralarına katıldığım ilk gün benim de Proteomik ailesinin bir bireyi olduğumu hissetmemi sağlayan, çalışma tarzı, bana kattıkları öğretiler ve bilgiler ile yoluma ışık olan, pozitif enerjisi ve sevecenliğine hayran kaldığım, özellikle tezimin son kısmını tamamlamamda hem motivasyon hem de çalışmalarına yardımcı olmasıyla desteğini asla unutamayacağım canım hocam **Dr. Ashhan ŞENGELEN'**e gönülden teşekkür ediyorum.

Deney çalışmalarım sırasında benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşan, tezimde uyguladığım moleküler teknik ve analizleri öğrenmemde her zaman yardımcı ve destek olan değerli çalışma arkadaşlarım **İrem ÖĞÜTÇÜ**, **Ceren GENCEL** ve **Zahra SHAHPAR'a** tüm kalbimle teşekkür ediyorum. Proteomik çalışma grubunun diğer tüm üyelerine de ayrıca teşekkür ediyorum.

Hayatımın her alanında ve her zaman desteğini hissettiğim, koşulsuz sevgi ve desteğiyle bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman beni motive eden ve kararsız kaldığım her an da beni yüreklendiren arkamda varlığını hep hissettiğim canım aileme sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. KANSER	5
2.1.1. Glioblastoma.....	5
2.2. GLİKOZAMİNOGLİKANLAR.....	7
2.2.1. Glikozaminoglikanların Yapısı, Sınıflandırılması ve Fonksiyonu	7
2.2.2 Heparan Sülfat ve Heparin	9
2.2.3 Kondroitin Sülfat ve Dermatan Sülfat	11
2.2.4 Keratan Sülfat	12
2.2.5 Hyalüronan (Hyalüronik Asit).....	13
2.3 GLİKOZAMİNOGLİKANLAR VE KANSER.....	14
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	16
3.1. BALIK PULLARINDAN GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN EKSTRAKSİYONU	16
3.2. KULLANILAN HÜCRELER VE HÜCRE KÜLTÜRÜ KOŞULLARI.....	17
3.2.1. Hücrelerin Alt Kültürlenmesinde Kullanılan Besiyerleri	17
3.2.2. Hücrelerin Alt Kültürlenmesi	18
3.2.3. Hücre Üreme Profil Analizi.....	19
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	20
3.3. SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ.....	20
3.3.1 GLİKOZAMİNOGLİKAN UYGULANAN HÜCRELERİN SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ	22
3.4. MADDE UYGULAMALARI	22

3.5. HÜCRE MİGRASYON ANALİZİ	22
3.6. HOECHST VE PROPİDİUM İYODÜR (HO/PI) BOYAMASI.....	23
3.7. HÜCRE TOPLAMA	24
3.8. SUDA ÇÖZÜNEBİLİR HÜCRESEL PROTEİNLERİN İZOLASYONU.....	25
3.9. PROTEİN KONSANTRASYONLARININ SAPTANMASI.....	25
3.10. ELEKTROFORETİK ANALİZLER.....	27
3.10.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) – PAGE Analizi.....	27
3.10.2. İmmünoblotlama.....	29
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. U-87MG GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİ	34
4.2. GLİKOZAMİNOGLİKANIN (GAG) SİTOTOKSİK ETKİLERİ.....	34
4.3. <i>İN VİTRO</i> ÇİZİK DENEYİ İLE MİGRASYONUN ANALİZİ	36
4.4. APOPTOZ ANALİZİ: HOECHST VE PROPİDİUM İYODÜR (HO/PI) BOYAMASI.....	37
4.5. PROTEİN EKSPRESYON ANALİZLERİ.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Glikozaminoglikanların yapıları ve içerdikleri glukozamin, üronik asit veya galaktoz gruplarına göre sınıflandırılması ve hücre dışı matriste dağılımı (Wang ve Chi, 2022).....	8
Şekil 2.2: Heparan sülfatın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).....	10
Şekil 2.3: Heparinin yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).....	10
Şekil 2.4: Kondroitin sülfatın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).....	11
Şekil 2.5: Dermatan sülfatın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).....	12
Şekil 2.6: Keratan sülfatın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).....	13
Şekil 2.7: Hyalüronanın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).....	13
Şekil 3.1: Levrek balığından (<i>Dicentrarchus labrax</i>) elde edilen kurutulmuş balık pulları.....	16
Şekil 3.2: Levrek balığı (<i>Dicentrarchus labrax</i>) pullarından izole edilen glikozaminoglikanlar.....	17
Şekil 4.1: İnsan glioblastoma hücre hattı U-87MG hücrelerinin başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/mL olan kültürlerden elde edilen çoğalma eğrisi grafiği.....	34
Şekil 4.2: GAG farklı dozlarının (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) U-87MG hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik (MTT analizi) etkilerini gösteren (A) sütun ve (B) doz-yanıt eğri grafikleri (*kontrolle göre kıyaslamayı, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).....	35
Şekil 4.3: U-87MG hücrelerinde 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik GAG dozlarının 72 saat süreyle uygulamalarının hücre canlılığına etkisi (skala bar: 400 μm , büyütme: $\times 40$). (A) MTT testi ile elde edilen hücre canlılığını gösteren grafikler, (B) Hücrelerin morfolojik görüntüsü (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$).	35
Şekil 4.4: U-87MG hücrelerinde 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ dozundaki GAG uygulamasının 48 saat sonunda hücre migrasyonuna etkisi (skala bar: 400 μm , büyütme: $\times 40$). (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$).....	36

- Şekil 4.5:** U-87MG hücrelerinde 600 µg/mL ve 1000 µg/mL’lik GAG dozlarının 72 saat uygulamalarının apoptoz üzerindeki etkisinin HO/PI boyama ile değerlendirilmesi (büyütme: ×400). (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ***P<0.001; ###P<0.001).....37
- Şekil 4.6:** (A) U-87MG hücrelerinde 600 µg/mL ve 1000 µg/mL’lik GAG dozlarının 72 saat uygulamalarının apoptoz üzerindeki etkisinin western blot ile değerlendirilmesi, (B) hücrelerde uygulama sonrası Bax ve Bcl-2 proteinin anlatım farklarını ve oranlarını, kaspaz-3 proteinin p19/p17 kesilmiş fragmentlerinin anlatım farklarını ve PARP1 proteinin p89 kesilmiş fragmentinin anlatım farklarını gösteren grafikler. (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ***P<0.001; ###P<0.001).....39
- Şekil 4.7:** (A)U-87MG hücrelerinde 600 µg/mL ve 1000 µg/mL’lik GAG dozlarının 72 saat uygulamalarının p53 ve p21 ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin western blot ile değerlendirilmesi, (B) hücrelerde uygulama sonrası p21 ve p53 proteinin farklarını gösteren grafikler. (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ***P<0.001; ###P<0.001).....40
- Şekil 4.8:** (A)U-87MG hücrelerinde 600 µg/mL ve 1000 µg/mL’lik GAG dozlarının 72 saat uygulamalarının ER stresi üzerindeki etkisinin western blot ile değerlendirilmesi, (B) hücrelerde uygulama sonrası Grp78, IRE1 α, PERK ve ATF p50 proteinin farklarını gösteren grafikler. (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ***P<0.001; ###P<0.001).....41

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.	28
Tablo 3.2: Ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli değerler).....	29
Tablo 3.3: İmmünojik analizler için hazırlanan çözeltiler.....	30
Tablo 3.4: İmmünojik analizler için kullanılan primer ve sekonder antikorlar (Elde edildikleri kaynakları ve dilüsyonları).....	31



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μmol	: Mikromol
cm^2	: Santimetrekare
g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
$^{\circ}\text{C}$: Derece Santigrat
v	: Hacim (“Volume”)
V	: Volt
w	: Ağırlık (“Weight”)
α	: Alfa
β	: Beta

Kısaltmalar	Açıklama
GAG	: Glikozaminoglikanlar
ECM	: Hücre Dışı Matris (“Extracellular Matrix”)
PG	: Proteoglikanlar
HP	: Heparin
HP	: Heparan Sülfat
CS	: Kondroitin Sülfat
DS	: Dermatan Sülfat
KS	: Keratan Sülfat
HA	: Hyalüronan
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
D-PBS	: Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini (“Dulbecco's Phosphate Buffered Saline”)
DMEM/High	: Dulbecco'nun Değiştirilmiş Eagle's Medium'u / High Glucose
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
FBS	: Fetal Sığır Serumı (“Fetal Bovine Serum”)
IC₅₀	: Canlı hücre sayısını %50 düşüren madde konsantrasyonu
IC₂₀	: Canlı hücre sayısını %20 düşüren madde konsantrasyonu
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (“Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)
HBSS	: “Hank's Balanced Salt Solutions”
HO/PI	: Hoechst / Propidyum İyodür Boyama Solüsyonu

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENİZEL CANLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN İNSAN GLİOBLASTOMA U87MG HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nebahat Buşra AKSOY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat PEKMEZ

Kanser, yüksek mortalite oranlarıyla dünyada yaşanan ölümlerin nedenleri arasında ikinci sırada bulunan bir halk sağlığı sorunudur. Hücre bölünmesi, çoğalması ve apoptozu arasındaki homeostazinin bozulup, kontrolsüz hücre bölünmesi gibi mekanizmalarla ortaya çıkan kanser, bulunduğu dokuya göre akciğer, meme, beyin kanseri olarak isimlendirilir. Glioblastoma, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen kriterlere göre yapılan sınıflandırmada IV. derece astrositom olarak adlandırılmış dünya genelinde en hızlı ölüm oranına sahip beyin tümörleridir. Hızlı büyümesi, invazyon yapma yeteneği ve teşhis edildikten sonra yaklaşık 15 ay süre içerisinde ölüme sebebiyet vermeleri nedeniyle en agresif ve merkezi sinir sisteminin en yaygın malign beyin tümörü olarak bilinirler.

Kanser gelişimi, metastazı, tümör büyümesi ve invazyon süreçleri boyunca kanser hücreleri ve tümör mikroçevresi arasında önemli etkileşimler gerçekleşmektedir. Tümör mikroçevresinin önemli bileşenlerinden olan ve kanser patagonezinde önemli rol oynayan hücre dışı matriste bulunan glikozaminoglikanlar (GAG), uzun ve dallanmamış tekrar eden disakkarit zincirlerinden oluşan doğrusal polisakkaritlerdir. Tekrar eden disakkarit birimlerini oluşturan monosakkaritlerin sülfatlanma durumuna göre negatif yüke sahip olan glikozaminoglikanlar, omurgalı ve omurgasızlarda hemen hemen her dokuda bulunurlar. Glikozaminoglikanların yapılarında bulunan disakkarit birimleri, N-asetil heksozamin ve bir üronik asit grubundan veya galaktozdan oluşur.

Tekrar eden disakkarit birimin tipi ve ayrı sülfatlama modelleri gibi disakkarit birimlerinin posttranslasyonel modifikasyonları, GAG'ların heparan sülfat (HS)/heparin, kondroitin sülfat (CS), dermatan sülfat (DS), keratan sülfat (KS) ve hyalüronik asit (HA) olarak da bilinen hyalüronan olarak sınıflandırılmasına neden olur.

Glikozaminoglikanlar kovalent olarak bağlandıkları proteinlerle oluşturdukları proteoglikan yapılar nedeniyle birçok biyolojik sürece katılan önemli heteropolisakkarit bileşikleridir. Büyüme faktörleri, kemokinler, proteinler, enzimler, enzim inhibitörleri ile etkileşimde bulunarak proliferasyon, hücre adezyonu, hücre migrasyonu, enflamasyon, koagülasyon, anjiyogenez gibi birçok biyolojik ve patolojik süreçte düzenleyici rol oynamaktadır. Buna ek olarak, glikozaminoglikanlar, metastaz, invazyon, tümör büyümesi, karsinogenez gibi kanserle ilişkili patolojik olaylarla kritik öneme sahiptir. Birçok patolojik ve fizyolojik süreçte etkileşimde bulunduğu moleküller ve proteinlere bağlanarak oluşturduğu proteoglikan yapılar sebebiyle glikozaminoglikanların, hastalıkların teşhisi için biyobelirteç veya tedavisi için terapötik olarak kullanılabilmesi çeşitli araştırmalar sonunda ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasının hedefi, denizel canlı kaynaklardan izole edilen glikozaminoglikanların insan glioblastoma hücreleri olan U-87MG hücre hattı üzerindeki etkilerinin apoptoz ve endoplazmik retikulum stresi (ER stress) açısından araştırılmasıdır. Tez kapsamında yapılan çalışmanın ilk basamağında, levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*) pullarından izole edilen glikozaminoglikanların hesaplanan farklı konsantrasyonlarda U-87MG insan glioblastoma hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Uygulanan glikozaminoglikanların uygulama dozu ve süresi arttıkça sitotoksik etkinin de arttığı bulunmuştur. MTT testi sonucu hücre canlılığı üzerinde %19.60 ve %52.35 oranında etkiye sahip olduğu belirlenen 600 µg/mL ve 1000 µg/mL dozlarının hücre migrasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması için *in vitro* çizik deneyleri uygulanmıştır. Migrasyon testi analizi sonuçları, GAG'ın glioblastoma hücre hattı U-87MG hücrelerinde önemli ölçüde migrasyonu azalttığını gösterdi.

Uygulanan maddenin apoptotik etkisini belirlemek için Hoechst-33342/Propidium iyodür (HO/PI) floresan boyaması yapılmıştır. Apoptoz belirteci ve endoplazmik retikulum stresi (ER stres) marker proteinlerinin anlatım seviyeleri bir immünoiblottama metodu olan Western blot yöntemi uygulanarak belirlenmiştir. Floresan mikroskop altında glikozaminoglikanlar uygulandıktan sonra yapılan analizler ile apoptotik hücre sayısının maddenin artan dozlarında daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Western blot analizi yapıldıktan sonra, apoptoz ve ER stresi ile ilişkilendirilen proteinlerin anlatım seviyelerine ait veriler analiz edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, apoptoz, DNA onarımı ve ER stres ile ilişkilendirilen proteinlerin anlatım seviyelerinin doz arttıkça arttığı bulunmuştur. Buna bağlı olarak, denizel canlı kaynaklardan elde edilen glikozaminoglikanların artan dozlarının U-87MG glioblastoma hücrelerinde apoptoz ve ER stresi indüklediği tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunun, glioblastoma tedavisi için glikozaminoglikanların geliştirilebilecek doğal terapötiklerden biri olabilmeleri için literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

Temmuz 2023, 70 sayfa.

Anahtar kelimeler: Glikozaminoglikan, glioblastoma, apoptoz, ER stres

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF GLYCOSAMINOGLYCANS ISOLATED FROM MARINE LIVING RESOURCES ON HUMAN GLIOBLASTOMA U87MG CELLS

Nebahat Buşra AKSOY

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat PEKMEZ

Cancer is a public health problem that ranks second among the causes of death in the world with its high mortality rates. Cancer that arises through mechanisms such as uncontrolled cell division, where the homeostasis between cell division, proliferation and apoptosis is disrupted, is called lung, breast, and brain cancer depending on the tissue it is found in. Glioblastoma is classified according to the criteria set by the World Health Organization (WHO), Grade IV astrocytoma is the brain tumor with the fastest death rate worldwide. They are known as the most aggressive and the most common malignant brain tumor of the central nervous system due to their rapid growth, ability to invade and cause death within about 15 months after diagnosis.

Important interactions occur between cancer cells and the tumor microenvironment during the processes of cancer development, metastasis, tumor growth, and invasion. The glycosaminoglycans (GAGs) in the extracellular matrix, which are important components of the tumor microenvironment and play an important role in cancer pathogenesis, are linear polysaccharides consisting of long and unbranched repeating disaccharide chains. Glycosaminoglycans, which have a negative charge according to the sulfation state of the monosaccharides that make up the repeating disaccharide units, are found in almost every tissue in vertebrates and invertebrates. The disaccharide units found in the structures of glycosaminoglycans consist of N-acetyl hexosamine and a uronic acid group or galactose.

Posttranslational modifications of disaccharide units, such as the type of repeating disaccharide unit and discrete sulfation patterns, suggest GAGs as heparan sulfate (HS)/heparin, chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), keratan sulfate (KS), and hyaluronic acid (HA) also known as hyaluronan.

Glycosaminoglycans are important heteropolysaccharide compounds that participate in many biological processes due to the proteoglycan structures they form with the proteins to which they are covalently bound. It plays a regulatory role in many biological and pathological processes such as proliferation, cell adhesion, cell migration, inflammation, coagulation, angiogenesis by interacting with growth factors, chemokines, proteins, enzymes, enzyme inhibitors. In addition, glycosaminoglycans are critical with cancer-related pathological events such as metastasis, invasion, tumor growth, carcinogenesis. Various studies have revealed that glycosaminoglycans can be used as biomarkers for the diagnosis of diseases or therapeutically for the treatment of diseases due to the proteoglycan structures formed by binding to the molecules and proteins with which they interact in many pathological and physiological processes.

The aim of this thesis study is to investigate the effects of glycosaminoglycans isolated from marine living resources on human glioblastoma cells, the U-87MG cell line, in terms of apoptosis and endoplasmic reticulum stress (ER stress). In the first step of the study conducted within the scope of the thesis, the effects of glycosaminoglycans isolated from sea bass fish (*Dicentrarchus labrax*) scales on the viability of U-87MG human glioblastoma cells at different calculated concentrations were investigated. It was found that the cytotoxic effect of the applied glycosaminoglycans increased as the application dose and duration increased. Migration assay analysis showed that GAG significantly reduced migration in glioblastoma cell line U-87MG cells.

Hoechst-33342/Propidium iodide (HO/PI) fluorescent staining was performed to determine the apoptotic effect of the applied substance. Expression levels of apoptosis marker and endoplasmic reticulum stress (ER stress) marker proteins were determined by applying Western blot method, which is an immunoblotting method. The analyzes performed after the application of glycosaminoglycans under a fluorescent microscope revealed that the number of apoptotic cells was higher at increasing doses of the substance. After western blot analysis, data on expression levels of proteins associated with apoptosis and ER stress were analyzed. As a result of the obtained data, it was found that expression levels of proteins associated with apoptosis, DNA repair and ER stress increased as the dose increased. Accordingly, increasing doses of glycosaminoglycans obtained from marine living resources were found to induce apoptosis and ER stress in U-87MG glioblastoma cells. The result of this study is expected to contribute to the literature so that glycosaminoglycans can be one of the natural therapeutics that can be developed for the treatment of glioblastoma.

July 2023, 70 pages.

Keywords: Glycosaminoglycan, glioblastoma, apoptosis, ER stress

1. GİRİŞ

Kanser, dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak kabul edilen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (“International Agency For Research On Cancer, IARC”) verilerine göre, 2020 yılında tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası tanısı konulmuş ve yaklaşık 10 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir (Sung ve diğ., 2021).

Beyin tümörleri, beyindeki anormal hücre büyümeleridir ve ancak yalnızca kötü huylu tümörler kanserlidir. Beyin tümörleri, beyinden kaynaklanan beyin içinde bulunan primer beyin tümörü ve merkezi sinir sistemi dışındaki kanserden kaynaklanan metastaz yoluyla beyine yayılan sekonder beyin tümörü olmak üzere ikiye ayrılırlar. Dünya Sağlık Örgütü (“World Health Organization, WHO”) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre IV. derece astrositom olarak bilinen glioblastoma (GBM) (Louis ve diğ., 2016), erişkinlerde merkezi sinir sisteminin (CNS) en yaygın görülen ve en agresif malign primer beyin tümürüdür. Hızlı büyüme, invazivlik ve yüksek mortalite ile karakterize edilen glioblastomada teşhisten sonra hayatta kalma süresi 15 aydan azdır (Anjum ve diğ., 2017). Her yıl yaklaşık 100.000 kişiden 3’üne glioblastoma teşhisi konulmuş (Dolecek ve diğ., 2012) ve hastalar önce cerrahi rezeksiyon ardından radyoterapi ve kemoterapi ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. 2000’li yıllardan itibaren temozolomid ile kombine radyoterapi yaşam süresini biraz uzatmış olsa da (Brandes, 2005), glioblastoma hala ölüm hızı en yüksek tümörlerdendir. Ayrıca, temozolomid tedavisinin kemik iliği baskılanması, hepatotoksisite gibi yan etkilere neden olması, hastaların %50’sinin tedaviye direnç göstermesi, kemoterapide uygulanan farmasötiklerin hedef dokuya geçişine engel olan kan beyin bariyerinin varlığı GBM tedavisini zorlaştırmaktadır (Houy ve Le Grand, 2018; Le Rhun ve diğ., 2019; Strobel ve diğ., 2019). Bu nedenlerden dolayı, son zamanlarda araştırmacılar uygulanabilir terapötik hedefleri belirlemek için GBM örnekleri üzerinde genomik, epigenomik, transkriptomik ve proteomik analizler yürütmektedirler ve bu analizlerin sonucunda uygun ve etkin bir tedavi yöntemi geliştirmek için farklı çalışmalar devam etmektedir.

Tümörler, büyümelerini invazyonlarını ve metastazlarını etkileyen karmaşık ve dinamik mikroçevrelerinde gelişir.

Kanser patogenezinde önemli bir role sahip olan tümör mikroçevresi, hücre dışı matrisi (ECM) oluşturan bileşenler ile çevrelenmiş kanserli, kanserli olmayan, stromal ve bağışıklık hücrelerinden oluşur (Tzanakakis ve diğ., 2020).

Hücre dışı matris (ECM), neredeyse tüm doku ve organlarda bulunan proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve fibröz proteinlerden oluşan karmaşık bir makromolekül ağıdır. ECM'nin hücre içindeki temel görevi doku ve organları oluşturan hücrelerin arasındaki boşlukları doldurarak hücreler mekanik bir yapı desteği sağlamak değil, içerdiği bileşenler ve onların çeşitli moleküller ile etkileşimleri sayesinde önemli biyolojik mekanizmaları regüle etmeleridir. ECM'nin yeniden modellenmesinde yaşanan bozukluk, hücre mikroçevresini de etkileyerek değişikliğe sebep olmakta ve böylece kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların başlangıcını veya hızlı ilerlemesini etkilemektedir. Proteoglikanlar (PG'ler) ve glikozaminoglikanlar (GAG'lar), hücre dışı matrisi oluşturan başlıca makromoleküllerdir ve ECM içindeki çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri, hücre yüzeyi reseptörleri, adezyon molekülleri, enzimler ve glikoproteinler ile doğrudan ve dolaylı etkileşimler yoluyla hem hücre davranışını hem de matris özelliklerini etkilerler.

Hücre dışı matrisin bileşenlerinden olan glikozaminoglikanlar (GAG'lar), hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda bulunan sülfatlanmış veya sülfatlanmamış monosakkaritleri içeren tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan, doğrusal, negatif yüklü karmaşık polisakkarit bileşikleridir. Yapısal olarak GAG'lar, glikozidik bağlarla bağlanan tekrarlayan disakkarit birimlerinden oluşan polisakkaritlerdir ve bu disakkarit birimleri, bir amino şekerden (N-asetilglukozamin (GlcNAc) veya N-asetilgalaktozamin (GalNAc) gibi glukozamin çeşitleri) ve bir üronik asit (glukuronik asit veya iduronik asit) veya galaktozdan oluşur. Tekrar eden disakkarit birimin tipi ve ayrı sülfatlama modelleri de dahil onun modifikasyonları, GAG'ların heparan sülfat (HS)/heparin, kondroitin sülfat (CS), dermatan sülfat (DS), keratan sülfat (KS) ve hyalüronik asit (HA) olarak da bilinen hyalüronan olarak sınıflandırılmasına neden olur. Kondroitin sülfat, heparan sülfat ve hyalüronan glukuronik asit içerirken, dermatan sülfat iduronik asit ve heparin de heksüronik asitlerden oluşur. Keratan sülfat ise üronik asit yerine galaktoz içerir. Heksozamin birimleri hyalüronan, heparan sülfat ve keratan sülfat için N-asetilglukosamin (GlcNAc) iken kondroitin sülfat ve dermatan sülfat için N-asetilgalaktozamin (GalNAc)'dir (Pomin ve Mulloy, 2018). GAG'lar, üronik asit gruplarında bulunan negatif yüklü karboksilik asit birimleri ve bu birimlerin birçoğunda bulunan sülfat grupları sebebiyle

yük yoğunluğu oldukça fazladır. Sülfatlanmayan tek GAG türü olan hyalüronan, sülfat grubu içermediği için en az negatif yüke sahiptir ve buna karşın heparin en fazla negatif yüke sahiptir. Glikozaminoglikanlar endoplazmik retikulumda ve Golgi cisimciklerinde sentezlenirken, hyalüronan plazma membranında sentezlenir. Kondroitin sülfat/dermatan sülfat, heparan sülfat/heparin ve keratan sülfat zincirleri protein çekirdeklerine kovalent olarak bağlanarak proteoglikanları oluşturur. Buna karşın, sülfatlanmamış glikozaminoglikan olan hyalüronan, proteoglikan çekirdeğe bağlanmaz ama hemen hemen tüm dokuların hücre dışı matrisine salgılanır.

GAG'ların büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri ve sitokinlerle etkileşimi, kanserin büyümesinde, ilerlemesinde ve metastazında rol oynar. Yapılan araştırmalarda GAG'ların, anjiyogenez, kanser invazyonu ve metastaz için gerekli olan çoklu sinyal yollarına dahil olduğu (Afratis ve diğ., 2012), tümör ilerlemesinin inhibisyonunda rol oynadığı bulunmuştur. Etkileşim türünün ve bu GAG'ların çoklu kanser türlerinde oynadığı rolün anlaşılması, kanseri tedavi etmek için çeşitli terapötik yaklaşımların ve yeni ilaçların geliştirilmesine yol açmıştır.

Glikozaminoglikanlar, büyük ölçüde hayvansal kaynaklardan, sığır, kuş, domuz gibi karasal hayvanlardan (Volpi, 2007) veya köpek balığı, kalamar, mersin balığı gibi deniz organizmalarından elde edilir (Zhao ve diğ., 2013). Ancak kara hayvanı dokularından elde edildiğinde olası salgın hastalık riski barındırdığı için güvenli oluşu konusunda birtakım endişeler yaşanmaktadır. Bununla birlikte, köpek balığı gibi nesli tükenmekte olan canlı kaynakları ise üretim için ham madde sınırlandırmasına sebep olmaktadır. Tüm bu sebepler, karmaşık polisakkaritlerden olan glikozaminoglikanların elde edilmesi için alternatif kaynak arayışını meydana getirmiştir. Denizel canlılarda bulunan glikozaminoglikanlar (GAG'lar), esas olarak moleküler ağırlık ve sülfatlama açısından karasal organizmalarinkinden farklıdır. Denizel canlı kaynaklardan elde edilen sülfatlanmış GAG'lar, antioksidan ve nöroprotektif etkiler, antiviral, antikoagülan ve antitrombotik, antitümöral ve antienflamatuar, antiproliferatif gibi önemli farmakolojik aktivitelere sahiptir (Chavante ve diğ., 2014; Damonte ve diğ., 2004). Kanser kemoterapisinde kullanılan sitotoksik ilaçların çoğu, aslında geniş bir normal doku spektrumu için oldukça toksiktir. Son yıllarda, doğal antitümör bileşiklerinin araştırılması ve denizel canlılardan elde edilen GAG'ların antitümör aktivitelerinin incelenmesi büyük ilgi konusu haline gelmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında kurutulmuş levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*) pullarından izole edilen glikozaminoglikanların insan glioblastoma U-87MG hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

İzole edilen GAG'ların sitotoksik analizleri MTT testi ile yapılmış, sitotoksikite testi sonucuna göre hücre canlılığını %20 ve %50 oranında etkileyen dozlar seçilip glioblastoma hücreleri üzerine uygulanmıştır. U-87MG hücrelerinde özellikle apoptoz ve endoplazmik retikulum stresi üzerine olan etkileri araştırılmış, ilgili proteinlerin anlatım seviyeleri bir immünoablota tekniği olan Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda, hücre içinde sahip oldukları önemli rol sebebiyle, glikozaminoglikanların hastalıkların tedavisinde farmakolojik hedefler ya da beyin tümörlerinin tedavisinde yeni bir antikanser ilaç olarak kullanılabilmesi için literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser, vücudumuzdaki hücrelerin genetik veya sigara, alkol ve radyasyon gibi kanserojenlere maruz kalma, virüsler gibi çevresel etmenler sebebiyle büyümesi, çoğalması ve apoptozu arasındaki homeostazinin bozulup kontrolsüz bölünmesiyle ortaya çıkan bir halk sağlığı sorunudur. Bu kontrolsüz büyüme sonucu biriken hücreler tümörleri oluştururlar ve tümörler iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere ikiye ayrılır. İyi huylu tümörler kanser olmamakla birlikte çoğunlukla alındıktan sonra tekrarlamazlar ve vücudun diğer kısımlarına yayılım göstermezler. Kötü huylu tümörlerdeki kanser hücreleri kan veya lenf yoluyla vücuttaki başka dokulara invazyon ve metastaz yapma yeteneğine sahiptir.

Dünyada ve ülkemizde yüksek mortalite oranıyla ölüm nedenleri arasında ikinci sırada kanser gösterilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne ("World Health Organization, WHO") bağlı Küresel Kanser Gözlemevi'nin ("Global Cancer Observatory, GCO") yayınladığı GLOBOCAN veritabanı verilerine göre, 2020 yılında 19.3 milyon yeni kanser vakası tanısı konulmuş 10 milyona yakın insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Sungve diğ., 2021). Türkiye'de ise 2020 yılında 233.834 kişiye kanser teşhisi konulmuş, 126.335 kansere bağlı ölüm raporlanmıştır. Dünyada her 5 kişiden biri hayatının belli bir döneminde kansere yakalanırken, küresel kanser yükünün 2020'ye oranla %47 artış ile 2040 yılında 28.4 milyon vakaya çıkması beklenmektedir. Kansere yakalanma ve ölüm oranlarının her geçen gün artması, tanı ve tedavi için yeni yöntemler geliştirmede yapılan çalışmaların da artmasına sebep olmuştur. Kanser taraması, tedavisi ve önlenmesi üzerine yapılan araştırmalarda yaşanan gelişmeler ile birçok kanser türü için hayatta kalma oranlarının artması hedeflenmektedir.

2.1.1. Glioblastoma

Gliyal hücreler olarak bilinen beyin hücrelerinden gelişen gliomalar, en yaygın beyin tümörü grubunu oluştururlar. Dünya Sağlık Örgütü ("World Health Organization, WHO") tarafından belirlenen parametrelere göre yapılan sınıflandırma ile gliomalar, pilositik astrositom (I.derece), diffüz astrositom (II.derece), anaplastik astrositom (III.derece) ve glioblastoma (IV.derece) olarak dört gruba ayrılırlar (Bedini ve diğ., 2019). III. ve IV. derece gliomalar, yüksek derece veya kötü huylu gliomalar olarak bilinirler ve kötü prognoza sahiptirler.

Glioblastoma multiforme (GBM) olarak da adlandırılan glioblastoma, en yaygın görülen ve en agresif seyreden kötü huylu primer beyin tümörüdür. Glioblastoma, vakaların %90'a yakınına oluşturan birincil GBM olarak da adlandırılan IDH (izositrat dehidrogenaz) yabani tipi ve %10 oranında vakayı temsil eden düşük dereceli bir gliomadan gelişen IDH mutant GBM olmak üzere iki gruba ayrılır. IDH yabani tipi glioblastoma, genellikle 50 yaş ve üzeri hastalarda ortaya çıkıp kötü prognoza sahip iken, IDH mutant GBM yabani tipe oranla daha iyi hayatta kalma oranına sahiptir (Yu ve Quail, 2021). Gliomaların yaklaşık %57'sini ve malign merkezi sinir sistemi tümörlerinin de %48'ini oluşturan glioblastomalar (Tan ve diğ., 2020), beynin herhangi bir lobunda ortaya çıkabilirken genellikle frontal ve temporal loblarda görülür ve beyin dışına metastaz yapmadıkları halde, beyin içinde çok hızlı yayılırlar. Glioblastomayı diğer tüm gliomalardan ayıran histolojik özellikler, canlı dokunun veya dokuya ait hücrenin ölümü olarak da bilinen nekrozun varlığı, tümör çevresindeki kan damarlarının oluşturduğu damarlanmanın artması ve bu sayede kazandığı invazyon yapma yeteneğidir.

Glioblastoma erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülürken, yeni teşhis edilen vaka sayısı yaşla beraber artmaktadır. Ortalama tanı konulma yaşı 65 olan GBM de, teşhisten sonra 5 yıllık sağ kalım oranı %10'dan azdır (Ostrom ve diğ., 2020).

Glioblastoma teşhisi genellikle bilgisayarlı tomografi (CT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile konulur. Glioblastoma tanısı konulan hastalarda tedavi için önce cerrahi rezeksiyon ile tümör alınır daha sonra tekrarlamaması için radyoterapi ve kemoterapi uygulanır. Kemoterapide Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi Başkanlığı (FDA) tarafından onaylanan temozolomid ve bevasizumab olmak üzere iki ayrı ilaç kullanılmaktadır. Yeni tanı konulmuş GBM hastalarının tedavisinde temozolomid uygulanırken, bevasizumab tekrarlayan GBM tedavisinde kullanılır (Huang ve diğ., 2021; Stupp ve Mason). Tümörler arası ve tümör içi heterojenitenin yüksekliği, bireysel değişkenlik, hastaların yaklaşık %50'sinin tedaviye dirençli olması ve temozolomidin hepatotoksisite ve kemik iliği supresyonuna neden olması, uygulanan terapötiklerin hedef dokuya geçişinde zorlanmasına sebep olan kan beyin bariyerinin varlığı GBM tedavisini zorlaştırmaktadır (Daher ve de Groot, 2018; Pibuel ve diğ., 2021).

Cerrahi rezeksiyon, radyoterapi, kemoterapi ve farmakoterapideki mevcut uygulamalar ve gelişmelere rağmen hala glioblastomada genel prognoz kötü olmaya devam etmektedir ve uzun süreli sağkalım nadirdir (Wen ve Reardon, 2016). Bu nedenle, glioblastoma hastalarından

alınan örneklerle yapılan araştırmalarda transkriptomik ve proteomik analizler yapılarak tanı ve tedavi için etkili ve uygun terapötikler bulmak ve geliştirmek hedeflenmektedir.

2.2. GLİKOZAMİNOGLİKANLAR

Hücre dışı matris (ECM), hücrelerin arasını kaplayarak dokulara sağladığı desteğin yanı sıra, matrisi oluşturan bileşenler sitokinler, büyüme faktörleri, hücre dışı reseptörler ile etkileşime girerek hücrenin önemli biyokimyasal fonksiyonlarını düzenlemesine aracılık eder. ECM yeniden modellenmesindeki bozukluk hücre yapısını değiştirerek doku homeostazisinin bozulmasına yol açar ve bu dengenin bozulmasının tümör invazyonu, metastaz, anjiyogenez ve immün sistemin baskılanması gibi kanser mekanizmalarının gelişimine sebep olduğu düşünölmektedir (Wei ve diğ., 2020). Hücre dışı matris, proteoglikanlar ve fibröz proteinlerden oluşur. Proteoglikanlar, neredeyse tüm dokuların hücrelerinde hücre zarında ve hücre içinde bulunan ECM'nin önemli bir bileşenidir. Proteoglikanlar bir çekirdek protein (core protein) ve kovalent olarak bağlanan glikozaminoglikanlardan oluşur.

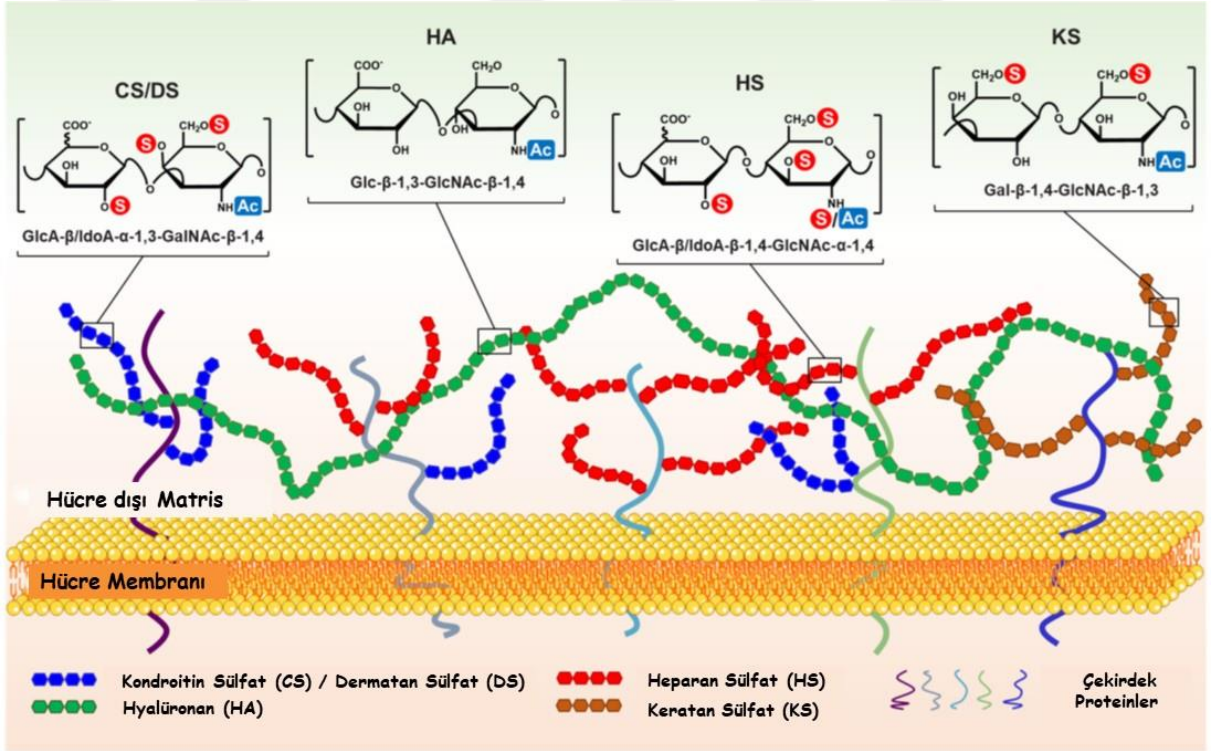
Glikozaminoglikanlar (GAG), negatif yüklü, doğrusal ve tekrar eden disakkarit birimlerinden oluşan karmaşık polisakkaritlerdir. Jelimsi yapıları nedeniyle mukopolisakkaritler olarak da adlandırılan GAG'lar, hücre dışı matriste hücrelerin yüzeylelerinde bulunur ve kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri, enzimler ile etkileşime girerler. Fizyolojik veya patolojik olaylarda yer alan proteinlerle etkileşime girerek önemli biyokimyasal mekanizmalara aracılık ettikleri için, glikozaminoglikanlar, kanser, multipl skleroz (MS), alzheimer, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş ve bu hastalıklarda terapötik olarak kullanılabileceği ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. İlk başlarda, glikozaminoglikanların sadece memeli hücrelerinde bulunduğu düşünölse de daha sonra yapılan araştırmalarda balık, böcek, maya ve bakteriler gibi birçok organizmalarda yer aldığı bulunmuştur (Khurshid ve Pye, 2018).

2.2.1. Glikozaminoglikanların Yapısı, Sınıflandırılması ve Fonksiyonu

Glikozaminoglikanlar, dallanmamış, sülfatlanmış veya sülfatlanmamış monosakkaritlerin meydana getirdiği birbirlerine glikozidik bağlarla bağlı tekrar eden disakkarit birimlerinden oluşan uzun polisakkarit zincirleridir. Glikozaminoglikanların, tekrarlayan disakkarit birimleri heksozamin grupları ve üronik asitler veya galaktozdan oluşur.

GAG'lar, yapılarında heksozamin grubu olarak N-asetilglukozamin (GlcNAc) veya N-asetilgalaktozamin (GalNAc) gibi glukozaminler, üronik asit olarak da D-glukoronik asit veya L-idüronik asit birimlerinden birini bulundurlar. Taşıdıkları amino şeker grubu 4. ve 6. karbonundan veya asetillenmemiş nitrojen grubu üzerinde sülfatlanabilir.

Heksozamin, üronik asit grubu veya sülfatlanma durumuna göre glikozaminoglikanlar, heparan sülfat (HS)/heparin, kondroitin sülfat (CS)/dermatan sülfat (DS), keratan sülfat (KS) ve hyalüronan (HA) veya diğer bilinen adıyla hyalüronik asit olarak dört ayrı gruba ayrılırlar. Glikozaminoglikanların yapıları, içerdikleri gruplara göre sınıflandırılması ve hücre dışı matriste dağılımları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Glikozaminoglikanların yapıları ve içerdikleri glukozamin, üronik asit veya galaktoz gruplarına göre sınıflandırılması ve hücre dışı matriste dağılımı (Wang ve Chi, 2022).

Epimerizasyon ve sülfasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlar glikozaminoglikanların yapısal çeşitliliğine neden olurken ligandlar için de spesifik bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır. Bu çeşitlilik glikozaminoglikanların hücre içinde farklı görevler üstlenmesine katkı sağlar.

Glikozaminoglikanlar golgi lümeninde bulunan çekirdek proteinler üzerinde spesifik enzimler tarafından sentezlenirken, sülfatlanmamış GAG türü olan hyalüronan hyalüronan sentaz (HAS) adı verilen transmembran proteini tarafından sentezlenir.

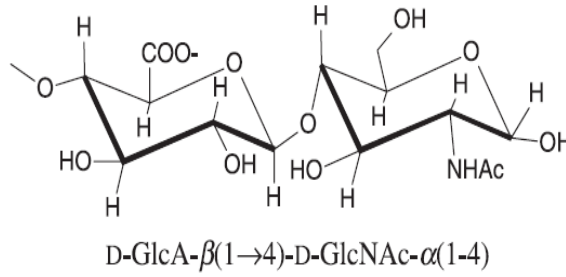
GAG'ların içerdikleri glukoronik asit ve N-asetilglukozamin/N-asetilgalaktozamin birimleri ya da kondroitin sülfatta bulunan galaktoz ve N-asetilglukozamin birimlerinin sülfasyonları ve epimerizasyonları Golgi cisimciğinde gerçekleşir.

İçerdikleri üronik asit gruplarında bulunan karboksilik asit birimleri ve sülfat gruplarının fizyolojik pH içinde protonlarından arındırılmış olması GAG'lara oldukça fazla negatif yük kazandırmıştır. Bilinen herhangi bir biyomolekül içinde en yüksek negatif yüke sahip olan glikozaminoglikanların bir türü olan heparindir (Gandhi ve Mancera, 2008).

İlk başlarda glikozaminoglikanların hücre içinde sadece bir yapı iskelesi görevi gördüğü düşünülse de, daha sonra yapılan çalışmalarda bağlandıkları enzimler, proteinler, sinyal molekülleri veya büyüme faktörleri yoluyla hücre sinyalizasyon yollarında, hücre büyümesi ve farklılaşması, antikoagülasyon, yara onarımında önemli rol oynadığı bulunmuştur (Casale ve Crane, 2019). Glikozaminoglikanların, etkileşimde bulunduğu protein sayısının 500'den fazla olduğu bulunmuştur (Casale ve Crane, 2019). Glikozaminoglikanlar enzim veya enzim inhibitörlerine bağlandığında enflamasyon ve koagülasyon, hücre dışı proteinlerine bağlandığında hücre adezyonu, büyüme faktörleri ile etkileşimde bulunduğu ise hücre migrasyonu gibi fizyolojik fonksiyonlara sahip olmaktadır (Morla, 2019).

2.2.2 Heparan Sülfat ve Heparin

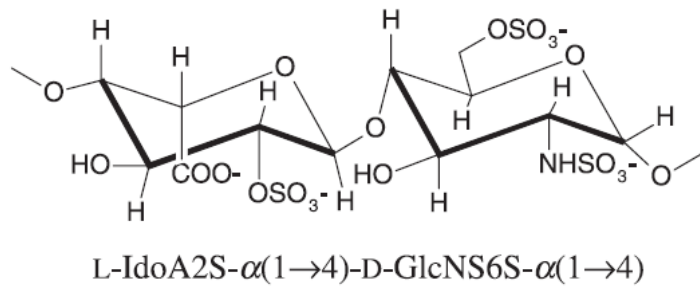
Heparan sülfat, bütün hücre ve dokularda bulunan birçok normal ve patolojik koşulda düzenleyici rol üstlenen glikozaminoglikan türüdür. Heparan sülfat tekrar eden disakkarit birimlerinde, D-glukoronik asit (GlcA) ve N-asetilglukozamin (GlcNac) içerir. Glukozamin biriminin amino grubunun yanı sıra hidroksil grupları da sülfonilasyon için uygun durumdadır. Heparan sülfatın yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Heparan sülfatın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).

Sülfatlanma motifleri, heparan sülfat zincirleri ile büyüme faktörleri, sitokinler ve proteinlerle etkileşimi ve bunun sonucunda biyolojik fonksiyonlarını etkilediğinden kritik öneme sahiptir. Heparan sülfat FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), HGF (Hepatosit Büyüme Faktörü), IGF (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü) ve EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) gibi büyüme faktörleri ile etkileşime girerek hücre adezyonu, invazyon, migrasyon ve EMT (Epitelyal Mezenkimal Geçiş) gibi süreçlerde rol oynamaktadır.

Heparan sülfat tüm hücrelerden sentezlenirken, heparin sadece bağ dokusu hücrelerinden olan mast hücreleri veya bazofillerden sentezlenirler. Heparan sülfatın heparine göre glukozamin birimi daha çok asetillenmiş ama sülfatlanma oranı daha azdır. Tekrar eden disakkarit birimlerinde, N-asetilglukozamin ve iduronik asit bulunduran heparinin yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Heparinin yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).

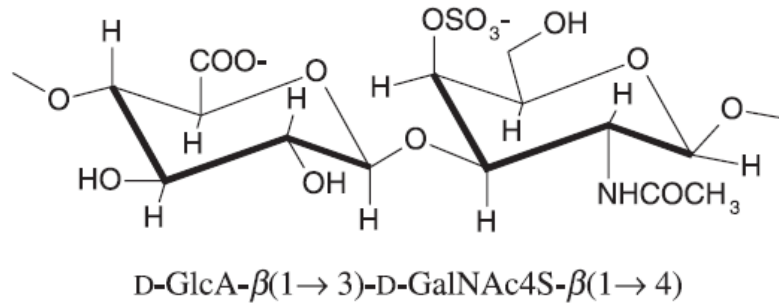
Heparinin sülfatlanma derecesinin yoğunluğu sebebiyle daha hidrofilik olması bir çözelti içerisinde geniş konformasyona sahip olmasına neden olur. Heparin, tromboz ve emboli tedavisinde antikoagülan olarak kullanılan ilk glikozaminoglikan temelli ilaçtır (Rabenstein, 2002).

Heparan sülfat (HS) zincirleri bir çekirdek proteine bağlanıp, hücre zarında eksprese edilip hücre dışı matrise bırakılan veya ekstraselüler veziküller ile salgılanan heparan sülfat proteoglikanlarını (HSPG) oluştururlar (Faria-Ramos ve diğ., 2021). HSPG'ler hem hücre yüzeyinde hem de bazal membranda bulunabilirler. Heparan sülfat proteoglikanları (HSPG), tümör hücrelerinin migrasyonu ve invazyonu, apoptozdan kaçınması gibi tümör oluşumunun tüm basamaklarında önemli rol oynaması nedeniyle anti kanser tedavisi için potansiyel farmasötik aday ve bu sebeple en iyi çalışılan GAG'lardan biri olmuştur.

Melanom gibi malignite durumunda, heparan sülfatı parçalayan enzim olan heparanazın etkisiyle hücre dışı matristeki heparan sülfatın bozunması, malign hücrelerin göçüne ve metastaza yol açar. Bu mekanizma, kanser metastazının önlenmesi için heparanaz ve heparan sülfatı uygun farmakolojik hedefler haline getirir (Afratisve diğ., 2012).

2.2.3 Kondroitin Sülfat ve Dermatan Sülfat

Kondroitin sülfat, β (1 \rightarrow 3) ve β (1 \rightarrow 4) glikozidik bağlarıyla bağlanan D-glukoronik asit ve N-asetilglukozamin içeren GAG türüdür.



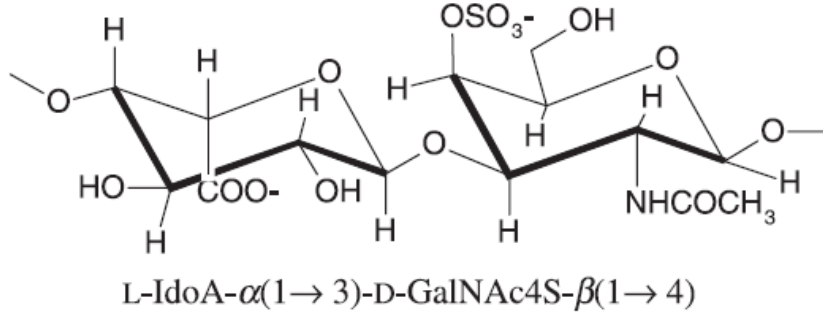
Şekil 2.4: Kondroitin sülfatın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).

Kemikleri diğer kemiklere bağlayan fibröz bağ dokusu olan ligaman, kıkırdak, tendon ve hatta aort damarında bulunan kondroitin sülfat (CS) zincirleri, vücutta en çok bulunan glikozaminoglikanlardır.

Kolajen gibi proteinlere bağlanarak oluşturdukları kondroitin sülfat proteoglikanları (CSPG'ler), yüksek oranda negatif yüke sahip yan zincirleri sayesinde apoptoz, proliferasyon, migrasyon, adezyon ve invazyon gibi hücresel süreçleri düzenler. Versikan ve dekorin başlıca

CSPG'lerdir ve osteosarkom, testis tümörleri, meme, pankreas ve kolon kanseri dahil olmak üzere çok çeşitli malign tümörlerin stromasında aşırı eksprese edilirler (Afratisve diğ., 2012).

Kalp kapakçıkları, kan damarları, deri gibi kısımlarda bulunan dermatan sülfat (DS), yapısında L-iduronik asit ve N-asetilgalaktozamin içeren bir glikozaminoglikan türüdür (Şekil 2.4).

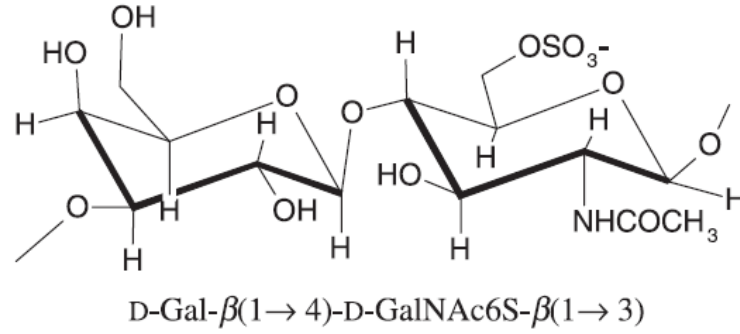


Şekil 2.5: Dermatan sülfatın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).

Dermatan sülfatın iduronik asit içeriği kanser hücrelerinin migrasyon kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir (Thelin ve diğ., 2012).

2.2.4 Keratan Sülfat

En heterojen yapıya sahip glikozaminoglikan türü olan keratan sülfat (KS), kornea ve beyin gibi daha çok epitel, kıkırdak ve nöral dokularda ifade edilir ve Alzheimer, skleroz ve kanser gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Keratan sülfat I ve keratan sülfat II olmak üzere iki ayrı gruba ayrılır. Keratan sülfat I korneada bulunurken, keratan sülfat II kondroitin sülfatla birlikte kıkırdak dokuda bulunur. Keratan sülfat zincirleri yapılarında üronik asit birimi yerine galaktoz ve N-asetilgalaktozamin içerir. Keratan sülfatın yapısı Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

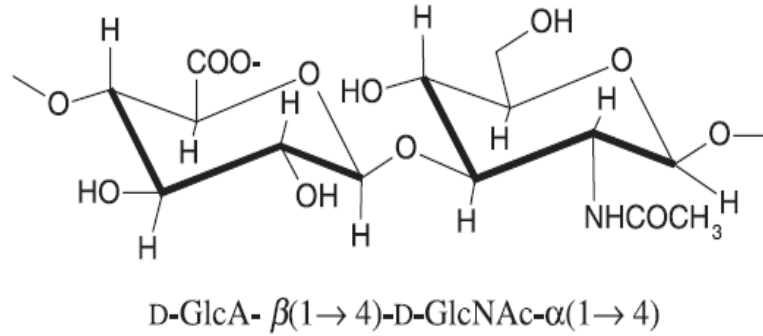


Şekil 2.6: Keratan sülfatın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).

2.2.5 Hyalüronan (Hyalüronik Asit)

En basit yapıya sahip glikozaminoglikanlardan olan hyalüronan (HA) veya bilinen diğer adıyla hyalüronik asit, doğrusal, diğer türlerinin aksine sülfat grubu bulundurmayan ve çekirdek proteine bağlanmayan tek GAG türüdür.

Hyalüronanın yapısında N-asetilglukozamin ve D-glukoronik asit bulunur (Şekil 2.6). Sülfat grubu da olmadığı için en az negatif yüke sahiptir ve bakteri hücrelerinde bile hyalüronana rastlanabilir. Genellikle sinoviyal sıvıda, gözün içini doldurarak gözü besleyen ve gözün şeklini korumasına yardımcı olan vitröz hünerde, gevşek bağ dokusunun hücre dışı matrisinde bulunur.



Şekil 2.7: Hyalüronanın yapısı (Gandhi ve Mancera, 2008).

HA'nın varlığı, birçok insan kanseri türünde malignite ile ilişkilidir. HA'nın kanser ilerlemesindeki işlevleri, tümör stromasındaki büyüklüğüne ve miktarına göre değişir (Tammi ve diğ., 2011).

HA, meme, akciğer ve yumurtalık kanseri gibi adenokarsinomlarda yüksek seviyelerde ifade edilmektedir. Buna karşın, hyalüronan içeriği skuamöz hücreli karsinom ve melanomda düşüktür ve yokluğu doğrudan metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmiştir.

2.3 GLİKOZAMİNOGLİKANLAR VE KANSER

Dünya genelinde ikinci ölüm nedeni olarak kabul edilen kanser, hücrelerin büyümesi çoğalması ve apoptozu arasındaki homeostazinin bozulup kontrolsüz çoğalmaları sonucu oluşur. Kontrolsüz çoğalma ve farklılaşmanın yanı sıra kanserin farklı doku veya organlara kan ve lenf yoluyla invazyon ve metastaz yapma yetenekleri de vardır.

Kanser oluşumu, büyümesi, invazyon ve metastaz süreçlerinde tümör ve tümör mikro çevresi arasında belirli etkileşimler rol oynamaktadır.

Glikozaminoglikanlar ve bir çekirdek proteine bağlanarak oluşturdukları proteoglikan yapılar tümör mikro çevresi ve hücre yüzeyinde önemli belirleyiciler olarak, çeşitli büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörü, sitokinler ile etkileşime girerek tümör büyümesi, invazyon, metastaz, infiltrasyon gibi kanserle ilişkili mekanizmalarda ve buna ek olarak tümör oluşumunun engellenmesinde önemli rol oynamaktadır (Poltavets ve diğ., 2018). Bu nedenle, GAG'ların kanser tedavisinde önemli terapötikler olarak kullanabileceği düşünülmektedir.

Heparan sülfat (HS) ve heparan sülfat proteoglikanları apoptoz, hücre farklılaşması, doku invazyonu, anjiyogenez ve migrasyon gibi türlü kanser hücresi fonksiyonunu düzenler (Blackhall ve diğ., 2001). Heparan sülfatın hücreler arası ve hücre ile hücre dışı matris arasındaki adezyonu teşvik, invazyon ve metastazı inhibe ettiği ve ayrıca düşük seviyelerde HS bulunan kötü huylu tümörlerin daha invaziv olduğu gösterilmiştir (Onyeisi ve diğ., 2020).

Heparan sülfat zincirlerinin çekirdek proteine bağlanmasıyla oluşan, tüm memeli hücrelerin yüzeyinde ve hücre dışı matrisinde bulunan heparan sülfat proteoglikanlardan (HSPG) perlekan, sindekan ve gliplikanın hücre davranışının düzenlenmesi ve kanser oluşumunda ana moleküller olduğu ve birçok kanser türünde diferansiyel olarak ekspresye edildiği ortaya konulmuştur. Perlekan ekspresyonunun invaziv ve metastatik prostat kanserinde yüksek oranda ifade edildiği bulunmuştur (Datta ve diğ., 2006). Yukinari ve arkadaşları tarafından histokimya kullanılarak yapılan araştırmada, bir başka glikozaminoglikan türü olan keratan sülfatın malign astrositik tümörlerde çok fazla ekspresye edildiği bulunmuştur (Kato ve diğ., 2008).

Kondroitin sülfat ve dermatan sülfat zincirlerinin ise kanser hücrelerinde invazyon, apoptoz, migrasyon, adezyon gibi kritik hücre mekanizmalarında etkin rol oynadığı ortaya konulmuştur (Mikami ve Kitagawa, 2013).

Kondroitin sülfatın CS/DS yan zincirlerinin çekirdek (core) proteinlere bağlanarak oluşturdukları kondroitin sülfat proteoglikanları (CSPG'ler) malignitede önemli rol oynayan hücre dışı matriste bazı etkileşimlerde bulunurlar.

Bir kondroitin sülfat proteoglikanı olan versikanın hücre içinde artan ifadesi erken evre meme kanseri ve prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Morla, 2019). En agresif seyreden cilt kanseri türü olan melanom durumunda, integrin fonksiyonunu arttırarak Erk1/2 aktive eden böylece hücre büyümesi ve hareketliliğini uyararak melanomla ilişkili kondroitin sülfat proteoglikanlarının seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Yang ve diğ., 2009).

Hyalüronanın artan seviyeleri meme, yumurtalık ve akciğer gibi çeşitli kanser türlerinde görülmüştür. Tümör mikroçevresinde bulunan büyüme faktörleri ve kemokinler hyalüronan (HA) üretimini uyardığı, diğer taraftan skuamöz hücreli karsinom ve melanoma da metastatik potansiyel ile HA'nın düşük seviyeleri ilişkilendirilmiştir (Tammive diğ., 2011). Hyalüronanın daha küçük oligosakkaritlere hyalüronidazlar tarafından parçalanmasının, meme, yumurtalık, glioma ve kolon kanserlerinde görüldüğü gibi, tümörün ilerlemesine yol açan, tümör mikroçevresinde hücre migrasyonu ve adezyonunda da önemli rol oynayan bir glikoprotein olan CD-44'ün parçalanmasını indüklediği ortaya konulmuştur (Morla, 2019).

Yapılan bir çalışmada, malign astrositik tümörlerde keratan sülfat zincirlerinin yüksek oranda sülfatlandığı raporlanmıştır (Yan ve Wang, 2020). Buna ek olarak keratan sülfatın anormal ifade edilmesinin pankreatik kanser oluşumu ve metastazı için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.(Leiphrakpam ve diğ., 2019).

Glikozaminoglikanların ve kovalent olarak bağlandıkları proteinlerle oluşturdukları proteoglikanların tümör hücrelerinin aktivitesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Bu sebeple GAG analoglarının geliştirilerek etkileşimlerinin inhibe edilmesinin kanser tedavisi açısından yeni bir tedavi seçeneği doğurabileceği düşünülmektedir (Chhabra ve diğ., 2021).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BALIK PULLARINDAN GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN EKSTRAKSİYONU

Ticari olarak temin edilmiş levrek balığından (*Dicentrarchus labrax*) elde edilen 62 gr balık pulu aseton ile öğütülüp, filtreden süzülüp ve 60°C’de 24 saat kurutulmuş olarak yağdan arındırıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Levrek balığından (*Dicentrarchus labrax*) elde edilen kurutulmuş balık pulları.

Kurutulmuş balık pullarından 20 gr tartıp alınarak 5 mM EDTA (Invitrogen 15576-028) ve 5 mM sistein içeren 100 mM sodyum asetat (Panreac AppliChem A4555) tampon çözeltisi (1g/10 ml, pH:5.5) içinde çözdürüldü. Her bir gram doku için 60 mg papain (Sigma-Aldrich 9001-73-4) eklenen solüsyon çalkalayıcıda 60°C’de 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra, 10 dakika boyunca kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan karışım 50 mL’lik falkon tüpler içerisine alınıp 5000xg’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet ortamdan uzaklaştırılıp, süpernatant miktarına göre üç hacim sodyum asetat ile doymuş etanol (EtOH) ilave edildi ve 4°C’de 24 saat beklemeye bırakıldı. 24 saat sonunda karışım 50 mL’lik falkon tüpler içine alınarak 5000xg’de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım uzaklaştırılarak tüpler içinde peletler toplandı. Toplanan peletler 60°C’de 6 saat kurutuldu. Kurutulmuş glikozaminoglikan örnekleri falkon tüp içerisinde -20°C’de saklandı. Deney sonunda 20 gr balık pulundan yaklaşık 530 mg glikozaminoglikan elde edildi. Elde edilen glikozaminoglikanlardan, deney çalışmalarında kullanmak üzere 100 mg tartılıp 1,5 ml eppendorf tüp içerisinde 100 mg/ml olacak şekilde 1 ml DMSO (dimetil sülfoksit) ile

çözdürüldü ve -20°C’de saklandı. Levrek balığından elde edilen balık pullarından izole edilen glikozaminoglikanlar Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*) pullarından izole edilen glikozaminoglikanlar.

3.2. KULLANILAN HÜCRELER VE HÜCRE KÜLTÜRÜ KOŞULLARI

Deneylerde İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü bünyesinde bulunan hücre kültürü koleksiyonundan alınan insan glioblastoma hücreleri olan U87MG hücre hattı kullanıldı.

37 °C ‘de ve %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi ve çoğalma ve besiyeri durumuna göre belirli aralıklarla alt kültürlemeleri yapıldı. Deneyler genellikle pasaj numaraları 3 ile 10 arasında değişen hücrelerle yapıldı.

3.2.1. Hücrelerin Alt Kültürlenmesinde Kullanılan Besiyerleri

İnsan glioblastoma U-87MG hücreleri için L-Glutamin, 4.5 g/L D-glukoz ve pirüvat bulunan “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium / High Glucose” (DMEM/ High, Gibco 41966) besiyeri kullanıldı. Bu steril besiyeri solüsyonuna %10 (v/v) Fetal Sığır Serumuna (FBS, Gibco 10500) ve %1 (v/v) antibiyotik içeren karışım (100 µg /mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, 0.25 µg/mL amfoterisin B, Sigma-Aldrich A5955) eklendi.

3.2.2. Hücrelerin Alt Kültürlenmesi

İnsan glioblastoma U-87MG hücrelerinin alt kültürlemeleri laminar hava akımlı steril kabinde (Heal Force HFsafe-1200 version 2.01) sırasıyla aşağıda anlatılan işlemler yapılarak gerçekleştirildi (Freshney, 2015).

Hücelere daha önceki başlıkta ifade edildiği üzere FBS ve antibiyotikli karışım eklenerek hazırlanmış içeriği hücreler için zengin hale gelmiş DMEM/High Glucose besiyerleri eklenip alt kültürlemeleri yapılarak devamlılıkları sağlandı. Alt kültürlemede kullanmak amacıyla 9.6 g/L dH₂O'da çözündürülerek hazırlanan izotonik bir tuz çözeltisi olan D-PBS ("Dulbecco's Phosphate Buffered Saline", pH 7.2, Sigma-Aldrich D5652), sonrasında 121°C'de, 1.2 atmosfer basınç altında 15 dakika otoklavlanarak (Nüve OT 012 Bench Top Unit Steam Sterilizer) steril hale getirildi. Yaklaşık %70 konfluent olan hücrelerin alt kültürlemeleri başlatıldı. Alt kültürleme işleminde ilk olarak 25 cm² yüzey alanına sahip T-25 hücre kültür kabı içindeki yaklaşık 8 mL olarak bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Bu işlemi takiben, hücreler besiyeri içerisindeki tripsin aktivasyonunu inhibe eden serum kalıntılarını ortadan kaldırmak için yaklaşık 10 mL D-PBS solüsyonu ile yıkandı.

Sonrasında uygulanan D-PBS ortamdan uzaklaştırılarak hücreleri kültür kabı yüzeyinden kaldırmak ve hücrelerin yüzeye tutunmalarını sağlayan katyonları yok etmek için D-PBS ile birlikte hazırlanan Trypsin/EDTA (1 mL, Gibco, 25200056) hücelere uygulandı ve hücreler hemen sonra 3 dakika boyunca 37°C'lik etüvde bekletildi.

3 dakika sonunda tripsin uygulanmış hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskopla kontrol edilip, tutundukları yüzeyden ve birbirlerinden uzaklaşan hücelere, tripsini inaktive etmek amacıyla cm² başına 0.2 mL olacak şekilde (yaklaşık 5 mL) taze besiyeri eklenerek, tripsinin aktivitesi sona erdirildi ve hücreler süspansiyon haline getirildi.

Bu adımdan sonra oluşan süspansiyondan 10 µL alınarak bir hemositometre yolu olan Neubauer lamı kullanılıp mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Sayımı yapılan hücelere son hacim 10 mL olacak şekilde uygun besiyeri eklendi ve hücreler yeni bir kültür kabına alınarak alt kültürleme işlemi tamamlandı ve hücreler %5 CO₂ ve de %90'dan nem oranına sahip 37°C'lik etüve (Thermo Scientific, Heracell™ 150i) kaldırıldı. Hücrelerin devamlı hale gelebilmesi için belirli aralıklarla kontrol edilip, tam olarak konfluent olmadan yaklaşık her 3 günde bir alt kültürlemeleri yapılmış ve hücrelerin sürekliliği sağlanmıştır.

3.2.3. Hücre Üreme Profil Analizi

U-87MG insan glioblastoma hücrelerinin hücre üreme profili analizi yapılarak hücrelerin çoğalma eğrileri ve jenerasyon süreleri elde edildi. Her bir mL içerisinde 5×10^4 ve 1×10^5 hücre olacak şekilde hücreler 24 kuyucuğa sahip kültür plakalarına ekildi ve 10 gün süresince kültürün başlatıldığı saatte hücrelerin sayım işlemi gerçekleştirildi.

İlk önce 24 kuyucuklu kültür kabına ekimi yapılmış ve yüzeye yapışmış hücrelerin adezyonunu ortadan kaldırmak için besiyeri uzaklaştırıldı. D-PBS ile yıkayıp tripsin inhibitörünü yok ettikten sonra tripsinizasyon işlemi için uygun miktarda tripsin ekleyip 37°C etüvde yaklaşık 3 dakika hücrelerin yüzeyden kalkmaları beklendi. Mikroskop altında kontrol edildikten sonra hücrelerin üzerine tripsin aktivitesini inhibe etmek amacıyla taze besiyeri eklenerek süspansiyon hale getirildi. Hücreleri saymak için D-PBS kullanılarak hazırlanan tripan mavisi [Merck 111732, %0.5 (w/v)] kullanıldı. Eppendorf tüp içerisinde 1:1 (v/v) oranında toplamda $40 \mu\text{L}$ olacak şekilde süspansiyon hale getirilmiş hücreler ile karıştırılarak tripan mavisi hazırlandı.

Mikroskopta tripan mavisini ölü oldukları için geçiren hücreler mavi gözlenirken, canlı hücreler boyayı geçirmediği için şeffaf görüldü ve hemositometre yardımıyla sayımları renk ayrımı gözetilerek yapıldı. Üç tekrar yapılarak sayımı gerçekleştiren hücrelerden elde edilen verilerle GraphPad Prism® versiyon 7.01 programında XY grafiği (absiste zaman-gün, ordinatta hücre sayısı/mL) çizdirilerek üreme profili analizi yapıldı. Denklem 3.1 ve 3.2 kullanılarak çoğalma eğri grafiklerine bakılarak jenerasyon sayısı ve süresi hesaplandı.

$$n = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2 \quad (3.1)$$

n: Jenerasyon sayısı

N₂: Logaritmik bölme aşamasının sonundaki hücre sayısı

N₁: Logaritmik bölme aşamasının başlangıcındaki hücre sayısı

$$G_t = (T_2 - T_1) / n \quad (3.2)$$

G_t: Jenerasyon süresi

T₂: Logaritmik bölme aşamasının bitiş zamanı

T₁: Logaritmik bölme aşamasının başlangıç zamanı

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Pasaj işleminde yaptığımız gibi sırasıyla besiyeri uzaklaştırılan hücelere D-PBS uygulanıp tripsinizasyonu sağlandı. 3 dakika boyunca 37°C etüvde bekleyen tripsin-EDTA uygulanarak kültür kabı yüzeyinden ayrılması sağlanan hüceler 15 mL'lik santrifüj tüpüne besiyeri eklenerek alındı. Daha sonra 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj (Nüve, NF400) edildi. Santrifüj sonunda tüpün dibinde hücelerden oluşan pelete dokunmadan üzerinde bulunan besiyeri aspire edildi ve %45 (v/v) FBS, %45 (v/v) besiyeri ve %10 (v/v) DMSO (dimetil sülfoksit) içeren hücre dondurmak amacıyla kullanılan solüsyon eklenip hüceler süspansiyon hale getirildi. Pasaj numarası, hücre adı ve tarihi üzerinde belirtilen kryo tüplerin içine alınan hüceler, ilk önce -20°C'de donduruldu. Daha sonra uzun süre saklamak için -156°C'de muhafaza edildi.

3.3. SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ

Deniz levreğinden (*Dicentrarchus labrax*) elde ettiğimiz balık pullarından izole edilen glikozaminoglikanlar, bu tez çalışması kapsamında sitotoksosite analizi için U-87MG hücelerine uygulanmak üzere kullanıldı.

Glikozaminoglikanların U87MG insan glioblastoma hüceleri üzerinde sitotoksik etkilere sahip olup olmadığını anlamak amacıyla Mosmann (1983) tarafından önerilen yöntem takip edilerek hücre canlılığı ve sitotoksitesini ölçmek için MTT kolorimetrik yöntemi uygulandı. Bu yöntem temel alınarak yapılan analizde canlı hücelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimi aracılığıyla uygulanan MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum) içerisinde bulunan tetrazolyum bileşiği suda çözünmeyen formazan kristallere dönüşürler.

Oluşan bu formazan kristallerini çözündürmek amacıyla hücelere DMSO uygulanır ve canlı ve metabolik olarak aktif hüceler tarafından oluşturulan formazan kristalleri DMSO eklendiğinde mor renkli olarak gözlemlenir ve spektrofotometrede 540 nm'de ortaya çıkan dalga boyu ölçülür.

Glikozaminoglikanların belirlenen konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µg/mL) U-87MG hücelerine uygulandıklarında neden oldukları sitotoksik etkiyi hesaplayabilmek için, hüceler 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına sayımı yapılarak hazırlanmış hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak her bir kuyucukta 10⁵ hücre/mL olacak şekilde ekildi.

%90'dan fazla bağıl nemin bulunduğu %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat süresince ekimi yapılan hücreler inkübasyona tabii tutuldu. 24 saat sonrasında, kuyulardaki son hacim 200 µL olacak şekilde kontrol grubuna taze besiyeri eklendi ve hesaplanan konsantrasyonlara göre besiyeri ile birlikte hazırlanmış glikozaminoglikan karışımı sitotoksisite analizi yapmak amacıyla hücrelere uygulandı. 24, 48 ve 72 saat boyunca olan etkisini hesaplamak için uygulama sonrası 37°C'lik etüvde inkübe edildi.

Her 96 kuyucuğa sahip hücre kültür kabı için, belirlenen 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonunda MTT sitotoksisite testi uygulandı. MTT (Sigma M5655) stok solüsyonu 5 mg/mL oranında olacak şekilde D-PBS içinde hazırlandı. Inkübasyon süresi biten hücreler etüvden alınarak, üzerlerindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve 30 µL MTT uygulandı. MTT ışığa hassas bir madde olduğu için uygulama sırasında ışığa maruz kalmamasına dikkat edildi. MTT uygulaması yapılan hücreler tekrar etüvde yaklaşık 3 saat beklemeye alındı. Metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından tetrazolyum bileşiğinden oluşacak olan formazan kristallerini çözündürmek amacıyla 3 saat sonunda, hücrelere 150 µL DMSO uygulandı ve homojenizasyonu için oda sıcaklığında çalkalayıcıda (150 rpm, Heidolph Unimax 1010) çalkalandı.

Oluşan mor renkli formazan kristali taşıyan solüsyon iyice homojen olduğunda, mikropilaka okuyucu (EON, BioTek Instruments Inc.) ile 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu değerleriyle karşılaştırılması yapılarak, hücre canlılığı oranı Denklem 3.3 kullanılarak % şeklinde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = (AD / AK) \times 100 \quad (3.3)$$

AD: Deney grubu absorbansı

AK: Kontrol absorbansı

En az 6 tekrarlı yapılan MTT analiz sonuçlarına göre, tez çalışmasında kullanılacak maddenin U-87MG hücreleri üstünde uygulanması gereken dozları belirlendi.

3.3.1 Glikozaminoglikan Uygulanan Hücrelerin Sitotoksosite Analizleri

96-kuyucuklu hücre kültür kaplarına her kuyuda 10^5 hücre/mL olacak şekilde hemositometre yardımıyla sayımı yapılmış süspansiyon edilen hücrelerden 100 μ L alınarak glikozaminoglikanların U-87MG hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini ölçmek amacıyla hücre ekildi.

Ekimi yapılmış hücreler daha sonra, yüzeye iyice tutunup fikse olmaları için 24 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C ısıya sahip etüve kaldırılarak inkübe edildi. 24 saat sürenin sonunda, hücreler etüvden alınarak, kontrol gruplarına son hacim 200 μ L olacak şekilde sadece taze besiyeri eklendi. Glikozaminoglikanların 1,5,10,25,50,100,250,500,750,1000 μ g/mL olacak şekilde dozları hesaplanan konsantrasyonlarla besiyeri ile birlikte hazırlanıp yine son hacmi 200 μ L'ye tamamlayarak deney grubunda bulunan hücrelere uygulandı. Glikozaminoglikanların, U-87MG insan glioblastoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi 24,48,72 saat sonunda ayrı ayrı ölçüldü ve sitotoksik etki 72 saatin sonunda saptandı.

3.4. MADDE UYGULAMALARI

Bir sitotoksosite testi olan MTT testi sonucunda elde edilen veriler kullanılarak yapılan hesaplama ile uygun dozların hücrelere uygulanması için 6 kuyucuğa sahip hücre kültürü kaplarına U-87MG hücreleri her kuyuda 10^6 hücre/mL olacak şekilde 2 mL hücre süspansiyonundan alınarak ekilip, 37°C etüvde 24 saat boyunca inkübe edildi. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda kontrol grubu olan hücrelere son hacmi 3 mL tamamlayacak şekilde sadece taze besiyeri eklendi.

Sitotoksosite testi sonucunda glikozaminoglikanların hücre canlılığını %20 ve %50 oranında etkileyen 600 μ g/mL ve 1000 μ g/mL olarak seçilen dozları deney gruplarına uygulandı.

3.5. HÜCRE MİGRASYON ANALİZİ

Hücrelerin migrasyon yeteneklerini analiz etmek için 24 kuyucuğa sahip hücre kültürü kaplarına her kuyuda her bir cm² de 30000 hücre olacak şekilde 500 μ L besiyeri ile süspansiyon edilen U-87MG hücrelerinin ekimi yapıldı. Daha sonra 5% CO₂ içeren ve içerisinde %90'dan fazla bağıl nem olan 37°C sıcaklığa sahip etüv içerisinde 24 saat boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon süresinin sonunda, 24 kuyucuğa sahip hücre kültürü kabı uygulama şeklimize göre kontrol, 600 µg/mL ve 1000 µg/mL olacak biçimde gruplara ayrıldı. Hücrelerin bulunduğu kuyucukların merkezini de içine alacak şekilde yukarıdan aşağıya ve soldan sağa olmak üzere 1 ml pipet ucu yardımıyla birbirine dik olacak şekilde yavaş ve dikkatle iki çizik çizildi. Çizikler oluşuktan sonra üzerlerindeki besiyerleri uzaklaştırılarak her grubun ayrı ayrı görüntüleri ters ışık mikroskobu (Nikon Eclipse Ti-E) ile alındı.

Görüntüleri alınan hücrelerde kontrol grubuna sadece taze besiyeri eklenirken, 600 µg/mL ve 1000 µg/mL olan deney gruplarına ise hesaplanan oranda besiyeri ile karıştırılmış glikozaminoglikanlar kuyularda ki son hacim 1 mL olacak şekilde uygulandı. 0., 24. ve 48. saatlerde çizik oluşan hücrelerin migrasyon görüntüleri ters ışık mikroskobu ile alındı ve Image J (NIH, ABD) programı yardımı ile alınan görüntülerin analizleri yapıldı.

3.6. HOECHST VE PROPİDİUM İYODÜR (HO/PI) BOYAMASI

Uygulanan madde sonucu oluşan apoptotik yanıtları analiz etmek amacıyla canlı ve ölü hücreleri ayırt edebilmeye yarayan bir yöntem olan Hoechst ve propidium iyodür (HO/PI) boyaması yapıldı. DNA'nın adenin-timin bakımından zengin bölgelerine bağlanarak hücre çekirdeğini mavi renge boyayan bir floresan boya olan Hoechst-33342 (HO, H-1399, Invitrogen) canlı ve ölü hücrelerin membranlarından geçebilirken, Propidium iyodür (PI, P1304MP, Invitrogen) bazlar arasına girerek DNA'ya bağlanan ancak yalnızca membran bütünlüğü kalmamış ölü hücreleri kırmızı renge boyayan floresan boyadır. Hücreler 8 kuyucuğa sahip kültür slaytlarına (Nunc™ Lab-Tek™ II, Thermo) apoptotik hücreleri normal hücrelerden ayırt etmek için yapılan analiz için ekildi ve 37°C'lik etüv içerisinde 24 saat boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon işlemi sonrasında, hücreler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılıp, kontrol grubuna sadece besiyeri deney gruplarına ise belirlenen dozlarda madde uygulaması yapıldı ve Hoechst ve propidium iyodür (HO/PI) boyaması için 72 saat boyunca 5% CO₂ içeren ve %90'dan fazla bağıl nem içerisinde 37°C'lik etüvde bekletildi.

Madde uygulamasından 72 saat sonra, hücreler üzerindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp, hücreler D-PBS ile yıkandı. Son konsantrasyonları 5 µg/mL olacak şekilde HBSS ("Hank's

Balanced Salt Solutions) içerisinde süspansiyon edilmiş HO ve PI boya ları hücrelere uygulandı ve 30 dakika boyunca 37°C'de etüvde inkübe olması için bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonrasında, boyama yapılan hücreler boyalar az da olsa toksik olduğu için D-PBS ile yıkandı ve daha sonra kuyucukların üzerinde bulunan aparat söküldü. Aparat çıkarıldıktan sonra kalan D-PBS varsa ortamdan uzaklaştırılıp iyice kuru olması sağlandıktan sonra, %90 gliserol geride kalan lam üzerinde bulunan hücrelere birer damla şeklinde uygulanarak hücrelerin üzeri gliserol ile kapatıldı.

Daha sonra lamel ile dikkatlice tek seferde oturtularak lamın üzeri kapatıldı. Apoptotik hücre yanıtları Olympus BX53 (Tokyo, Japonya) floresan mikroskopu ile uygun filtre sistemleri kullanarak tespit edildi ve Olympus DP73 (Tokyo, Japonya) dijital kamera ile görüntüleri elde edildi. Fotoğrafları çekilen ölü ve apoptotik hücrelerin sayımı yapıldı ve toplam hücrelerin sayıları ile canlı hücrelere olan oranları çekilen fotoğraflarda apoptotik ve ölü hücreler sayıldı ve toplam hücre sayıları Image J programı kullanılarak belirlendi.

3.7. HÜCRE TOPLAMA

Ekimi yapılan hücrelere sitotoksik analizlere göre uygun dozlarda madde uygulandı ve belirlenen sürede inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonrasında, hücreleri hücre kültürü kabından toplamak için önce kuyucuklar içindeki besiyeri ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldı. Tripsinizasyon işlemi öncesi besiyeri içinde bulunan FBS'deki tripsin inhibitörünü etkisiz hale getirmek için hücreler yaklaşık 300 µL D-PBS ile yıkandı. Daha sonra D-PBS aspire edilerek, hücrelere Tripsin/EDTA uygulandı ve hücre kültür kabına tutunan hücrelerin yüzeyden kalkmaları için hücreler 3 dakika boyunca 37°C'lik etüvde tutuldu. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları mikroskop altında kontrol edildikten sonra, tripsini inhibe etmek için hücrelere belirli miktarda besiyeri eklendi.

Hücrelerin birbirinden ayrılması ve yüzeyden kalkması için hafifçe kenarlardan ve hücre kültür kaplarının yüzeyinden hücrelere zarar vermeden kazıyarak pipetaj yapıldı. Yüzeyden ayrılarak besiyeri içinde süspansiyon olan hücreler 1,5 mL hacime sahip steril tüpe alındı ve 3 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücreler üzerinde bulunan süpernatant pelete dokunmadan aspire edildi. Besiyeri ve kalıntılarını ortamdan tamamen uzaklaştırmak için 1 mL soğuk D-PBS pelet üzerine eklenerek pipetaj yapılarak yıkanan hücre peleti süspansiyon

hale gelince, tekrar 3 dakika süresince 5000 rpm'de santrifüjlendi. Daha sonra hücrelerin oluşturduğu pelete zarar vermeden D-PBS ortamdan uzaklaştırıldı ve tüpler içerisinde toplanan hücreler deney çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.8. SUDA ÇÖZÜNEBİLİR HÜCRESEL PROTEİNLERİN İZOLASYONU

Hücreleri topladıktan sonra elde ettiğimiz hücre peletlerinin yoğunluğuna göre yaklaşık 100-150 µL soğuk (4°C) RIPA [25 mM Tris (Sigma T1503)-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl (Merck 106400), %1 (v/v) NP-40 (AppliChem A1694), %1 (w/v) sodyum deoksikolat (Sigma D6750), %0.1 (w/v) SDS (AppliChem A2263) EDTA'dan içermeyen proteaz inhibitör kokteyli (1 tablet/50 mL Roche 11873580), ve izolasyon yaparken proteinlere zarar vermemek amacıyla bir proteaz inhibitörü olan 1 mM PMSF'yi (fenilmetilsülfonil florür, AppliChem A0999)] kullandığımız RIPA miktarına göre %1 oranında ekleyip karışımı süspansiyon haline getirerek protein izolasyonu yapıldı. Hücrelerin tamamen parçalanması için 1 mL insülin enjektörleri ve ultrasonik su kullanılıp hücrelerin mekanik parçalanması sağlandı. Enjektör yardımıyla mekanik olarak parçalanma işlemine tabii tutulan hücreler, ultrasonik su banyosu (WiseClean-Daihan WUC-D10H) ve buz içinde tutularak parçalanması gerçekleştirildi. Her bir örnek için 3 tekrar olacak şekilde yinelenen bu işlem sonrası, hücrelerin parçalanmasıyla elde edilen homojen karışım 4°C'de 20000 rpm hızda 20 dakika boyunca santrifüjlendi (Sigma 3-30K).

Santrifüj sonrası elde edilen suda çözünebilir haldeki proteinlerin yeni tüplere transferi sağlandı ve daha sonra konsantrasyonları hesaplandı. Western blot analizlerinde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı (Zhang ve diğ., 2001).

3.9. PROTEİN KONSANTRASYONLARININ SAPTANMASI

İzolasyonu yapılan suda çözünebilir proteinlerin konsantrasyonları SMART™ BCA (bikinkoninik asit) Protein Assay Kit' i (iNtRON Biotechnology) kullanılarak hesaplandı.

Biüret reaksiyonlara dayanan bikinkoninik asit (BCA) yöntemine bağlı olarak bu kitin çalışma prensibi şu şekildedir. Biüret reaksiyonlarında, alkali çözelti içerisindeki proteinlerde bulunan peptid bağları sayesinde Cu (II) iyonları Cu(I) iyonlarına indirgenerek, alkali çözelti olan kit belirtecindeki bakır(I) sülfat da indirgenir.

Bu indirgenme reaksiyonunu takiben Cu(I) iyonları ile suda çözünebilen stabil bir sodyum tuzu bileşiği olan BCA'nın oluşturduğu koyu mor renge sahip kompleksin 562 nm'de spektrofotometre yardımıyla yaptığı ışımada oluşan absorbans değeri ölçülür.

Protein konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla kiti üreten firmanın belirttiği protokol sırasıyla takip edildi. Kitin içerisinde bulunan BSA ("Bovine Serum Albumin", Sığır Serum Albümini) 0-2000 µg/mL aralığında 25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL olacak şekilde belirlenmiş konsantrasyonlarında protokolda tarif edildiği üzere dH₂O ile seyreltilerek protein standartları hazırlandı.

Hazırlanan örnekler 5 kat distile su ile seyreltildi ve 96 kuyucuklu hücre kültür kabında ilgili her bir kuyucuğa kit içerisinde bulunan reaktif A ve reaktif B solüsyonlarının sırasıyla 50:1 (v:v) oranında karıştırılarak hazırlanan BCA belirtecinden 200 µL eklendi.

Daha sonra distile su ile seyreltilmiş örneklerden ve blank olarak kullanılan numunelerin çözgeni olan tampondan 25 µL alınarak BCA belirteci üzerine eklendi. Bir dakika boyunca çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) çalkalanarak mikrolaka içerisindeki BCA belirteci ve numunelerin iyice karışıp homojenize olması sağlandı. Bu işlemi takiben, 37°C'lik etüvde (Thermo Scientific, Heracell™ 240) 30 dakika süresince 96 kuyucuklu mikrolaka inkübasyona bırakıldı. Son olarak inkübasyon işleminin ardından, mikrolaka okuyucu (EON, BioTek Instruments Inc.) yardımı ile BCA belirteci ve numunelerin birleşimi sonucu oluşan mor renkli ürünün 562 nm dalga boyundaki absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerinden blank grubunun absorbansı çıkarılarak gerçek değerler elde edildi. Eldeki tüm numuneler ve standartlar 3 tekrarlı olacak şekilde değerlendirmeye alınmış ve sonrasında BSA standartlarında yer alan konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak standart grafik elde edildi.

Protein numuneleri için uygulanan BCA protokolü sonrasında örneklere ait absorbans değerleri standart grafikte yer alan doğru denklemine yerleştirilerek protein konsantrasyonları saptandı.

3.10. ELEKTROFORETİK ANALİZLER

3.10.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) – PAGE Analizi

İzolasyonu yapılan suda çözünen proteinlerin denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak ayrıştırılması 2002 yılında Walker tarafından geliştirilmiş ve en sık kullanılan metot haline gelmiştir.

SDS-PAGE sistemi temel olarak proteinler moleküler ağırlıklarına göre çözünüp ayrılmalarını sağlayan ayrıştırma jeli ve proteinlerin ayrılma jeline geçmeden yoğun hale gelmesini ve proteinlerin negatif yük ile yüklenip doğrusal biçimde hareket ederek ayrılma jeline geçmesini sağlayan yükleme jeli olmak üzere iki farklı jel sisteminden oluşur. Tüm bu SDS-PAGE sistemini oluşturan bileşenlerin arasındaki farklar proteinlerin ağırlıkları baz alınarak ayrıştırılma işlemine maruz bırakılmasını sağlayan yöntemin gelişmesini meydana getirmiştir.

Suda çözünebilen proteinlerin analizinde Mini jel elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) kuruldu. Öncelikle jellerin hazırlanacağı camlar (“1.0 mm spacer plates” and “short plates”), taraklar (1.0 mm) ve contalar (“gaskets”) %70 oranında hazırlanmış etanol (EtOH) ile temiz hale getirildi ve jel dökülmeden önce iyice kuruması için beklenildi. Sistemi üreten firmanın hazırladığı protokole uygun olarak jel kaseti hazırlandı.

Tablo 3.2’de belirtilen oranlarda ayırma jeli Tablo 3.1’de gösterildiği gibi Tris-HCl (pH 8.8), dH₂O, akrilamid çözeltisi, SDS ve APS karıştırılarak hazır hale getirildi. Bu işlemi takiben Tablo 3.2’deki ifade edildiği şekilde yükleme jeli hazırlandı ve daha sonra çözünmüş oksijenin karışımdan ayrışabilmesi için ultrasonik su banyosunda 5 dakika süreyle beklemeye alındı. İçeride hava kabarcığı olmayacak şekilde hafifçe karıştırılan jel karışımına, akrilamidin polimerizasyonunu katalizleyen TEMED’ in (Fluka 87689) eklenmesi ile jel karışımı iki cam arasına (1 mm) jel sisteminin 4/5’i dolu olacak şekilde enjektör kullanılarak döküldü. Daha sonra jelin polimerizasyonunu hızlandırmak ve havayla temasını kesmek amacıyla yüzeyi 1 mL distile su ile örtüldü ve böylelikle jelin üst tabakasının düz bir çizgi halini alması sağlandı. Ayırma jelinin polimerizasyonu için ortalama 1 saat bekledikten sonra, jel yüzeyindeki su kurutma kağıdı yardımıyla jele dokunmadan alındı. Jel yüzeyinde bulunan su uzaklaştırıldıktan sonra Tablo 3.2’ de belirtilen oranlarda %5 akrilamid oranına sahip yükleme jeli hazır hale getirildi ve daha sonra enjektör ile polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine yükleme jeli döküldü. Örnek yükleme kuyularını oluşturmak amacıyla, jel üzerine tarak hızlıca ve hava

kabarcığı çıkarmamak için dikkatli bir şekilde jel kasedinin üst bölümüne oturtuldu. Yükleme jeli 30 dakika içerisinde polimerizasyonunu tamamladı ve daha sonra ortalama 30 dakika sonra yükleme jeli polimerize hale geldi. Jel sistemini bağlayan klipler, ayırıcı ve tarak dikkatli şekilde jel kasetinden yükleme jeli polimerize olduktan sonra çıkarıldı. Tarak yardımıyla meydana gelen örnek yükleme kuyuları ultra saf su kullanılarak yıkandı ve elektroforez tankına jel sistemi yerleştirildi. Elektroforez tankı kuyucukları da kapatacak şekilde 1X yürütme tamponu ile dolduruldu.

1:1 (v:v) oranında hazır hale gelmiş 2X örnek yükleme tamponu ile örnekler karıştırıldı. Sonra örnek yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler 5 dakika süresince proteinlerin denatüre hale gelmesi için 95°C’de ısıtılmış ısıtıcıda kaynatıldı.

Tablo 3.1: SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.

Çözeltiler	Bileşenler
1X Yürütme Tamponu (pH 8.3)	Trizma Baz (25 mM).....3.03 g Glisin (192 mM ,AppliChem A1067)14.4 g SDS (%0.1).....1 g dH ₂ O ile son hacim 1 L’ye tamamlandı.
2X Örnek Yükleme Tamponu	0.6 MTris-HCl Tamponu (pH 6.8)5 mL SDS.....1 g Gliserol (Sigma-Aldrich G5516)10 mL β-Merkaptoetanol (AppliChem A1108)0.25 mL Bromo-fenol mavisi (%0.5 (w/v)stok,Merck 108122)5 mL dH ₂ O ile son hacim 50 mL’ye tamamlandı.
1.875 M Tris-HCl Tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz (Sigma T1503)45.43 g 3N HCl ile pH 8.8’e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL’ye tamamlandı.
0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz.....14.54 g 3N HCl ile pH 6.8’e ayarlandı. dH ₂ O ile son hacim 200 mL’ye tamamlandı.
%30 Akrilamid stok solüsyonu	Akrilamid (Sigma A3553)30 g Bis-Akrilamid (Sigma M2022)0.8 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL’ye tamamlandı.
%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	SDS (AppliChem A2263).....10 g dH ₂ O ile son hacim 100 mL’ye tamamlandı.
%10 Amonyum Persülfat (APS)	APS (AppliChem A2941).....1g dH ₂ O ile son hacim 1 mL’ye tamamlandı. Jel döküleceği zaman taze hazırlanmıştır.

Tablo 3.2: Ayırma ve yükleme jeli içerikleri (1 jel için gerekli değerler).

Jel İçerikleri	Ayırma Jeli (%10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (%5 Akrilamid)
Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8)	1 mL	-
Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8)	-	250 µL
dH ₂ O	2.262 mL	1.875 mL
%30 Stok Akrilamid Solüsyonu	1.662 mL	337.5 µL
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	50 µL	25 µL
%10 Amonyum persülfat (APS)	25 µL	12.5 µL
TEMED	1.75 µL	3.5 µL

Örnekler her bir kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde hesaplanan miktarlarda jele yüklendi. Jel üzerinde bulunan ilk kuyuya örneklerden önce Protein marker karışımı (Pierce® Blue Prestained Protein MW Marker Mix, Thermo Scientific 266121) yüklendi. Örneklerin kuyulara yükleme işlemi tamamlandığında, 200 V sabit voltaj içerisinde elektroforez işlemi başlatıldı. Örnek yükleme tamponu içerisinde bulunan bromofenol mavisi yardımıyla oluşan bant ile proteinlerin hareketleri takip edildi ve jelin alt tarafına gelene kadar ortalama 40 dakika boyunca elektroforez devam ettirildi.

3.10.2. İmmünoyoblotlama

Elektrotransfer, immünoyoblotlama ve membran stripping işlemlerinde kullanılan tamponlar bileşenleri ve tampon içerisinde bulunma miktarları ile birlikte beraber aşağıdaki Tablo 3.3'de belirtildi. İmmünolojik analiz de kullanılan antikolar (primer ve sekonder), üretici firmaları, elde edildikleri model organizmalar ve hazırlandıkları dilüsyon oranları Tablo 3.4'de gösterildi.

Madde uygulandıktan sonra toplanan hücrelerden izole edilen proteinler SDS-PAGE metodu kullanılarak %10 poliakrilamid jelde molekül ağırlıklarına göre ayrıldı. Ayrılan ve jel üzerinde yürütülen proteinler daha sonra elektroblotting yöntemi kullanılarak [Wet/ Tank Blotting System (Bio-Rad)] polivinilidinden diflorür (PVDF) membranına aktarıldı. Proteinler polivinilidinden diflorür membrana (PVDF) aktarılmadan önce iki tane filtre kağıtları ve jel boyutlarına uygun olarak bir adet PVDF membran kesildi. PVDF membranı aktif hale getirmek amacıyla 30 saniye süreyle %100 oranında metanol ile muamele edildi, ardından fiber pedler, filtre kâğıdı ve jel üzerindeki proteinlerin aktarımının yapılacağı PVDF membranı 20 dakika süreyle transfer tamponunda bekletildi.

Bu sistemde içerisinde siyah kısım katot tarafını, kırmızı kısım ise anot tarafını temsil etmekte ve mekanizma siyah kısımdan kırmızı kısma doğru çalışmaktadır. Siyah bölümü alt kısma denk gelecek şekilde yerleştirilen kasete, transfer tamponu ile ıslatılmış nemlendirilmiş fiber ped siyah kısmın üzerine gelecek şekilde yerleştirildi ve sonra sırasıyla filtre kâğıdı, dengelenmiş jel son olarak daha önce transfer tamponu içerisinde bekleyen nemlendirilmiş membran jelin üzerine dikkatle yerleştirildi. Membran üzerine bir adet filtre kağıdının yerleştirilmesiyle oluşan sandviç sistemi olarak da adlandırılan bu sistemin kurulumu son fiber pedin filtre kağıdı üzerine kapatılmasıyla tamamlandı. Birbirleri üzerine yerleştirilen katmanların arasında hava kabarcığı olmaması amacıyla rulo ile tabakaların üzerinden hafifçe geçildi. Katmanların yapılarının bozulmamasına, membran ve jelin yerinin korunmasına dikkat ederek kaset kapağı kapatıldı ve tank içerisine yerleştirildi. Kaset sistemi buz dolu tank içerisine veya soğutucu ile birlikte tanka yerleştirildi. Daha sonra transfer sistemi ve tank yeni hazırlanan 1X transfer tampon çözeltisi ile dolduruldu. Kapağı kapatılan Wet/ Tank Blotlama sistemi güç kaynağına bağlandı ve uygun voltaj ayarlanarak transfer işlemi yaklaşık 90 dakika sürecek şekilde başlatıldı. Belirlenen süre sonunda transfer işlemi bitince, kaset sistemi tank içerisinden çıkarılırken jel üzerindeki proteinlerin transfer edildiği membran da yükleme kısmından ayrıldı.

Tablo 3.3: İmmünolojik analizler için hazırlanan çözeltiler.

Solüsyonlar	İçerikleri
Stripping Tamponu	%10'luk SDS çözeltisi.....20 mL
	0.6 M Tris-HCl (pH:6.8) tamponu..... 10 mL
	Ultra saf su.....70 mL
	β-merkaptotanol.....0.8 mL
1X Yıkama Tamponu	Trizma-Baz (20 mM, pH: 7.5)2.42 g
	NaCl (150 mM) (Merck 106400)8.77 g
	Tween-20 (%0.1).....1 mL
	dH ₂ O ile 1L'ye tamamlandı.
%5'lik Bloklama Tamponu	Yağsız süt tozu (Sigma 70166)5 g
	Son hacim 1X yıkama solüsyonu ile 100 mL'ye tamamlandı.
1X Transfer Tamponu	Trizma-Baz (25mM, Sigma T1503)3.03 g
	Glisin (192 mM, AppliChem A1067) 14.4 g
	Metanol200 mL
	dH ₂ O ile 1L'ye tamamlandı.

Tablo 3.4: İmmünolojik analizler için kullanılan primer ve sekonder antikorlar (Elde edildikleri kaynakları ve dilüsyonları).

Antikor	Üretici Firma	Kod	Konak	Dilüsyon
Anti-p53	Novus	NB200-103	Fare	1:1000
Anti-p21	Proteintech	10355-1-AP	Tavşan	1:1000
Anti-Cas-3 pro ve kesilmiş form	Proteintech	19677-1-AP	Tavşan	1:1000
Anti-Bax	Proteintech	50599-2-Ig	Tavşan	1:1000
Anti-Bcl-2	Proteintech	12789-1-AP	Tavşan	1:1000
Anti-PARP1 pro ve kesilmiş form	Proteintech	13371-1-AP	Tavşan	1:1000
Grp78	Novus	NBP2-16749	Tavşan	1:1000
IRE1 α	Novus	NB100-2324	Tavşan	1:1000
PERK	Novus	NBP1-51661	Fare	1:1000
ATF6	Novus	NBP1-40256	Fare	1:1000
Anti- β -aktin	Novus	NB600-501	Fare	1:5000
Anti-Tavşan IgG	Boster	BA1050	Keçi	1:5000
Anti-Fare IgG	Boster	BA1050	Keçi	1:5000

Transfer sonrasında membran oda sıcaklığında TBST (%0.1 (v/v) Tween-20 içeren TBS) içerisinde çözündürülmüş %5'lik (w/v) yağsız süt tozundan (Fluka 70166) oluşan ve antikorların spesifik olmayan bölgelere bağlanmasına engel olmak amacıyla hazırlanan bloklama solüsyonu içerisinde alınıp yaklaşık 2 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.

Bloklama işlemi sonrasında membran, Tablo 3.4'de ifade edildiği şekilde bloklama solüsyonu olan yağsız süt tozu içinde seyreltilerek hazırlanmış primer antikor +4 °C' de bir gece boyunca inkübe edildi.

Gece boyunca primer antikor ile inkübe edilen membran 4 defa 15'er dakika arayla yıkama tamponu olan 1X TBST çözeltisi ile antikor kalıntılarını ortadan kaldırmak amacıyla yıkanarak düşük hızda çalkalandı. Membranların 1X TBST tampon çözeltisi ile yıkama işlemi bittikten sonra, primer antikora özel olarak tasarlanmış ve bloklama tamponu içerisinde seyreltilerek hazırlanan sekonder antikor ile oda sıcaklığında iki saat boyunca inkübe edildi. Sekonder antikorla inkübasyon işlemi biten membranlar, yine 4 defa 15 dakika aralıklarla 1X TBST ile yıkanarak sekonder antikorların ortamdan uzaklaştırılması sağlandı.

“ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham RPN2133)” yöntemi ile araştırılmak istenen proteinler ağırlıklarına göre bulunma ihtimali olan bölgelerdeki bantların görüntülenmesiyle tespit edildi. Üretici firmadan elde edilen kit içerisinde bulunan A ve B reaktif solüsyonlarının 1:1 (v:v) oranında karışması ile hazır hale getirilen karışım karanlık odada kırmızı ışık altında membran üzerine uygulanarak 5 dakika beklendi. Bekleme süresi sonunda, membrana uygulanan karışım membran üzerinden uzaklaştırılarak, şeffaf iki asetat kağıtları arasına konulan membran görüntüleme cihazı (ChemiDoc MP, Bio-Rad) içerisine yerleştirildi. Çalışılan proteinlere ait bant görüntülerinin analizleri ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak elde edildi.

Görüntüleri alınan membranların üzerindeki antikor kalıntılarını uzaklaştırmak, normalizasyon analizleri için tekrar blotlayabilmek amacıyla “stripping” adı verilen yöntem, membranlara uygulandı. Öncelikle Tablo 3.3’te de gösterildiği şekilde hazırlanan “stripping” solüsyonu 50°C’ye ısıtıldı. Isınan solüsyon membran üzerine eklendi ve membran 50°C’de 45 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon işlemi sonrasında, membran 15’er dakika arayla 4 kez ultra saf su ile yıkanarak her seferinde düşük hızlı çalkalayıcıya bırakıldı. Ultra saf su ile yıkama işlemi sona erdiğinde, yeni ve temiz bir kap içerisine alınan membran bu sefer 5’er dakika aralıklarla 5 kere TBST ile yıkanarak düşük hıza sahip çalkalayıcı üzerinde çalkalanması sağlandı. Tüm bu işlemlerin sonucunda, membran tekrar blotlanmaya hazır hale getirildi ve normalizasyon analizi için tercih edilen bir housekeeping gen olan β -aktin’in primer antikoruna ile +4 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Primer antikor ile inkübasyona maruz bırakılan membran, TBST (“Tris-buffered saline with Tween-20”) yıkama tampon çözeltisi ile 15 dakika arayla 4 defa yıkandı ve düşük hıza sahip çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Beta-aktin’e ait protein bantları membranın “ECL Plus Western Blotting Detection System” ile muamelesi sonrası görüntüleme cihazı ile görüntülendi ve protein bantları ImageLab 5.2.1 yazılımında bulunan normalizasyon hesaplamaları kullanılarak normalize edildi.

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tez çalışması kapsamında yer alan tüm sitotoksik ve immünolojik analizlerden toplanan bütün veriler istatistiksel açıdan değerlendirildi. GraphPad Prism® 7.01 programı yardımı ile aritmetik ortalamalar ve standart sapma (SS) hesaplaması yapıldı.

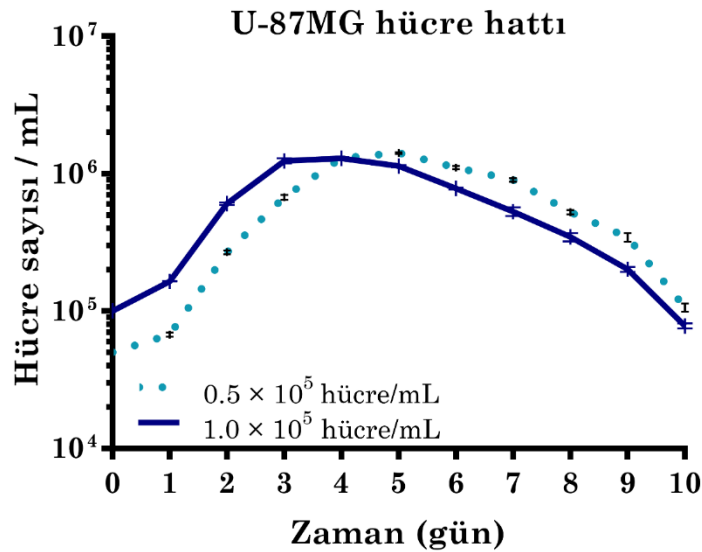
Tek- veya çift-yönlü ANOVA varyans analizi (“one-way or two-way ANOVA” tek veya çift yönlü varyans analizi) uygulanıp, ardından Tukey post hoc testi yapıldı ve deney grupları arasında oluşan farkların anlamlı olup olmadığı değerlendirildi. Anlamlılık sınırı olarak $P < 0.05$ belirlendi.



4. BULGULAR

4.1. U-87MG GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİ

Bu tez kapsamında kullanılan 4. dereceden astrositoma olan glioblastoma hücre hattı U-87MG hücrelerinin 2-boyutlu kültürde büyüme kinetiğinin ve jenerasyon süresinin belirlenmesi için çoğalma eğrisi grafiği oluşturuldu. Başlangıç hücre sayısı 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Neubauer lamı kullanılarak 10 gün boyunca hücre sayımı yapıldı. Bu sayımlar sonucu elde edilen veriler ile hazırlanan grafik Şekil 4.1’de verildi. Grafikten elde edilen verilere göre U-87MG hücre hattının jenerasyon süresinin 18 saat olduğu belirlendi. Her iki kültürde de U-87MG hücrelerinin 1. günde logaritmik faza girdiği belirlendi. 0.5×10^5 hücre/mL ile başlatılan hücre grubu durağan faza 5. günde, 1×10^5 hücre/mL ile başlatılan hücre grubunun ise 3. günde geçtiği saptandı.

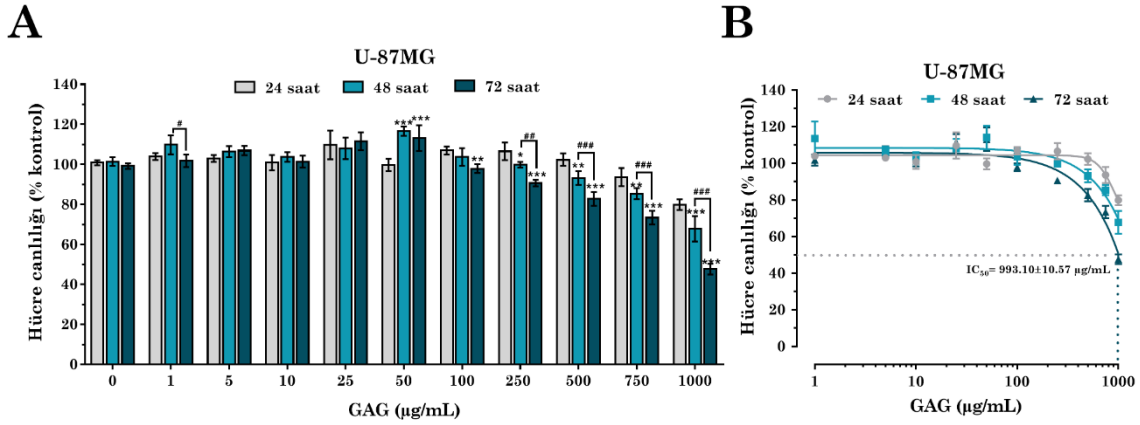


Şekil 4.1: İnsan glioblastoma hücre hattı U-87MG hücrelerinin başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/mL olan kültürlerden elde edilen çoğalma eğrisi grafiği.

4.2. GLİKOZAMİNOGLİKANIN (GAG) SİTOTOKSİK ETKİLERİ

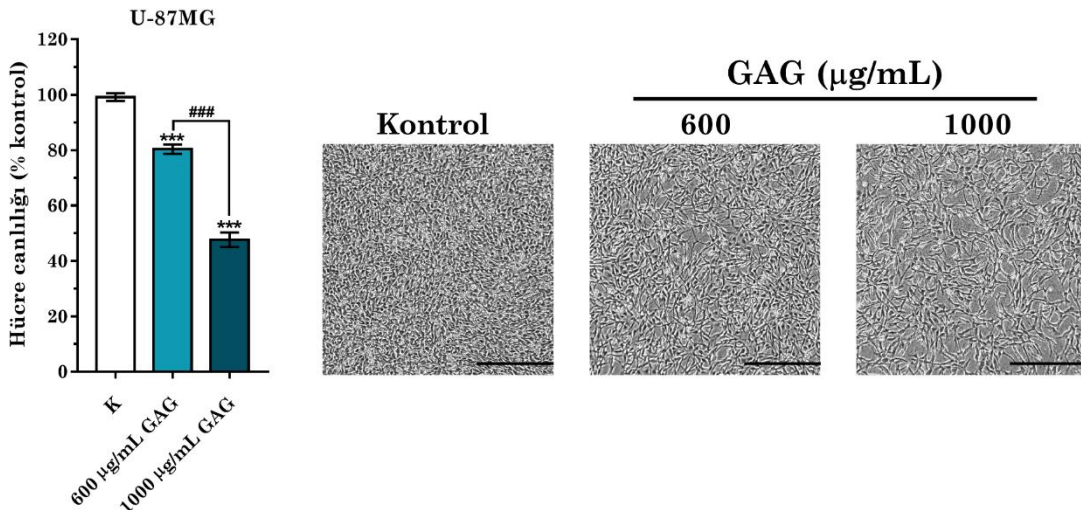
Levrek balığından elde edilen GAG’ın glioblastoma hücre hattı U-87MG hücrelerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için MTT testi yapıldı. GAG’ın 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 750 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saatlik

uygulamalar sonucunda elde edildi. MTT sonuçlarına göre sadece 72 saatlik uygulama için IC_{50} değeri saptandı ve bu değerin $993.10 \pm 10.57 \mu\text{g/mL}$ olduğu belirlendi. Doza- ve zamana- bağlı sitotoksik etkiyi gösteren sonuçlar Şekil 4.2’de verildi.



Şekil 4.2: GAG farklı dozlarının (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) U-87MG hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksik (MTT analizi) etkilerini gösteren (A) sütun ve (B) doz-yanıt eğri grafikleri (*kontrolle göre kıyaslamayı, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$).

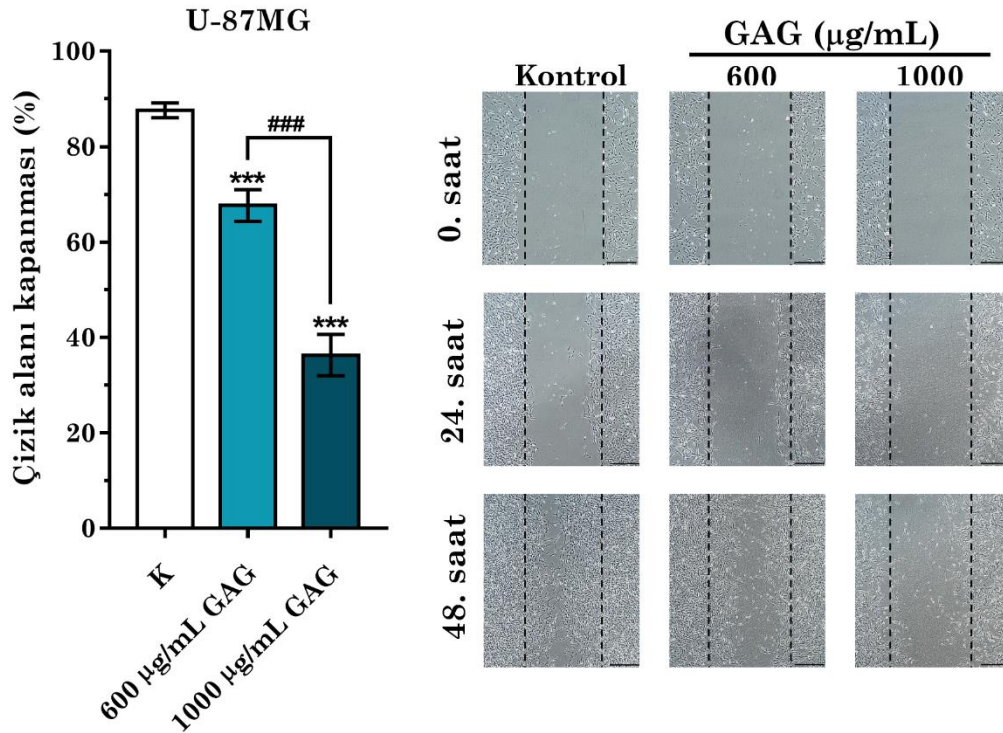
GAG uygulanmış U-87MG hücrelerinin canlılık verilerine (MTT testi) göre ileriki deneyler için 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ GAG dozlarının 72 saatlik uygulaması seçildi. Süre sonunda bu dozların hücre canlılığını sırasıyla %19.60 ve %52.35 azalttığı gösterildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: U-87MG hücrelerinde 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik GAG dozlarının 72 saat süreyle uygulamalarının hücre canlılığına etkisi (skala bar: 400 μm , büyütme: $\times 40$). (A) MTT testi ile elde edilen hücre canlılığını gösteren grafikler, (B) Hücrelerin morfolojik görüntüsü (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$).

4.3. *In Vitro* ÇİZİK DENEYİ İLE MİGRASYONUN ANALİZİ

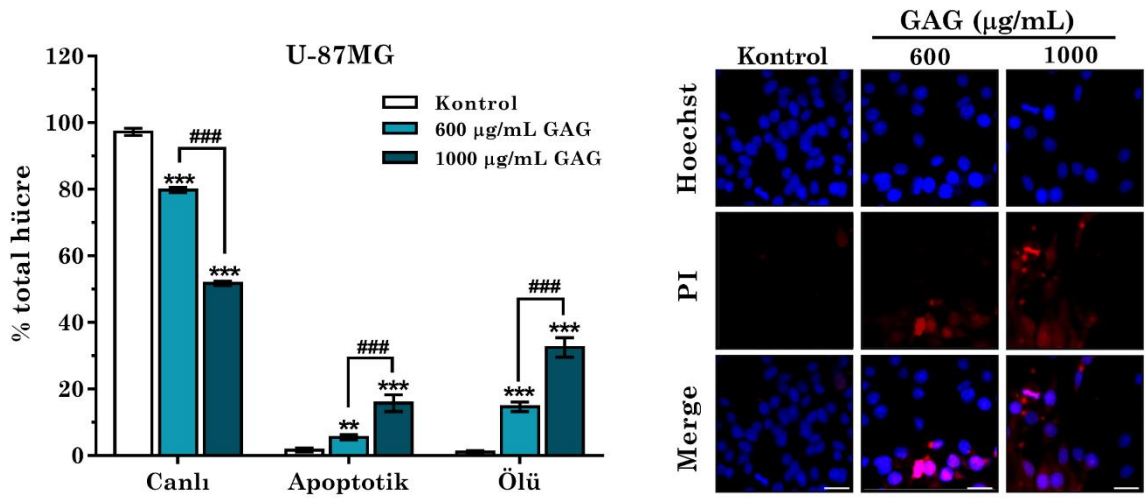
Levrek balığının pulundan izole edilen GAG'ın, glioma progresyonunda önemli bir yere sahip olan migrasyon üzerindeki etkileri *in vitro* çizik deneyi ile değerlendirildi (Şekil 4.4). 72 saat boyunca gözlemlenen çizik alanında 48 saatte kontrol grubunun neredeyse tamamen kapandığı görüldü. Bu nedenle GAG'ın dozlarının ve kontrol grubunun migrasyon üzerindeki etkileri 48 saat sonunda değerlendirildi. Bu değerlendirme GAG uygulaması öncesinde (0. saat) oluşturulan çizik alanın uygulama sonrası yüzde kapanma değerine göre yapıldı. 600 µg/mL'lik GAG dozu %67.65 kapanma oranına sahip iken 1000 µg/mL'lik GAG dozunun %36.28 kapanmaya yol açtığı belirlendi. Bu sonuçlar, GAG'ın glioblastoma hücre hattı U-87MG hücrelerinde önemli ölçüde migrasyonu azalttığını gösterdi.



Şekil 4.4: U-87MG hücrelerinde 600 µg/mL ve 1000 µg/mL dozundaki GAG uygulamasının 48 saat sonunda hücre migrasyonuna etkisi (skala bar: 400 µm, büyütme: ×40). (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ***P<0.001; ###P<0.001).

4.4. APOPTOZ ANALİZİ: HOECHST VE PROPİDİUM İYODÜR (HO/PI) BOYAMASI

Levrek balığının pulundan izole edilen GAG'ın, 600 µg/mL ve 1000 µg/mL'lik dozlarının U-87MG hücrelerinde apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkisini görüntülemek için Hoechst ve propidium iyodür (HO/PI) ikili boyaması yapıldı (Şekil 4.5). 600 µg/mL ve 1000 µg/mL'lik GAG dozlarının 72 saatlik uygulama sonrası sırasıyla %5.50 ve %15.76 apoptotik hücre saptandı.



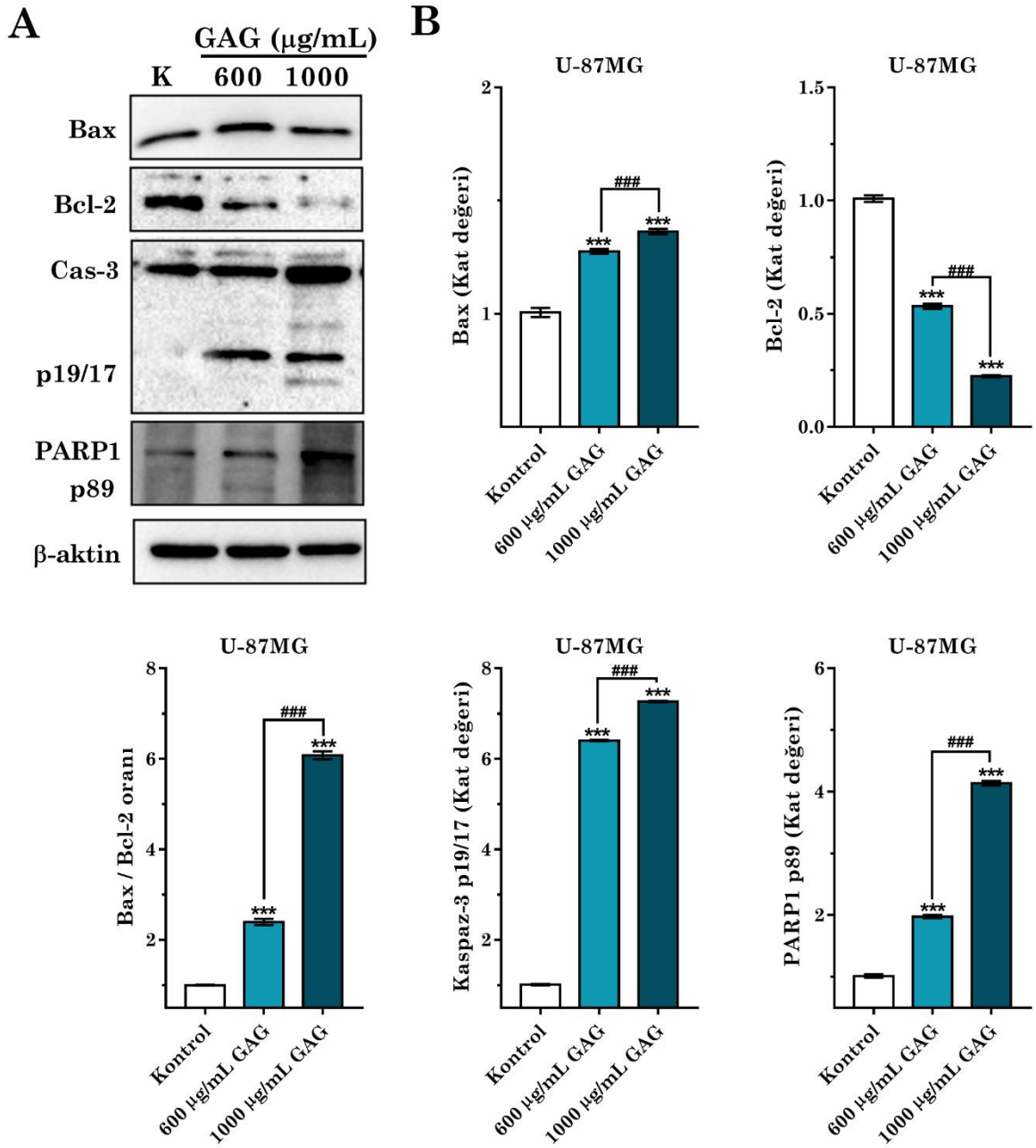
Şekil 4.5: U-87MG hücrelerinde 600 µg/mL ve 1000 µg/mL'lik GAG dozlarının 72 saat uygulamalarının apoptoz üzerindeki etkisinin HO/PI boyama ile değerlendirilmesi (büyütme: ×400). (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. ***P<0.001; ###P<0.001).

4.5. PROTEİN EKSPRESYON ANALİZLERİ

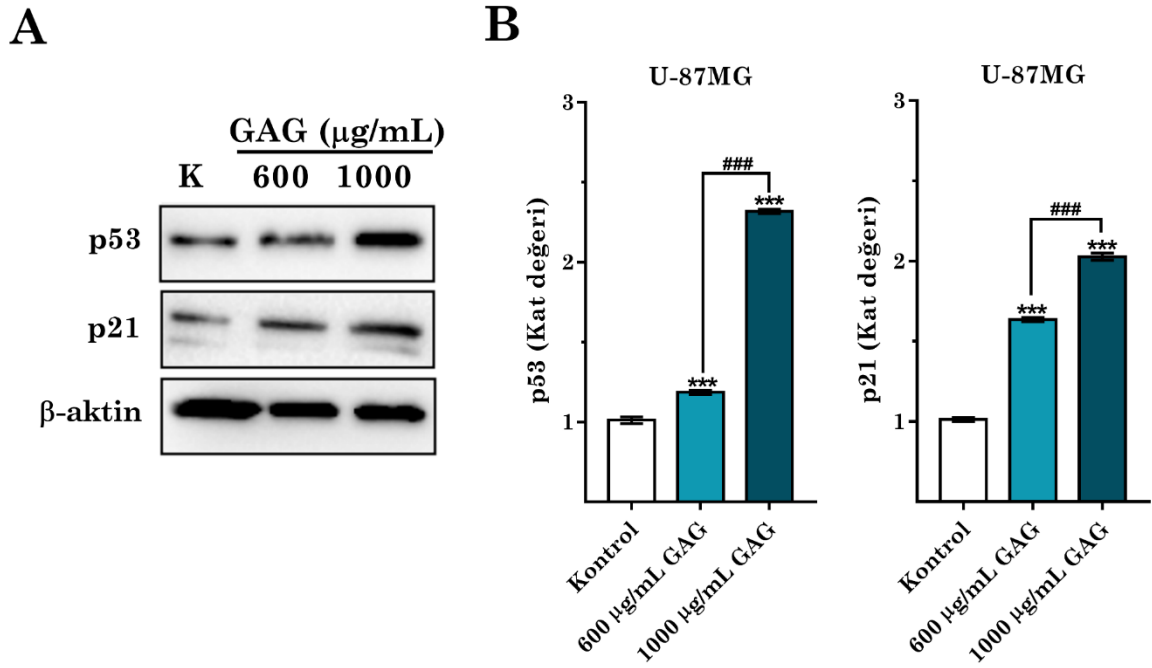
U-87MG hücrelerinde 72 saatlik GAG uygulaması sonrasında apoptoz durumunu incelemek için BAX, Bcl-2, kesilmiş kaspaz-3 ve PARP1 protein fragmentlerinin ekspresyonları western blot yöntemi kullanılarak belirlendi (Şekil 4.6). GAG uygulaması sonrası her iki dozun da BAX proteininin anlatımında yol açtığı artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. 600 µg/mL olan grupta bu artış 1.28 kat iken 1000 µg/mL GAG uygulanmış grupta 1.36 kat olduğu tespit edildi. Ayrıca bu iki grup arasında da anlamlı bir fark olduğu belirlendi.

Her iki doz BAX proteini ekspresyonunu artırırken Bcl-2 proteinin anlatımını ise önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ve yine iki grup arasında da anlamlı bir farkın olduğu belirlendi. Apoptozun önemli bir ölçütü olan BAX/Bcl-2 oranı her iki GAG dozunda artış gösterirken 1000 µg/mL dozunda bu artışın çok daha yüksek olduğu belirlendi. Bu kat artışları sırasıyla 2.39 ve 6.08 idi. GAG uygulaması sonrası kaspaz-3 aktif formlarda oldukça yüksek bir artış olduğu görüldü. Her iki gruptaki artış hem kontrole göre hem de kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlıydı. GAG uygulaması sonrası DNA onarımında görevli olan PARP1'in kesilmiş formu olan p89'daki artış, DNA onarımında azalmayı ve apoptoz indüksiyonundaki artışı gösterdi. Her iki dozda da kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü. Elde edilen bu veriler GAG'ın dozuna bağlı olarak artan apoptozu gösterdi.

GAG'ın U-87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki apoptoz ve hücre döngüsünde görevli olan p53 ve p21 proteinleri ekspresyon düzeyleri western blot metodu ile belirlendi. GAG'ın 600 µg/mL ve 1000 µg/mL dozlarının 72 saatlik uygulaması sonrası, hücre döngüsü inhibitörü ve anti-proliferatif efektör olarak işlev gören p53 ve p21 proteinlerinin ekspresyonları üzerindeki etkisi Şekil 4.7 gösterildi. Her iki dozun da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak p53 proteinin anlatımını artırdığı görüldü. Sırasıyla kontrole göre 1.18 ve 2.32 kat artışı tespit edildi. Ayrıca GAG'ın doz grupları arasında karşılaştırma yapıldığında, 1000 µg/mL'deki artışın 600 µg/mL'ye göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görüldü. Her iki GAG dozunun da p21 protein ekspresyonunu, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı ve sırasıyla bu artışın 1.64 ve 2.03 olduğu belirlendi. 1000 µg/mL'deki artışın 600 µg/mL göre daha büyük olduğu ve bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü. Bu sonuçlar, GAG'ın doz bağlı olarak p21 ve p53 proteinlerinin anlatım seviyelerinde artış sağladığını gösterdi ve GAG'ın anti-kanser etki mekanizmasına p21 ve p53 proteinlerinin de dahil olduğuna dair kanıtlar sağladı.

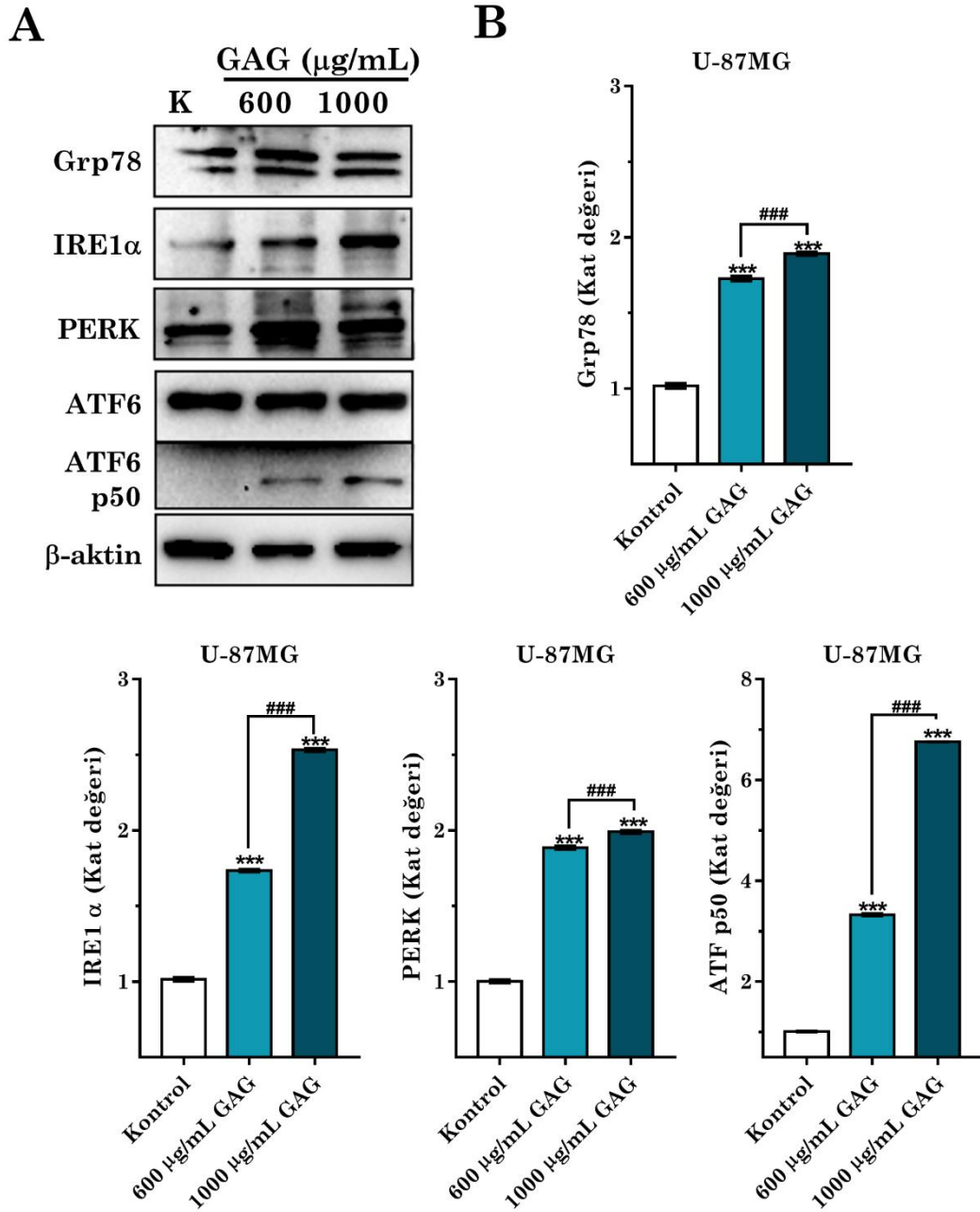


Şekil 4.6: (A) U-87MG hücrelerinde 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik GAG dozlarının 72 saat uygulamalarının apoptoz üzerindeki etkisinin western blot ile değerlendirilmesi, (B) hücrelerde uygulama sonrası Bax ve Bcl-2 proteininin anlatım farklarını ve oranlarını, kaspaz-3 proteininin p19/p17 kesilmiş fragmentlerinin anlatım farklarını ve PARP1 proteininin p89 kesilmiş fragmentinin anlatım farklarını gösteren grafikler. (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$).



Şekil 4.7: (A)U-87MG hücrelerinde 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik GAG dozlarının 72 saat uygulamalarının p53 ve p21 ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin western blot ile değerlendirilmesi, (B) hücrelerde uygulama sonrası p21 ve p53 proteinin farklarını gösteren grafikler. (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$).

U-87MG glioma hücreleri üzerinde GAG'ın ER stresi markerları olan Grp78, PERK, IRE1 α ve ATF6 p50 proteinlerinin anlatımlarındaki seviye değişimleri belirlendi (Şekil 4.8). Hücre canlılığını %20 azaltan GAG'ın 600 $\mu\text{g/mL}$ dozu Grp78 seviyesini kontrole göre 1.73 kat artırırken, hücreye oldukça toksik olan 1000 $\mu\text{g/mL}$ dozunun Grp78 anlatımını 1.89 kat artırıldığı gösterildi. Bu artışların hem kontrole göre hem de iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Bu iki dozun PERK ve IRE1 α proteinlerinin ekspresyon seviyelerini anlamlı şekilde kontrole göre artırdığı tespit edildi. Bu artışın PERK için sırasıyla 1.89 ve 1.99 kat iken, IRE1 α için 1.73 ve 2.53 kat olduğu belirlendi. Ayrıca ATF6'nın kesilmiş aktif formu p50 fragmentinin GAG uygulaması sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ olarak uygulanan GAG dozları sonucundaki artışın hem kontrole göre hem kendi aralarında anlamlı olduğu gösterildi. Bu veriler GAG'ın U-87MG hücrelerinde doz bağlı olarak ER stresinin arttığını, bunda hücre ölümüne katkı sağlamış olabileceğini gösterdi.



Şekil 4.8: (A)U-87MG hücrelerinde 600 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik GAG dozlarının 72 saat uygulamalarının ER stresi üzerindeki etkisinin western blot ile değerlendirilmesi, (B) hücrelerde uygulama sonrası Grp78, IRE1 α , PERK ve ATF p50 proteinin farklarını gösteren grafikler. (*kontrolle göre, #gruplar arası karşılaştırmayı gösterir. *** $P < 0.001$; #### $P < 0.001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, normal hücre yaşam döngüsü olan büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi süreçler arasındaki homeostazinin bozulup kontrolsüz hücre bölünmesi sonucu biriken hücrelerin oluşturduğu tümörlerin ortaya çıkmasına bağlı olarak seyreden bir hastalıktır. Dünya genelinde tanı koyulan vaka sayısı ve ölüm oranları baz alındığında kanser, ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 yılına ait verilerine göre 19,2 milyon kişiye kanser tanısı konulurken, kansere bağlı olarak hayatını kaybeden hasta sayısı 9,9 milyon kişidir (Sungve diğ., 2021). 75 yaş öncesinde her 5 kişiden 1 kişiye kanser teşhisi konulacağı ve her 10 kişiden birinin ise kansere bağlı nedenlerle hayatını kaybedeceği öngörülmektedir. Kansere yakalanma ve ölüm oranlarının her geçen gün artması, tanı ve tedavi için yeni yöntemler geliştirmek amacıyla yapılan çalışmaların da artmasına sebep olmuştur.

Glioblastoma, merkezi sinir sisteminin en yaygın ve en agresif seyreden malign beyin tümörleridir. IV. derece astrositom olarak da adlandırılan glioblastoma, teşhis sonrası hayatta kalım süresi 15 aydan daha az olması sebebiyle kötü prognoza ve en hızlı ölüm oranına sahip beyin kanseri türüdür. Son yıllarda, tüm yaş gruplarında beyin tümörlerinin insidansı dünya genelinde artış göstermektedir (Yan ve Wang, 2020). Merkezi sinir sistemi kanserlerinin mortalite oranlarının dünyada yaklaşık 100.000'de 3.4 olduğu tahmin edilmektedir (Farmanfarma ve diğ., 2019). Glioblastoma tedavisinde cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ve temozolomid ile konjuge hale getirilmiş kemoterapi tedavisi uygulanmaktadır. Ancak temozolomidin sahip olduğu hepatotoksisite gibi yan etkiler, hastaların tedaviye yanıt verirken karşı direnç göstermesi, uygulanan terapötik ajanların hedef dokuya geçişinde zorlanmasına sebep olan kan beyin bariyerinin varlığı glioblastoma tedavisini zorlaştırmaktadır. Bunlara ek olarak kanser tedavilerinde uygulanan farmasötiklerin normal sağlıklı hücreler için toksik olabilmesi, glioblastoma tedavisinde doğal kaynaklı yeni terapötiklerin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır.

Tümörler, kanserli, kanserli olmayan, stromal ve bağışıklık hücrelerinden oluşan tümör mikroçevresi içerisinde gelişir. Hücre dışı matris (ECM), fibröz proteinlerin, glikozaminoglikanların ve onların çekirdek bir proteine bağlanarak meydana getirdikleri proteoglikanların oluşturduğu tümör mikroçevresinin önemli bir bileşenidir.

Hücrelere mekanik bir yapı desteği görevi görerek doku bütünlüğünü sağlasa da ECM, bileşenleri ve etkileşime girdikleri moleküller sayesinde hücre içi ve dışında birçok biyokimyasal olaylara aracılık etmektedir.

Glikozaminoglikanlar, neredeyse tüm memeli dokularında bulunan uzun, dallanmamış, sülfatlanmış veya sülfatlanmamış monosakkaritlerden oluşan tekrar eden disakkarit birimlerinin meydana getirdiği doğal heteropolisakkaritlerdir. Disakkarit birimi olarak N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin gibi heksozamin ve üronik asit grubu veya galaktoz içerir. Glikozaminoglikanlar, yapılarında bulunan disakkarit birimlerinin türüne ve sülfatlanma durumuna göre heparin/heparan sülfat, keratan sülfat, hyalüronan (hyalüronik asit), kondroitin sülfat ve dermatan sülfat olarak alt gruplara ayrılırlar. Kondroitin sülfat, heparan sülfat ve hyalüronan yapılarında glukuronik asit, dermatan sülfat ve heparin iduronik asit içerir. Keratan sülfat ise üronik asit grubu yerine galaktoz içerir. Heksozamin birimleri hyalüronan, heparan sülfat ve keratan sülfat için N-asetilglukosamin (GlcNAc) iken kondroitin sülfat ve dermatan sülfat için N-asetilgalaktozamin (GalNAc)'dir (Pomin ve Mulloy, 2018).

Glikozaminoglikanlar, büyük ölçüde hayvansal kaynaklardan, sığır, kuş, domuz gibi karasal hayvanlardan (Volpi, 2007) veya köpek balığı, kalamar, mersin balığı gibi deniz organizmalarından elde edilir (Zhaove diğ., 2013). Ancak kara hayvanı dokularından elde edildiğinde deli dana, şap, domuz kolerası gibi olası salgın hastalık riski barındırdığı için güvenli oluşu konusunda birtakım endişeler yaşanmaktadır. Bununla birlikte, köpek balığı gibi nesli tükenmekte olan canlı kaynakları ise üretim için ham madde sınırlandırmasına sebep olmaktadır. Tüm bu sebepler, karmaşık polisakkaritlerden olan glikozaminoglikanların elde edilmesi için alternatif kaynak arayışını meydana getirmiştir. Denizel canlılar, glikozaminoglikanlar bakımından zengin bir kaynaktır (Valcarcel ve diğ., 2017) ve denizel canlılardan elde edilen glikozaminoglikanlar, antioksidan, nöroprotektif, antikoagülan, antiviral, antiproliferatif ve antienflematuar gibi farmakolojik aktivitelere sahiptir (Krichen ve diğ., 2017).

Glikozaminoglikanların anjiyogenez, metastaz ve invazyon için gereken kanser sinyal basamaklarında yer aldığı ortaya konulmuştur. Ayrıca glikozaminoglikanların bir türü olan heparan sülfatın ve proteinlere bağlanarak oluşturdukları heparan sülfat proteoglikanlarının onkogenik sinyalleşme, apoptoz, hücre farklılaşması, doku invazyonu ve migrasyon gibi önemli kanser hücre fonksiyonlarını regüle ettiği bulunmuştur (Onyeisive diğ., 2020).

Bu nedenle, yaygın infiltrasyon ve beyin içinde lokal invazyon ile tanımlanan bir hastalık olan malign glioblastomanın hedef alınması için yeni terapötik fırsatlar oluşturabilirler.

Kanser kemoterapisinde kullanılan sitotoksik ilaçların çoğu, normal sağlıklı dokularda bulunan hücreler için de toksik etkiye sahiptir. Bu sebeple, son yıllarda kanser tedavisinde kullanılabilecek denizel canlılardan elde edilen glikozaminoglikanlar gibi doğal antitümör aktiviteye sahip bileşikler araştırmalar için ilgi çekici olmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında, denizel canlı kaynaklarından biri olan levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*) pullarından izole edilen glikozaminoglikanların (GAG) U-87MG insan glioblastoma hücreleri üzerinde apoptoz ve endoplazmik retikulum stresi bakımından etkisi araştırılmıştır. Literatür araştırması yapıldığında, gri tetik balığı türü olan çotira (*Balistes capriscus*) ve bir köpek balığı cinsi olan *mustelus* balıklarının derilerinden elde edilen kondroitin sülfat/ dermatan sülfat glikozaminoglikanlarının insan kolon kanseri HCT116 hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif aktivitesi araştırılmış ve araştırma sonucunda MTT analizine göre belirlenen sitotoksik dozlarının kolon kanseri hücrelerinin çoğalmalarını %70.6 ve %72.65 oranında inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Krichenve diğ., 2017). Bir başka araştırmada, *Styela plicata*' dan izole edilen heparin nanopartiküller içinde kapsüllenerek metastatik meme kanseri hücreleri kullanılarak in vitro olarak test edilmiş ve kapsüllenmiş domuz heparini ile karşılaştırıldığında hücrelerin çoğalması, invazyonu ve oksidatif stresin artmasına neden olan proteazom aktivitesini daha yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır (Valcarcelve diğ., 2017). Buna ek olarak, kara deniz hıyarından (*Holothuria leucospilota*) elde edilen glikozaminoglikanların meme kanseri ve trombositler arasındaki adezyonu inhibe ederek in vitro hücre migrasyonunu azaltması (Qian ve diğ., 2016) denizel canlı kaynaklardan elde edilen glikozaminoglikanların kanser hücrelerindeki etkisi üzerine yapılan çalışmalara örnek olarak verilebilir. Çalışmanın ilk basamağında, levrek balığından elde edilen GAG'ın glioblastoma hücre hattı U-87MG hücrelerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için MTT testi yapılmıştır. GAG'ın belirli (1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 750 ve 1000 µg/mL) konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonucunda elde edilmiştir. Doz ve süre artışına bağlı olarak maddenin hücrelerin üzerindeki sitotoksik etkisinin de arttığı saptanmıştır. Bu sebeple, MTT sonuçlarına göre 72 saatlik uygulamanın daha etkili olduğu tespit edilmiş ve 72 saatlik uygulama için IC₅₀ değeri saptanmıştır.

IC₅₀ değeri 993.10±10.57 µg/mL olarak belirlenmiştir. GAG uygulanmış U-87MG hücrelerinin MTT testi sonucu elde edilen canlılık verilerine göre ileriki deneyler için 72 saatlik süre sonunda hücre canlılığını sırasıyla %19.60 ve %52.35 azalttığı tespit edilen 600 µg/mL ve 1000 µg/mL GAG dozları seçilmiştir.

Hücre canlılığına olan etkisini sitotoksikite testi olan MTT testi ile belirledikten sonra, Levrek balığının pulundan izole edilen GAG'ın, glioma progresyonunda önemli bir yere sahip olan migrasyon üzerindeki etkileri *in vitro* çizik deneyi ile değerlendirilmiştir. 72 saat boyunca gözlemlenen çizik alanında 48 saatte kontrol grubunun neredeyse tamamen kapanması nedeniyle GAG'ın dozlarının ve kontrol grubunun migrasyon üzerindeki etkileri 48 saat sonunda analiz edilmiştir. Hücrelerin migrasyon yapmasının inhibe edilmesi, kanser hücrelerinin en büyük özelliklerinden olan metastaz ve invazyon yapabilme yeteneklerinin engellenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Tez çalışması kapsamında yapılan *in vitro* çizik deneyi değerlendirmesi sonucunda, her iki dozunda kontrol grubuna kıyasla glioblastoma hücre hattı U-87MG hücrelerinde önemli ölçüde migrasyonu azalttığı saptanmıştır.

GAG'ın, 600 µg/mL ve 1000 µg/mL'lik dozlarının U-87MG hücrelerinde apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkisini görüntülemek için Hoechst ve propidium iyodür (HO/PI) ikili boyaması yapılmış ve 72 saatlik uygulama sonrasında 1000 µg/mL'lik GAG dozunda 600 µg/mL ve kontrole göre daha fazla apoptotik hücre saptanmıştır. Bu verilere dayanarak, glikozaminoglikanların %50 oranında sitotoksik etkiye sahip olan dozunun glioblastoma hücrelerinin apoptoza gitmesinde daha etkili olduğu söylenebilmektedir.

Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür ve kanser hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri apoptoza gitmekten kaçınmalarıdır. Apoptoza gitmeyen hücrelerin büyüme, çoğalma ve ölümleri arasındaki homeostazinin bozulmasıyla kanser gelişir. Apoptoz hedeflenerek kanser hücrelerinin etkili şekilde eliminasyonu kanser tedavisi için uzun zamandır hedef haline gelmektedir (Carneiro ve El-Deiry, 2020). Bu sebeple U-87MG insan glioblastoma hücrelerinde 72 saatlik GAG uygulaması sonrasında apoptoz durumunu daha kapsamlı incelemek için bu mekanizmanın farklı basamaklarında görev alan BAX, Bcl-2, kesilmiş kaspaz-3 ve PARP1 protein fragmentlerinin ekspresyon seviyeleri western blot yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Uygulama sonrası GAG'ın her iki dozunun apoptozu indükleyen pro-apoptotik proteinlerden olan BAX'ın ekspresyonunu artırırken, apoptozu inhibe ederek hücre ölümünü düzenleyen anti-apoptotik proteinlerden olan Bcl-2'in anlatımını ise önemli

ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Apoptozun önemli bir ölçütü olan BAX/Bcl-2 oranı her iki GAG dozunda artış gösterirken 1000 µg/mL dozunda bu artışın çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kaspazlar apoptozda rol oynayan proteolitik aktiviteye sahip enzimlerdir ve apoptozun uyarılmasından sonra kesilerek inaktif formdan aktif forma dönüşürler. GAG uygulaması sonrası kaspaz-3 aktif formunda oldukça yüksek bir artış olduğu görülmüştür. Ayrıca, DNA'ya bağlanarak onarımında görevli olan PARP1'in kesilmiş formu olan p89'daki artış, DNA onarımında azalmayı ve apoptoz indüksiyonundaki artışı göstermiştir. Elde edilen bu veriler GAG'ın dozuna bağlı olarak artan apoptozu gösterdi.

Glikozaminoglikanların U-87MG glioblastoma hücreleri üzerindeki apoptoz ve hücre döngüsünde görevli olan p53 ve p21 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri western blot metodu ile belirlenmiştir. 72 saatlik uygulaması sonrası, hücre döngüsü inhibitörü ve anti-proliferatif efektör olarak işlev gören p53 ve p21 proteinlerinin ekspresyonlarında her iki dozda da kontrole göre artış tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, GAG'ın doz bağlı olarak p21 ve p53 proteinlerinin anlatım seviyelerinde artış sağladığını göstermiş ve GAG'ın anti-kanser etki mekanizmasına p21 ve p53 proteinlerinin de dahil olduğuna dair kanıtlar sağlamıştır.

Literatür incelendiğinde bazı araştırmalar sonucunda, sülfatlanmış polisakkaritlerin in vitro kanser hücre hatlarında antiproliferatif aktiviteye ve ayrıca farelerde yapılan çalışmalarda büyüyen tümörlerde inhibe edici aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Krichenve diğ., 2017). Buna ek olarak, bu doğal polisakkaritlerin birkaç kanser hattı üzerinde yapılan çalışmalarda apoptozu indüklediği ve tümör hücresi ölümünü aktive etmek için bağışıklık sistemi hücrelerini uyardığı ortaya konulmuştur (Aisa ve diğ., 2005). Elde edilen veriler ile literatürde bulunan sonuçlar arasında bir uyum gözlemlenmektedir.

Endoplazmik retikulum (ER) ökaryotik hücrelerde bulunan lipid, steroid ve proteinlerin sentezlenmesinden, protein katlanmasından, post-translasyonel modifikasyonlardan sorumlu organeldir (Ergin ve Gökmen, 2015; Yadav ve diğ., 2014). Hipoksi, Ca⁺² konsantrasyonlarındaki değişiklik ve besin yoksunluğu gibi koşullar endoplazmik retikulumda homeostazinin bozulmasına neden olur (Kim ve Kim, 2018). Bunun sonucunda endoplazmik retikulumun sahip olduğu iki membran arasındaki boşluk olan lümende katlanmamış proteinler birikir ve ER stres meydana gelir.

ER stresin çözülmemesi durumunda hücrelerde apoptoz uyarılır. Hücreler ER stresi ortadan kaldırmak için katlanmamış protein yanıtını (UPR) aktive eder. Bu mekanizmada PERK, IRE1 α ve ATF6 proteinleri yer alırken Grp78 de bu yanıtın aktive olmasında rol alır. Grp78, 78 kDa glukoz ile regüle edilen ER şaperon proteinlerindedir ve ER'nin normal fonksiyonları için gereklidir. UPR sinyalini aktive etme yeteneğine ek olarak antiapoptotik özelliklere sahip bir ER şaperonu olması sebebiyle Grp78, ER stresi için asıl düzenleyicilerdir (Wang ve diğ., 2009). IRE1 α , IRE1 α ve IRE1 β olarak iki izoformu bulunan bir transmembran kinazdır (Chen ve Brandizzi, 2013). UPR yanıtı uyarıldıktan sonra, IRE1 α dimerleşir ve otoposforile olup aktif hale gelir. IRE1 α , ER ilişkili bozunmanın (ERAD) yukarı regülasyonundan sorumlu olan X-box bağlayıcı protein 1'in (XBP1) eklenmesine aracılık eder. PERK, IRE1 α 'ya benzer başka bir tip I ER transmembran kinazdır. Bir ER stres durumunda, PERK kendini dimerize edip, otoposforile olur ve aktif hale gelir. PERK, ökaryotik başlatma faktörü olan eIF2 α 'yı fosforile eder ve ER homeostazını geri kazandıran aktive edici transkripsiyon faktörü 4'ü (ATF4) indükler (Kim ve Kim, 2018).

UPR'nin üçüncü bir düzenleyicisi, bir tip II ER transmembran proteini olan ATF6'dır. ATF6'nın ATF6 α ve ATF6 β olmak üzere iki izoformu vardır. ER stresi üzerine ATF6 α , Golgi'ye geçer ve proteolitik bölünmeye maruz kaldıktan sonra aktive olur.

Daha sonra, aktive edilmiş ATF6 çekirdeğe yer değiştirir ve aşağı akış ("downstream") UPR yanıt genlerini aktive eder. Bu 3 ER-membran ilişkili protein yoluyla UPR sinyalizasyonu gerçekleşir ve yeni proteinlerin sentezine engel olarak katlanmamış proteinlerin stresıyla savaşmak için hücreye yardım ederler. UPR bileşenlerinin beyin, meme, akciğer ve kolon kanseri gibi bir çok kanser türünde aşırı ifade edildiği ortaya konulmuştur (Yadav ve diğ., 2014).

U-87MG glioma hücreleri üzerinde GAG'ın ER stresi markerları olan Grp78, PERK, IRE1 α ve ATF6 p50 proteinlerinin anlatımlarındaki seviye değişimleri belirlenmiştir. Hücre canlılığını %20 azaltan GAG'ın 600 μ g/mL dozu ve hücreye oldukça toksik olan 1000 μ g/mL dozunun Grp78, PERK ve IRE1 α proteinlerinin ekspresyon seviyelerini kontrole göre anlamlı şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca ATF6'nın kesilmiş aktif formu p50 fragmentinin GAG uygulaması sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. Bu veriler GAG'ın U-87MG hücrelerinde doz bağılı olarak ER stresini arttığını, bunda hücre ölümüne katkı sağlamış olabileceğini gösterdi.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında glikozaminoglikanların belirlenen dozlarının U87MG insan glioblastoma hücreleri üzerine sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. İlâveten hücre dışı matrisin önemli bir bileşeni olarak bu maddenin belirlenen süre zarfında kanser hücre fonksiyonları arasında önemli yer tutan hücre migrasyonunda belirli oranda azalmaya sebep oldukları bulunmuştur. Deney çalışmalarının son aşamasında madde uygulanan hücrelerin apoptotik yanıtları incelenmiş ve ER stres üzerine etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen bulgular ışığında, glikozaminoglikanların sitotoksik dozlarının en agresif ve hızlı ölüm oranlarına sahip beyin tümörü olan glioblastoma hücrelerinin apoptoza gitmesini indüklediği, ER stresini artırarak hücre ölümüne katkı sağlayabileceği ortaya konulmuştur. Kanser tedavisinde kullanılan terapötikler ve farmasötiklerin normal hücrelere olan toksik yan etkilerine karşın, glikozaminoglikanların zaten hücrelerimizde bulunan ve düzenleyici rol oynayan bir doğal polisakkarit olması ileride kanser tedavisinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışması sonucunda toplanan verilere göre, GAG'ların sitotoksik dozlarının glioblastoma hücrelerinde migrasyonu azaltıp, hücreler üzerinde ER stresi arttırarak ve apoptozdan kaçmalarına engel olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, glikozaminoglikanların kanser için geliştirilebilecek yeni bir tedavi olabilme ihtimalini arttırmaktadır. Bunlara ek olarak, glikozaminoglikanların genel olarak metastaz ve invazyon ile ilişkisi araştırılmış, ER stres ile ilgili araştırmalar sonucu ortaya konulmuş yayın pek bulunmamaktadır. Bu sebeple çalışmanın literatüre yeni bir katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tseggenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A. D., Pavão, M.S., Tzanakakis, G. N., ve Karamanos, N.K., 2012, Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment, *The FEBS journal*, 279 (7), 1177-1197.
- Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., ve Kizaki, M., 2005, Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways, *American journal of hematology*, 78 (1), 7-14.
- Anjum, K., Shagufta, B. I., Abbas, S. Q., Patel, S., Khan, I., Shah, S. A. A., Akhter, N., ve ul Hassan, S. S., 2017, Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 681-689.
- Bedini, E., Corsaro, M. M., Fernández-Mayoralas, A., ve Iadonisi, A., 2019, Chondroitin, dermatan, heparan, and keratan sulfate: Structure and functions, *Extracellular sugar-based biopolymers matrices*, 187-233.
- Blackhall, F. H., Merry, C. L., Davies, E., ve Jayson, G. C., 2001, Heparan sulfate proteoglycans and cancer, *British journal of cancer*, 85 (8), 1094-1098.
- Brandes, A. A., 2005, Adding temozolomide to radiotherapy prolongs survival in people with glioblastoma: Abstracted from: Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med* 2005; 352: 987–96, *Cancer treatment reviews*, 31 (7), 577-581.
- Carneiro, B. A., ve El-Deiry, W. S., 2020, Targeting apoptosis in cancer therapy, *Nature reviews Clinical oncology*, 17 (7), 395-417.
- Casale, J., ve Crane, J. S., 2019, Biochemistry, glycosaminoglycans.
- Chavante, S. F., Brito, A. S., Lima, M., Yates, E., Nader, H., Guerrini, M., Torri, G., ve Bisio, A., 2014, A heparin-like glycosaminoglycan from shrimp containing high levels of 3-O-sulfated D-glucosamine groups in an unusual trisaccharide sequence, *Carbohydrate research*, 390, 59-66.
- Chen, Y., ve Brandizzi, F., 2013, IRE1: ER stress sensor and cell fate executor, *Trends in cell biology*, 23 (11), 547-555.

- Chhabra, M., Doherty, G. G., See, N. W., Gandhi, N. S., ve Ferro, V., 2021, From cancer to COVID-19: A perspective on targeting heparan sulfate-protein interactions, *The Chemical Record*, 21 (11), 3087-3101.
- Daher, A., ve de Groot, J., 2018, Rapid identification and validation of novel targeted approaches for Glioblastoma: A combined ex vivo-in vivo pharmaco-omic model, *Experimental Neurology*, 299, 281-288.
- Damonte, E. B., Matulewicz, M. C., ve Cerezo, A. S. 2004, Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents, *Current medicinal chemistry*, 11 (18), 2399-2419.
- Datta, S., Pierce, M., ve Datta, M. W., 2006, Perlecan signaling: helping hedgehog stimulate prostate cancer growth, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38 (11), 1855-1861.
- Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E., ve Kruchko, C., 2012, CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009, *Neuro-oncology*, 14 (suppl_5), v1-v49.
- Ergin, K., ve Gökmen, E., 2015, Endoplasmic reticulum stress and pancreatic cancer, *Meandros Medical And Dental Journal*, 16 (1), 20-24.
- Faria-Ramos, I., Poças, J., Marques, C., Santos-Antunes, J., Macedo, G., Reis, C. A., ve Magalhães, A., 2021, heparan sulfate glycosaminoglycans:(Un) Expected allies in cancer clinical management, *Biomolecules*, 11 (2), 136.
- Farmanfarma, K. K., Mohammadian, M., Shahabinia, Z., Hassanipour, S., ve Salehiniya, H., 2019, Brain cancer in the world: an epidemiological review, *World Cancer Res. J*, 6 (5), 1-5.
- Freshney, R. I., 2015, *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*, John Wiley & Sons.
- Gandhi, N. S., ve Mancera, R. L., 2008, The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins, *Chemical biology & drug design*, 72 (6), 455-482.
- Houy, N., ve Le Grand, F., 2018, Administration of temozolomide: Comparison of conventional and metronomic chemotherapy regimens, *Journal of theoretical biology*, 446, 71-78.
- Huang, B., Li, X., Li, Y., Zhang, J., Zong, Z., ve Zhang, H., 2021, Current immunotherapies for glioblastoma multiforme, *Frontiers in immunology*, 11, 603911.

- Kato, Y., Hayatsu, N., Kaneko, M. K., Ogasawara, S., Hamano, T., Takahashi, S., Nishikawa, R., Matsutani, M., Mishima, K., ve Narimatsu, H., 2008, Increased expression of highly sulfated keratan sulfate synthesized in malignant astrocytic tumors, *Biochemical and biophysical research communications*, 369 (4), 1041-1046.
- Khurshid, C., ve Pye, D. A., 2018, Isolation and composition analysis of bioactive glycosaminoglycans from whelk, *Marine Drugs*, 16 (5), 171.
- Kim, C., ve Kim, B., 2018, Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress-mediated apoptosis: A review, *Nutrients*, 10 (8), 1021.
- Krichen, F., Volpi, N., Sila, A., Maccari, F., Mantovani, V., Galeotti, F., Ellouz-Chaabouni, S., ve Bougatef, A., 2017, Purification, structural characterization and antiproliferative properties of chondroitin sulfate/dermatan sulfate from tunisian fish skins, *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 32-39.
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., ve Weller, M., 2019, Molecular targeted therapy of glioblastoma, *Cancer treatment reviews*, 80, 101896.
- Leiphrakpam, P. D., Patil, P. P., Remmers, N., Swanson, B., Grandgenett, P. M., Qiu, F., Yu, F., ve Radhakrishnan, P., 2019, Role of keratan sulfate expression in human pancreatic cancer malignancy, *Scientific reports*, 9 (1), 9665.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., ve Ellison, D. W., 2016, The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary, *Acta neuropathologica*, 131, 803-820.
- Mikami, T., ve Kitagawa, H., 2013, Biosynthesis and function of chondroitin sulfate, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830 (10), 4719-4733.
- Morla, S., 2019, Glycosaminoglycans and glycosaminoglycan mimetics in cancer and inflammation, *International journal of molecular sciences*, 20 (8), 1963.
- Onyeisi, J. O. S., Ferreira, B. Z. F., Nader, H. B., ve Lopes, C. C., 2020, Heparan sulfate proteoglycans as targets for cancer therapy: a review, *Cancer biology & therapy*, 21 (12), 1087-1094.

- Ostrom, Q. T., Patil, N., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., ve Barnholtz-Sloan, J. S., 2020, CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017, *Neuro-oncology*, 22 (Supplement_1), iv1-iv96.
- Pibuel, M. A., Poodts, D., Díaz, M., Hajos, S. E., ve Lomparúa, S. L., 2021, The scrambled story between hyaluronan and glioblastoma, *Journal of Biological Chemistry*, 296.
- Poltavets, V., Kochetkova, M., Pitson, S. M., ve Samuel, M. S., 2018, The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity, *Frontiers in oncology*, 8, 431.
- Qian, W., Tao, L., Wang, Y., Zhang, F., Li, M., Huang, S., Wang, A., Chen, W., Yue, Z., ve Chen, L., 2016, Downregulation of integrins in cancer cells and anti-platelet properties are involved in holothurian glycosaminoglycan-mediated disruption of the interaction of cancer cells and platelets in hematogenous metastasis, *Journal of Vascular Research*, 52 (3), 197-209.
- Rabenstein, D. L., 2002, Heparin and heparan sulfate: structure and function, *Natural product reports*, 19 (3), 312-331.
- Strobel, H., Baisch, T., Fitzel, R., Schilberg, K., Siegelin, M. D., Karpel-Massler, G., Debatin, K.-M., ve Westhoff, M.-A., 2019, Temozolomide and other alkylating agents in glioblastoma therapy, *Biomedicines*, 7 (3), 69.
- Stupp, R., ve Mason, W. Bent MJ van den et al. on behalf of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Brain Tumor and Radiotherapy Groups and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG)., 2005, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for patients with newly diagnosed glioblastoma, *N Engl J Med*, 352, 987-996.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ve Bray, F., 2021, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 71 (3), 209-249.
- Tammi, R. H., Passi, A. G., Rilla, K., Karousou, E., Vigetti, D., Makkonen, K., ve Tammi, M. I., 2011, Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis, *The FEBS journal*, 278 (9), 1419-1428.

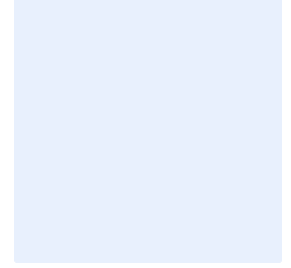
- Tan, A. C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., ve Khasraw, M., 2020, Management of glioblastoma: State of the art and future directions, *CA: a cancer journal for clinicians*, 70 (4), 299-312.
- Thelin, M. A., Svensson, K. J., Shi, X., Bagher, M., Axelsson, J., Isinger-Ekstrand, A., van Kuppevelt, T. H., Johansson, J., Nilbert, M., ve Zaia, J., 2012, Dermatan sulfate is involved in the tumorigenic properties of esophagus squamous cell carcinoma, *Cancer research*, 72 (8), 1943-1952.
- Tzanakakis, G., Giatagana, E.-M., Kuskov, A., Berdiaki, A., Tsatsakis, A., Neagu, M., ve Nikitovic, D., 2020, Proteoglycans in the pathogenesis of hormone-dependent cancers: mediators and effectors, *Cancers*, 12 (9), 2401.
- Valcarcel, J., Novoa-Carballal, R., Pérez-Martín, R. I., Reis, R. L., ve Vázquez, J. A., 2017, Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents, *Biotechnology Advances*, 35 (6), 711-725.
- Volpi, N., 2007, Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates, *Journal of pharmaceutical sciences*, 96 (12), 3168-3180.
- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., ve Lee, A. S., 2009, Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders, *Antioxidants & redox signaling*, 11 (9), 2307-2316.
- Wang, Q., ve Chi, L., 2022, The alterations and roles of glycosaminoglycans in human diseases, *Polymers*, 14 (22), 5014.
- Wei, J., Hu, M., Huang, K., Lin, S., ve Du, H., 2020, Roles of proteoglycans and glycosaminoglycans in cancer development and progression, *International journal of molecular sciences*, 21 (17), 5983.
- Wen, P. Y., ve Reardon, D. A., 2016, Progress in glioma diagnosis, classification and treatment, *Nature Reviews Neurology*, 12 (2), 69-70.
- Yadav, R. K., Chae, S.-W., Kim, H.-R., ve Chae, H. J., 2014, Endoplasmic reticulum stress and cancer, *Journal of cancer prevention*, 19 (2), 75.
- Yan, Z., ve Wang, S., 2020, Proteoglycans as therapeutic targets in brain cancer, *Frontiers in oncology*, 10, 1358.

- Yang, J., Price, M. A., Li, G. Y., Bar-Eli, M., Salgia, R., Jagedeeswaran, R., Carlson, J. H., Ferrone, S., Turley, E. A., ve McCarthy, J. B., 2009, Melanoma proteoglycan modifies gene expression to stimulate tumor cell motility, growth, and epithelial-to-mesenchymal transition, *Cancer research*, 69 (19), 7538-7547.
- Yu, M. W., ve Quail, D. F., 2021, Immunotherapy for glioblastoma: current progress and challenges, *Frontiers in immunology*, 12, 1637.
- Zhao, T., Zhou, Y., Mao, G., Zou, Y., Zhao, J., Bai, S., Yang, L., ve Wu, X., 2013, Extraction, purification and characterisation of chondroitin sulfate in Chinese sturgeon cartilage, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (7), 1633-1640.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Nebahat Buşra Aksoy
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Üsküdar Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik (İngilizce)
Mezuniyet Yılı	22.06.2018

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik