



**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÖK HÜCRE-BENZERİ MEME KANSERİ  
HÜCRELERİNİN METİLPRİDİNYUM  
FONKSİYONLU  
*P-TER-BÜTİLKALİKS[4]AREN DİAMİD*  
NANOLİF İSKELELER ÜZERİNDE  
BÜYÜTÜLEREK ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

**NOORA OMAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**NANOTEKNOLOJİ VE İLERİ MALZEMELER ANABİLİM DALI**

Ağustos-2019

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

NOORA SABAH OMAR OMAR tarafından hazırlanan “Kök Hücre Benzeri Meme Kanseri Hücrelerinin Metilpridinyum Fonksiyonlu p-tert-bütilkaliks[4]aren Diamid Nanolif İskeleler Üzerinde Büyütülerek Zenginleştirilmesi” adlı tez çalışması 08/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

#### Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Nizamettin ÖZDOĞAN

#### Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi Saliha DİNÇ

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ  
FBE Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



**NOORA OMAR**

15 / 08 / 2019

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# KÖK HÜCRE-BENZERİ MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN METİLPRİDİNYUM FONKSİYONLU P-TER-BÜTİLKALİKS[4]AREN DİAMİD NANOLİF İSKELELER ÜZERİNDE BÜYÜTÜLEREK ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

NOORA OMAR

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

Yardımcı Danışman: Prof. Dr. Şeref ERTUL

2019, 94 sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI  
Dr. Öğr. Üyesi Nizamettin ÖZDOĞAN  
Dr. Öğr. Üyesi Saliha DİNÇ

Bu çalışmanın amacı, in vitro ortamda meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerindeki metil piridinyum fonksiyonelleştirilmiş p-tert-butilcaliks [4] arenin (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) sitotoksik etkisini araştırmaktır. Sitotoksik dozlar, XTT analizi ve xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenmiştir. 2AMP, 3AMP ve 4 AMP'nin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla, 391.40 µM, 40.96 µM ve 105.52 µM olarak hesaplandı. Daha sonra elektrospinning tekniği ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP nanolifleri üretildi ve MCF-7 hücreleri nanolifler üzerinde kültüre edildi. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve konfokal taramalı lazer mikroskobu ile hücre çoğalması ve bu iskeleler üzerindeki morfolojik farklılaşmaları gözlemlendi. Hücre proliferasyonu ve farklılaşma kapasitesi bu iskelelerde XTT analizi ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, 2-AMP ve 4-AMP nanoliflerin, MCF-7 hücrelerinin büyümesi ve çoğalması için 3 boyutlu (3D) bir iskele olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Meme kanseri hücrelerinin ve anti-kanser araştırmalarının morfolojik özelliklerinin çalışılabileceği daha iyi bir platform olacaktır. Bunun yanı sıra, 3-AMP nanolifleri, meme kanseri kök hücre büyümesi ve zenginleştirme için kanser kök hücre araştırması için bir platform olarak kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanser, Kök hücre, MCF-7, Antikanser, Kaliks[4]aren

## ABSTRACT

### MS THESIS

#### ENRICHMENT OF STEM CELL-LIKE BREAST CANCER CELLS BY GROWTH ON METYLPYRIDINIUM FUNCTIONALIZED *P-TERT*-BUTYLCALIX[4]ARENE DIAMIDE NANOFIBER SCAFFOLDS

NOORA OMAR

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
SELÇUK UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN NANOTECHNOLOGY AND  
ADVANCED MATERIALS

Advisor: Asst. Prof. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

Co-Advisor: Prof. Dr. Şeref ERTUL

2019, 94 Pages

#### Jury

Asst. Prof. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

Asst. Prof. Dr. Nizamettin ÖZDOĞAN

Asst. Prof. Dr. Saliha DİNÇ

The aim of this study is to investigate the cytotoxic effect of methyl pyridinium functionalized *p-tert*-butylcalix [4] arene (2AMP, 3AMP and 4 AMP) on breast cancer MCF-7 cell line in vitro environment. Cytotoxic doses were determined by XTT analysis and xCELLigence real-time cell analysis system. IC<sub>50</sub> values of 2-AMP, 3-AMP and 4-AMP were calculated as 391.40 µM, 40.96 µM and 105.52 µM, respectively. Then 2-AMP, 3-AMP and 4-AMP nanofibers were produced by electrospinning technique and MCF-7 cells were cultured on the nanofibers. Cell proliferation and morphologic differentiation on these scaffolds were observed by scanning electron microscope (SEM) and confocal scanning laser microscope. Capacity of cell proliferation and differentiation were determined on these scaffolds by XTT analysis. As a result, it has been concluded that 2-AMP and 4-AMP nanofibers could be used as a 3-dimensional (3D) scaffolds for the growth and proliferation of MCF-7 cells. They will be better platform on which the morphological characteristics of the breast cancer cells and anti-cancer research could be studied. Besides this, 3-AMP nanofibers could be used for breast cancer stem cell growth and enrichment as a platform for cancer stem cell research.

**Keywords:** Breast cancer, Stem cell, MCF-7, Anticancer, Calix[4]aren

## ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince hiçbir yardımı esirgemeyen, her daim her konuda maddi manevi destekçim olan, sevgi ve ilgisiyle bilgilerini ve tecrübelerini aktaran, kendime örnek aldığım sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI' ya,

Tezime olan katkılarından dolayı yardımcı danışman hocam Doç. Dr. Şeref ERTUL a,

Deneylerimde kullandığım maddelerin yapımında rolü olan Öğr. Gör. Dr. Fatih ÖZCAN a,

Laboratuvarıda tez deneylerimde yardımcı olan arkadaşlarım Emine GÖK, Esin ŞİRİN, K.Kübra ÇİNİ, Zuhair MOHAMMED, Müslüm AĞAÇ ve H.Esra AKGÜL hocama,

Laboratuvar uzmanımız Öğr. Gör. Dr. Emine YAVUZ ve Öğr. Gör. Dr. Zeynep SARI ya,

Laboratuvarlarında tez çalışmamı yaptığım İLTEK e ve tüm personeline, Sonsuz teşekkür ederim.

NOORA OMAR

KONYA-2019

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                      |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ÖZET .....</b>                                                                                    | <b>iv</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                 | <b>v</b>   |
| <b>ÖNSÖZ .....</b>                                                                                   | <b>vi</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                                                                             | <b>vii</b> |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>                                                                 | <b>ix</b>  |
| <b>1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMA .....</b>                                                            | <b>1</b>   |
| <b>1.1. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması .....</b>                                        | <b>3</b>   |
| <b>1.2. Kök Hücreler .....</b>                                                                       | <b>4</b>   |
| <b>1.3. Kanser Kök Hücreleri .....</b>                                                               | <b>5</b>   |
| 1.3.1. Meme kanseri kök hücrelerinin kökeni .....                                                    | 5          |
| 1.3.2. Meme kanseri kök hücrenin belirteçleri .....                                                  | 6          |
| 1.3.3. Kanser kök hücreleri ve sinyal yolları .....                                                  | 9          |
| 1.3.4. Meme kanseri kök hücrelerinin düzenlenmesinde diğer sinyaller ve karışma .....                | 12         |
| <b>1.4. Meme Kanseri İlerlemesinde Kanser Kök Hücrelerinin Rolü .....</b>                            | <b>13</b>  |
| 1.4.1. Metastazı teşvik etmede meme kanseri kök hücrelerinin rolü.....                               | 13         |
| 1.4.2. Meme kanseri kök hücreleri kemo ve radyasyon direnci .....                                    | 14         |
| 1.4.3. Meme kanserinin kök hücrelerinin tümör nüksünde rolü .....                                    | 17         |
| <b>1.5. Üç Boyutlu (Organoid) Kök Hücre Kültürlerin Tarihçesi .....</b>                              | <b>17</b>  |
| 1.5.1. Kök hücre kültürü koşulları .....                                                             | 18         |
| 1.5.2. Kök Hücre kültürü sitotoksikite değerlendirmesi .....                                         | 19         |
| 1.5.3. Üç boyutlu hücre kültürü ve güncel prelinik kanser tümör modelleri.....                       | 21         |
| 1.5.4. Üç boyutlu hücre kültürü yöntemleri .....                                                     | 24         |
| 1.5.5. İlaç keşfinde 3B kök hücre kültürünün uygulamaları.....                                       | 27         |
| <b>1.6. Nanolif Üç Boyutlu İskele Tasarımı ve Kök Hücreler.....</b>                                  | <b>28</b>  |
| 1.6.1. Hsc kültürünü destekleyen nanolif polimerleri.....                                            | 29         |
| 1.6.2. Üç boyutlu nanoliflerin yüzey modifikasyonu .....                                             | 30         |
| 1.6.3. Kök hücre geleceğinde üç boyutlu nanoliflerin fiziksel ipuçları.....                          | 30         |
| <b>1.7. Elektro-Döndürme ile Üretilen Nanolifler .....</b>                                           | <b>31</b>  |
| 1.7.1. Elektro döndürme malzemelerinin özellikleri .....                                             | 31         |
| 1.7.3. Meme kök hücreler ve electrospun nanolifler uygulamaları .....                                | 32         |
| <b>1.8. Kaliksarenler Ve Oluşumunu Etkileyen Faktörler.....</b>                                      | <b>32</b>  |
| 1.8.1. Kaliksarenlerin kimi hususları .....                                                          | 34         |
| 1.8.2. Kaliksarenlerin biyolojik yürütüm bölgeleri.....                                              | 35         |
| <b>1.9. İnsan Adenocarcinoma Meme Kanseri (MCF-7 Hücre) Hattı Kökeni Ve Genel Özellikleri .....</b>  | <b>37</b>  |
| <b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>                                                                    | <b>39</b>  |
| <b>2.1. Kimyasal Örnek Analizleri .....</b>                                                          | <b>39</b>  |
| 2.1.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin <i>p-tert</i> -bütikaliks[4]arenin diamit türevleri sentezi: ..... | 39         |

|                                                                                                                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP nanolif yüzeylerin üretimi ve analizleri .....                                                                                                                     | 40        |
| <b>2.2. Nanolif Yüzey Sterilizasyonu:.....</b>                                                                                                                                                  | <b>40</b> |
| <b>2.3. Biyolojik Numune Analizleri .....</b>                                                                                                                                                   | <b>42</b> |
| 2.3.1. MCF-7 hücre hattının kültürü ve çözündürülmesi.....                                                                                                                                      | 42        |
| 2.3.2. Hücre hattının pasajlanması.....                                                                                                                                                         | 43        |
| 2.3.3. MCF-7 hücre hattının dondurma işlemi.....                                                                                                                                                | 45        |
| 2.3.4. MCF-7 hücresinin sayımı ve ekimi .....                                                                                                                                                   | 45        |
| 2.3.5. MCF-7 hücre hattının canlılık testi-XTT analizi .....                                                                                                                                    | 46        |
| 2.3.6. MCF-7 hücre hattının metilen mavisi boyama analizi.....                                                                                                                                  | 48        |
| 2.3.7. MCF-7 hücre hattının gerçek zamanlı (xCELLigence) analizi .....                                                                                                                          | 49        |
| 2.3.8. Konfokal mikroskopta MCF-7 hücre hattının analizi.....                                                                                                                                   | 50        |
| 2.3.9. Taramalı elektron mikroskopta (SEM) MCF-7 hücre hattının analizi : .....                                                                                                                 | 51        |
| <b>3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>                                                                                                                                                  | <b>53</b> |
| <b>3.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin'nin Yapı, Karakterizasyon ve Analiz Sonuçları... 53</b>                                                                                                      | <b>53</b> |
| 3.1.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin'nin FT-IR analizlerinin sonuçları .....                                                                                                                       | 53        |
| 3.1.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin AFM, SEM ve TEM analizleri .....                                                                                                                               | 56        |
| <b>3.2. MCF-7 Hücresi Nanolif Üzerinde Ekerken Metilen Mavisi Boyası İle İnv</b>                                                                                                                | <b>56</b> |
| <b>Mikroskop Görüntüleri .....</b>                                                                                                                                                              | <b>56</b> |
| <b>3.3. Hücre Canlılığı Testleri .....</b>                                                                                                                                                      | <b>58</b> |
| 3.3.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin nanolifleri'nin hücre canlılığı ve sitotoksite (XTT) analizlerinin sonuçları .....                                                                            | 58        |
| 3.3.2. 2,3 ve 4-Aminometilpridinlerin XTT yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki MCF-7 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi .....                                                      | 60        |
| 3.3.3. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin MCF-7 hücreleri üzerinde. % hücre canlılığı grafiğinin ve IC <sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması .....                                                    | 62        |
| 3.3.4. (xCELLigence) 2, 3 ve 4-Aminometilpridinlerin MCF-7 Hücre Hatlarına Karşı Gerçek Zamanlı Analiz Yöntemi ile Sitotoksite Analizi.....                                                     | 66        |
| 3.3.5. (xCELLigence) 2, 3 ve 4-Aminometilpridinlerin MCF-7 hücre hatlarına karşı gerçek zamanlı analizi kullanılarak invert mikroskop altındaki MCF-7 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi..... | 69        |
| <b>3.4. Lazer Konfokal Mikroskopu Sonucu.....</b>                                                                                                                                               | <b>71</b> |
| <b>3.5. 2, 3 ve 4-AMP Nanolifelerin Lazer Mikroskopu (SEM) Sonucu.....</b>                                                                                                                      | <b>73</b> |
| <b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>                                                                                                                                                            | <b>77</b> |
| <b>4.1 Sonuçlar .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>77</b> |
| <b>4.2 Öneriler .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>79</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                                                                                                                          | <b>80</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                                                                                                                           | <b>93</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\mu$  : Mikro  
 $\alpha$  : Alfa  
 $\beta$  : Beta

### Kısaltmalar

|                       |                                                        |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|
| 2-AMP                 | : 2-Aminometilpridin p-tert-bütikaliks[4]aren          |
| 3-AMP                 | : 3-Aminometilpridin p-tert-bütikaliks[4]aren          |
| 4-AMP                 | : 4-Aminometilpridin p-tert-bütikaliks[4]aren          |
| 2B                    | : İki Boyutlu                                          |
| 3B                    | : Üç Boyutlu                                           |
| ALI                   | : Hava Sıvı Arayüzeyi                                  |
| MCF-7                 | : İnsan Adenokarsinoma Meme Kanseri Hücre Hattı        |
| CSC                   | : Kanser Kök Hücre                                     |
| BCSC                  | : Meme Kanseri Kök Hücre                               |
| CHCl <sub>3</sub>     | : Kloroform                                            |
| CHCl <sub>2</sub>     | : Diklorometan                                         |
| cm                    | : Santimetre                                           |
| CYP                   | : Sitokrom P450                                        |
| DMSO                  | : Dimetil Sülfoksit                                    |
| ECM                   | : Ekstraselüler Matriks                                |
| FT-IR                 | : Fourier Transform Infrared Spektroskopi              |
| g                     | : Gram                                                 |
| H <sub>2</sub> O      | : Su                                                   |
| Hanks's Salt Solution | : Tuz Tampon Çözeltilisi                               |
| IC <sub>50</sub>      | : Yarı Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu              |
| ITO                   | : İndium Tin Oxide                                     |
| L                     | : Litre                                                |
| mL                    | : Mililitre                                            |
| MSC                   | : Mezenkimal Kök Hücreler                              |
| hSC                   | : İnsan Kök Hücreler                                   |
| MCTS                  | : Çok Hücreli Tümör Sferoidleri                        |
| CTC                   | : Dolaşımdaki Tümör Hücreler                           |
| TNBC                  | : Üçlü Negatif Meme Kanseri                            |
| mV                    | : Milivolt                                             |
| nm                    | : Nanometre                                            |
| NMR                   | : Nükleer Manyetik Rezonans x                          |
| ppm                   | : Milyonda Bir Birim                                   |
| SEM                   | : Taramalı Elektron Mikroskopu                         |
| $\mu$ m               | : Mikrometre                                           |
| $\mu$ M               | : Mikromolar                                           |
| SFE                   | : Mammosphere Küre Oluşturma Verimliliğini             |
| MMTV                  | : Fare Meme Tümör Virüsü (Mouse Mammary Tumor Virus )  |
| NICD                  | : Notch Hücre İçi Alanını (Notch Intracellular Domain) |
| TAM                   | : Tümörle İlişkili Makrofajlar                         |
| ESRP                  | : Epitel Ekleme Düzenleyici Proteinler                 |

|      |                                                       |
|------|-------------------------------------------------------|
| ROS  | : Reaktif Oksijen Türlerine (Reactive Oxygen Species) |
| hPSC | : Pluripotent Kök Hücreleri                           |
| hESC | : İnsan Embriyonik Kök Hücreleri                      |
| PLLA | : Poli-L-laktik Asit                                  |
| PLGA | : Poli Laktik-co-Glikolik Asit                        |
| PCL  | : Poli Kaprolakton                                    |
| PHA  | : Polihidroksialkananoat                              |
| TNF  | : Tümör Nekroz Faktörü                                |



## 1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMA

Kanser, vücudun herhangi bir yerinde anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi şeklinde tanımlanabilir. Bu anormal hücreler, kanser hücreleri, kötü huylu hücreler veya tümör hücreleri olarak adlandırılır. Bu hücreler normal vücut dokularına sızabilir. Birçok kanser ve kanser dokusunu oluşturan anormal hücreler, anormal hücrelerin köken aldığı doku adı ile de tanımlanır (örneğin, meme kanseri, akciğer kanseri, kolorektal kanser). Kanser insanlarla sınırlı değildir; hayvanlar ve diğer canlı organizmalar kansere yakalanabilir. Sıklıkla, kanser hücreleri orijinal hücre külesinden ayrılabilir, kan ve lenf sistemlerinde dolaşabilir ve kontrolsüz büyüme döngüsünü tekrarlayabilecekleri diğer organlarda kalabilir. Bir bölgeden çıkan ve başka bir vücut bölgesinde büyüyen kanser hücrelerinin bu sürecine metastatik yayılma veya metastaz denir (DeVita Jr., ve ark. 2012).

Meme kanseri ise , en yaygın epidermal olmayan kanser türüdür ve dünya genelinde kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Siegel, R.L., ve ark. 2016). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), tahmin edilen 260.000 yeni vaka ve meme kanseri nedeniyle 2018'de 40.000'in üzerinde ölüm olacağı öngörülmüştür (National Cancer Institute, NCI, 2018).Geliştirilmiş gözetim ve erken teşhis, son 30 yılda meme kanseri ölüm istatistiklerini iyileştirirken, kabul edilemez bir şekilde bu hastalıkla ilişkili ölüm oranı görülme sıklığı ve nüks görülmeye devam etmektedir (Lindeman, G.J., ve ark. 2010).

On yıllardır, geçerliliği otoriterlerce kabul edilmiş kanser başlatma ve ilerleme teorisi, kanserlerin normal somatik hücrelerde genetik mutasyonların seri birikiminden kaynaklandığı yönünde olmuştur. Bu mutasyonların gelişmiş proliferasyon(proliferation), farklılaşmanın engellenmesini ve indiergenmiş apoptozis (apoptosis) açısından seçici bir avantaj sağladığı düşünülmektedir. Takip eden her mutasyonun ilerici "de-differentiation" a yol açtığı düşünülmüş ve mutasyonlar biriktikçe hücrenin daha ilkel bir fenotipe (phenotype) gerilemesi beklenmiştir. Farklılaştırılmış (diffrentiated) hücrelerin sınırlı bir ömrü vardır ve öyle ki, hücrelerin dönüşmesi için yeterli mutasyonları biriktirmesi nadir görülen bir olay olduğu tahmin edilmiştir. Dönüştürüldükten sonra, kanser hücreleri süresiz olarak çoğalacak ve tümörler oluşturabilecek ve her uygulanabilir tümör hücresi eşit olarak yeni bir tümör oluşturabilecektir.

Somatik hücrelerde sıralı olarak edinilen mutasyonların modeli muhtemelen aşırı derecede basittir ve son yıllarda bir kanser kök hücresi kavramı (Concept of a cancer stem cell (CSC)) önemli bir ivme kazanmıştır (Alferez, D.G. ve ark. 2018; Sin, W.C., ve ark., 2017).

Kanser kök hücre teorisi başlangıçta akut miyeloid lösemide (myelogenous leukemia) belgelenmiştir (Bonnet, D., ve ark., 1997; Lapidot, T ve ark., 1994). Bu çalışmalar, fare modellerinde sadece küçük bir hücre alt kümesinin lösemiye başlatabildiğini göstermiştir. Seri transplantasyon çalışmaları  $CD34^+CD38^-$  hücrelerinin kendini yenileme kapasitesinin arttığını ortaya koymuş olup bunun yanında, bu hücrelerin tutarlı bir şekilde klonojenik (clonogenic) olan tanımlanabilir bir alt küme olduğu da kanıtlanmıştır (Bonnet, D., ve ark., 1997). Bu, tümörlerin normal dokuya benzer bir hücresel hiyerarşi ile organize olduğu ve tümör oluşumundan ve büyümesinden sorumlu olan küçük bir hücre alt kümesi tarafından tutulduğu hipotezine yol açmıştır (Reya, T., ve ark., 2001).

CSC'ler; kendini yenileme (yani, bir hücrenin farklılaşmamış bir durumda kendini süresiz olarak yenileme kabiliyeti), sınırsız proliferatif(proliferative) potansiyel, zayıflayıcı yavaş çoğaltma, yüksek DNA onarım kapasitesi ve asimetric hücre bölünmesi ile farklılaşma potansiyeli olan, kız hücrelere (daughter cells) yol açma becerisi dahil olmak üzere normal doku kök hücrelerine benzer birkaç temel özelliğe sahiptir, bununla birlikte, yüksek oranda regüle edilmiş doku kök hücrelerinin aksine, CSC'ler düzensiz kendini yenileme/farklılaşma programlarını gösterirler, sistemik kemoterapiye dirençlidirler ve farklılaşmanın çeşitli aşamalarında durdurulan kız (daughter cells) hücreler üretirler, bu gözlemler, CSC'nin kendini yenileyebilen tek hücre tipi olması nedeniyle, bunların yeni tümör oluşumunu başlatmaktan sorumlu olan hücreler olabileceğini göstermektedir (Wicha, M.S ve ark., 2006).

Meme kanserinde küçük hücre popülasyonları tanımlanmış ve meme kanseri kök hücreleri (breast cancer stem cells BCSC) olarak adlandırılmıştır. Mammosphere oluşumu deneyleri bu hücrelerin davranışını değerlendirmek için popüler ve uygun bir yoldur, bu tahlillerde, BCSC'lerin kültür ortamına, düşük yapılı doku petri kablarında (culture dishes) epidermal büyüme faktörü ve temel fibroblast büyüme faktörü eklenmesi ile çoğalmaları uyarılmaktadır (Lombardo, Y ve ak. 2015; Dontu, G.ve ark. 2004). Bu düşük bağımlılık koşulları altında çoğalan hücreler, yaygın olarak " (mammospheres)" olarak tanımlanan ve kök hücre ile ilişkili sinyalleşme yollarının

aktivasyonu dahil olmak üzere bir dizi kök hücre ile bağlantılı özellik içeren sferoidlere(spheroids) yol açar (Dontu, G.,ve ark. 2003).

Ayrıca, “mammospheres”lerin oluşum oranı, seyreltme fare ksenograft (dilution Mouse xenograft) çalışmalarını sınırlandırırken ölçülen zaman ana dokunun tümörojenisitesi (tumorigenicity) ile iyi koreledir (Grimshaw, M.J. ve ark. 2008; Ponti, D. ve ark. 2005), ve bu nedenle, bir popülasyondaki hücre yapısı oluşturuvcu hücrelerin sayısının BCSC sayılarını yansıttığı düşünülürken, gıda maddelerinin büyüklüğünün çoğalma aktivitesini yansıttığı düşünülmektedir. Bu stratejinin düşük kaplama yoğunluğu, BCSC'lerin sınırlı bir toplanma ile yapışmayan küreler oluşmasını sağlar ve klasik iki boyutlu (2D) yapışan doku kültürü stratejilerinden daha üç boyutlu tümör yapılarına benzer.

Mammosphere oluşum deneyleri hem temel doku hem de meme kanseri hücre çizgilerinden türetilen mammospherelerin küre oluşturma verimliliğini (sphere forming efficiency) (% SFE) hesaplamak için kullanılabilir (Lombardo, Y ve ark. 2015).

### **1.1. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması**

Moleküler sınıflandırmada, hastalığın regülasyonunda mekanizmaların açıklanmasını ve tedaviyi zorlaştıran durumlar vardır. Bunlar; meme kanserinin kompleks bir hastalık olması ve meme tümörlerinin farklı özellikleri olan heterojen tümörler olmasıdır. Bu durum yeni biyobelirteçlerin araştırılmasını zorunlu kılmıştır. Mikrodizin yöntemi kullanılarak geliştirilen gen ifadesi çalışmalarıyla, klasik sınıflandırmayla beraber meme kanseri, moleküler olarak da sınıflandırılmıştır.

Perou ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan kapsamlı gen ifade analizi çalışması ile meme kanseri, luminal hücre benzeri, normal epitel benzeri, bazal hücre benzeri ve HER2+ olarak 4 gruba ayrılmıştır (Perou CM, Sørle T., 2000).

Daha sonra luminal tipin kendi arasında luminal A ve luminal B olarak gruplanmasıyla 5 alt tipe ayrılmıştır. 2007 yılında yapılan çalışmayla bu alt tiplere, sıkı bağlantı proteinleri claudin 3, 4 ve 7 ve bir Ca bağımlı hücre-hücre adezyon glikoproteini olan E-cadherin'in düşük gen ifadesi ile karakterize edilen “claudin low” eklenmiştir. Böylece meme kanseri moleküler olarak 6 alt tipe ayrılmıştır (Herschkowitz, J.I.; Simin, K., 2007).

## 1.2. Kök Hücreler

Vücuttaki tüm hücreler kendine özgü amaçlara sahiptir, fakat kök hücreleri henüz belirli bir role sahip olmayan ve gerekli durumlarda hemen hemen her hücreye dönüşebilirler.

Kök hücreler, vücudun ihtiyaç duyduğu spesifik hücrelere dönüşme yeteneği olan farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücreler iki ana kaynaktan köken alır; embriyo ve kordon kanı.

Embriyonik kök hücre: Embriyonik kök hücre araştırmaları, son yıllarda bilim çevrelerinde yoğun ilgi duyulan bir konudur. Bu durum, özellikle çeşitli hastalıklarla mücadele için taşıdıkları yüksek potansiyelden ve insan blastokistlerinden elde edildikleri için sahip oldukları etik boyuttan kaynaklanmaktadır.

Evans ve Kaufman 1981’de fare embriyosundan, embriyonik kök hücre elde etmeyi başarmışlardır. Bu çalışmadan sonra, Thomson ve ark., 1998’de, ilk kez insan embriyonik kök hücre dizilerini laboratuvarında geliştirmişlerdir (Evans MJ, Kaufman MH., 1981; Thomson JA., ve ark. 1998).

İlk yıllarda bu hücreler, in vitro fertilizasyon yöntemleri ile üreme amaçlı çalışmalar için ortaya çıkmışlardır. Daha sonra deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere bağışlanmışlardır. 2007 yılında, aynı araştırmacılar, genetik olarak reprogramlamayla bazı özelleşmiş erişkin kök hücrelerinden, kök hücre benzeri hücrelerin oluşumuna izin veren gerekli koşulları belirlemiş. Sonrasında bu hücreleri uyarılmış pluripotent kök hücreler olarak adlandırmışlardır (Yu J, Vodyanik MA, Otto K., ve ark., 2007).

Kordon kanı; gebelik boyunca anne ile bebek arasındaki bağlantıyı sağlayan ve bebeğin besin ile oksijen gereksinimini karşılayan göbek kordonundaki kan kordon kanıdır. İçerisinde erişkin kanında olan lökosit, eritrosit ve trombosit gibi kan hücrelerine ilave olarak erişkin kanında bulunandan daha yüksek kök hücreler bulunur.

Eski yıllarda atık kabul edilen kordon kanı, artık tedavi amacıyla kullanılmakta veya özel koşullarda dondurulup saklanmaktadır. Günümüzde tıbben kabul gören kullanım alanı, bağışıklık sistemi ve kan hastalıklarıdır. Kordon kanı az hacimde (yaklaşık 100ml) olduğundan içeriğinde bulunan toplam hematopoetik kök hücre miktarı, kemik iliği veya büyüme faktörüyle uyarılmış periferik kandan elde edilenden hacimden daha azdır. Bu nedenle, şimdiye kadar genellikle çocuklara uygulanmıştır. Ancak son yıllarda birkaç bebekten alınan kanın, tek bir hastaya da uygulanabilirliği fark edilince erişkinlerde de kullanılmaya başlanmıştır.

### 1.3. Kanser Kök Hücreleri

Hücrelerin, çeşitli kanser hücrelerinde, kök hücrelerde bulunan yüzey belirteçlerinin olduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin kök hücrelerle olan benzerlikleri, onlardan köken alıp almadığını düşündürmektedir. Kanser kök hücreleri ve normal kök hücreler arasındaki benzerlikler;

- ✓ asimetrik hücre bölünme özelliği göstermeleri,
- ✓ kendini yenileme için kullanılan Wnt, Sonic Hedgehog (SHH), Notch gibi ortak sinyal hatlarına sahip olmaları,
- ✓ benzer transkripsiyon faktörleri (Oct-4, Nanog, Sox2, Nodal, Klf4 gibi) eksprese etmeleri,
- ✓ ilaçlara karşı direnç göstermeleri,
- ✓ metastaz ve belirli bir bölgeye yerleşme ile ilgili ortak yüzey reseptörlerine (CXC4, CD133, c-kit, c-met) sahip olmaları şeklindedir.

Kök hücrelerin asimetrik bölünme özelliği ve kendini yenileme, kanser hücresinin telomeraz aktivitesindeki artışla birleştiğinde sonsuz bölünme durumu ortaya çıkar.

Hücrelerin malign karakter kazanıp metastaz yapmaları, hücre zarındaki taşıyıcı mekanizmaları değiştirmeleri, apoptozu engellemeleri ve tutunmadan büyüebilmeleri gibi niteliklere sahip olmaları, kanser tümör hücrelerinin de özellikleridir.

#### 1.3.1. Meme kanseri kök hücrelerinin kökeni

Meme CSC'lerin nihai kökeni hakkındaki tartışmalar, bu alanda yıllarca süregelmiştir. Meme CSC'lerin multipotent meme kök hücrelerinden (Mammary Stem Cells (MaSC)) elde edilip edilmediği, homojen bir progenitör popülasyonu olup olmadığı, kök olmayan hücrelerin ayrılmasının ortaya çıkmasından veya bir kombinasyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığı hala açık değildir. En yaygın kabul gören görüş, meme CSC'lerin MaSC ve progenitör hücrelerden kaynaklandığıdır. Lineage izleme (Lineage Tracing) çalışmaları, meme bezi içinde gelişmekte olan, sırasıyla tamamen farklılaşmış lüminal ve bazal hücre soylarını uzun süre boyunca sürdüren ve destekleyen lüminal ve bazal progenitör hücrelerin varlığını göstermektedir (Rios, A.C. ve ark. 2014; Van Keymeulen ve ark. 2011).

Bu progenitör hücrelerde mutasyonların birikmesinin hem MaSC hem de BCSC popülasyonlarında  $CD44^{+}/CD24^{-/low}$  benzer fenotipik özellikleri gösterdiği için

BCSC'lere yol açabileceği düşünülmektedir (Visvader, J.E.; Stingl, J. 2014; Liu, S.; Cong, Y. ve ark. 2014).

Kök olmayan hücrelerden farklılaşma, son yapılan araştırmalarda elde edilen kanıtlarla desteklenen başka bir teoridir. Kemoterapi ve radyoterapiye çevresel maruz kalma kök olmayan hücrelerde genetik ve epigenetik değişikliklere neden olur ve bu da BCSC'nin tekrar üretimine neden olur (Lagadec, C. ve ark. 2012).

Tümör mikro çevresindeki değişiklikler ayrıca kök olmayan hücrelerin BCSC fenotipine fark edilmesine katkıda bulunabilir (Chaffer, C.L. ve ark., 2013).

Yapılan araştırmalarda elde edilen son kanıtlar, MYC güdümlü epigenetik yeniden programlamanın, meme epitelyal hücrelerin BCSC benzeri bir fenotipte dediferansiyasyona yol açtığını göstermektedir (Poli, V. ve ark 2018).

Özet olarak, meme kanserinde “köklüğün”, doku kök hücrelerinin mutasyonu veya EMT, kemoterapi veya transforme hücreler tarafından kök benzeri bir fenotip edinilmesiyle ortaya çıkabilen bir fenotip olduğu anlaşılmaktadır.

Bhola ve arkadaşları son zamanlarda, üçlü negatif meme kanserinde, mTOR'a ve/veya PI3K inhibitörlerinin, Notch'e bağlı Meme CSC'nin ortaya çıkmasıyla gözlemlendiğini göstermiştir. İlave bir komplikasyon, meme kanserlerinin, özellikle de üçlü negatif meme kanserlerinin, orijinal bir dönüştürülmüş klondan yarı-Darwinist evrimden türetilmiş çoklu klonlardan oluşabileceğidir (Bhola, N.E. ve ark. 2016).

Elde edilen bilgiler ışığında, her bir klonun kök benzeri bir popülasyona sahip olup olmadığı veya Meme CSC'li klonların, kök benzeri hücreler olmadan diğer klonların hayatta kalmasını destekleyip desteklemediği açık değildir. Tek hücreli DNA ve RNA dizilimi bu soruyu ele alacaktır, ancak alan halen başlangıç aşamasındadır (Liu, M.; Liu, Y ve ark. 2018).

### **1.3.2. Meme kanseri kök hücrenin belirteçleri**

Araştırmalar, Meme CSC'lerin mevcut tümörler olduğunu ve özgün bir belirteç seti tarafından tanımlandığını göstermiştir. Daha önce yayınlanmış birçok raporda, Meme KKH'lerin spesifik belirteçler kullanarak habis tümörlerden izolasyonu tarif edilmiştir (Wang, Lv ve ark. 2014). Bununla birlikte, diğer çalışmalar BCSC'lerin tümörlerde heterojen bir popülasyon halinde bulunduğunu göstermiştir ve bu, BCSC'lerin farklı zamanlarda, farklı belirteçleri farklı ifade seviyeleri ile birlikte

açıklanabileceğini göstermiştir. Bu, kanser kök hücreleri (cancer stem cells (CSC)) hakkındaki diğer teoriler ile tutarlıdır (Hwang-Verslues, Lee ve ark., 2009).

Kök hücre heterojenliği hakkında iki teori vardır. Birincisi, farklı tümörlerde farklı CSC'lerin varlığı ile ilgilidir. İkincisi, farklı tümörlerin tek bir kök hücreden nasıl kaynaklanabileceğini tanımlayan klonal evrim teorisi ile ilgilidir.

Yakın tarihli bir rapor, kanser progenitör hücreleri ve CSC'ler arasında belki de dinamik bir denge olduğunu göstermiştir, bir CSC, bir progenitör kanser hücresine dönüşebilir ve bir progenitör kanser hücresi bir CSC' ye dönüşebilir. Bu, CSC'lerin ve progenitör kanser hücrelerinin dinamik bir biçimde bir arada var olduğunu ileri sürmüştür (Li ve Laterra 2012).

CSC'ler ve kanser progenitör hücreleri arasındaki ilişki, CSC'lerin tanımlanması için bir marker kombinasyonu belirleme zorunluluğu yaratır.

CSC' ye özgü biyobelirteçlerin (biomarkers) geliştirilmesi, aynı vitro ve vivo meme kanseri modellerinin yanı sıra hastalarda da tanımlanmasını ve onaylanmasını kolaylaştırmıştır. Tanımlama ve doğrulama amaçlı rutin olarak kullanılan moleküler markerler, CD44, CD24, ALDH1 ve CD133'tür (deBeça ve ark., 2013).

CD44, hücre sinyalleşmesinde, yapışmasında ve göçünde belirgin bir rol oynadığı bilinen bir hücre yüzeyi glikoproteinidir, birkaç kanıt parçası, kanser hücresi proliferasyonunu, anjiyogenez (angiogenesis), istilayı ve metastazı düzenlediğini göstermektedir (Senbanjo ve Chellaiah, 2017).

Son yayınlanan raporlarda, CD44'ün hyaluronik asit (hyaluronic acid) ve/veya osteopontin (osteopontin (OPN)) ile etkileşime girdiği, hücre canlılığı, istila, anjiyogenez (angiogenesis) ve metastaz gibi çeşitli işlevleri yerine getirdiği gösterilmiştir (Aruffo ve ark., 1990).

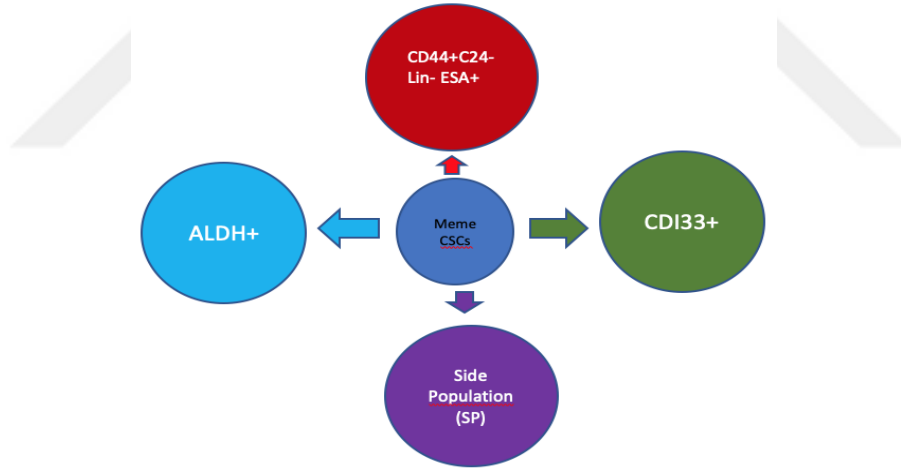
Pietras ve ark çalışmalarında, perivasküler nişteki OPN / CD44 sinyal ekseninin glioblastomda (glioblastoma) CSC fenotipini desteklediğini bildirmiştir (Pietras ve ark., 2014), ve diğer raporlu olan , tümör veya stroma kaynaklı OPN'nin ayrıca CD44 ekspresyonunu indüklediğini ve böylece farklı kanser türlerinde CSC fenotipini kontrol ettiğini göstermektedir (Butti ve ark., 2015).

CD24, birçok hücre tipinin yüzeyinde eksprese edilen bir yapışma glikoproteinidir ve P-selektin için yeni keşfedilen bir ligandır (Schäck ve ark., 2016).

CD24 ekspresyonu oldukça farklılaşmış tümör hücrelerinde bulunur (luminol tipi), CD44'ün daha yüksek ifadesi ve CD24'ün daha düşük ifadesi CSC popülasyonunu işaret eder (Kwon ve ark., 2015).

CD44 ve CD24 ekspresyonunun kombinasyonu epitelyal antijen (ESA) ile birlikte BCSC markörü olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. 200 ESA+/CD44+/CD24– kadar düşük bir sürede meme tümöründen türetilen hücreler, imüno-bastırılmış farelere ortotopik olarak uygulandıklarında tümör oluşturabildiler, bununla birlikte, aynı tümörlerden izole edilen bu belirteçler olmadan 100 kat daha fazla hücre, farede bir tümör oluşturamadığı gözlenmiştir. Ek olarak, ESA+/CD44+/CD24– hücrelerinden üretilen tümörlerin, başlangıçtaki tümörlerin heterojenliğini tekrar özetleyebildiği görülmüştür (Al-Hajj ve ark., 2003).

Ayrıca, CD44<sup>+</sup> CD24 hücrelerinin immün sistemi baskılanmış farelere implantasyonu, daha yüksek kemik metastazı gösterir, ve CD44 +/CD24 tümörlerinin ER hastalarında zayıf klinik sonuçlarla ilişkili olduğunu, ER<sup>+</sup> hastalarında daha uzun sağkalım oranları ile ilişkili olduğunu göstermiştir, bu ER hastalarında CD44<sup>+</sup>/CD24 tümörlerinin kemo-dirençli özelliğinden meslektaşlarına göre daha yüksek olabilir (Kim ve ark., 2012).



**Şekil 1.4.1.** Meme kanseri kök hücreleri farklı belirteçlere sahiptir.

ALDH1 ayrıca Meme KKH'lerin bir işaretidir. Hücre içi aldehitlerin karboksilik asitlere oksidasyonunu katalize eden detoksifiye (detoxifying) edici bir enzimdir. ALDH1'in hücrelerdeki etkinliği, kök hücre fenotipi ile ilişkilidir ve ALDEFLOUR testi ile değerlendirilir. Bu nedenle, ALDH1, Meme CSC'lerin bir işareti olarak yaygın şekilde kullanılır ve ekspresyonu, meme kanserinde zayıf klinik sonuç ile ilişkilidir. ALDH1 ekspresyonu ayrıca meme kanserinde ilaç direnci ile de bağlantılıdır (Moreb ve ark., 2012).

son zamanlarda yapılan bir çalışma CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> CSC popülasyonunun anatomik olarak ALDH1<sup>+</sup> ve CSC'lerden farklı olduğunu bildirmiştir. Bu popülasyonların moleküler profili, CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> alt popülasyonunun, sakin halde metasimal (mesenchymal) fenotip sergilediğini, ALDH1<sup>+</sup> ve alt popülasyonunun ise proliferatif potansiyeli yüksek olan epitel fenotipini gösterdiği gözlenmiştir. (Liu ve ark., 2013a).

CD133, Ayrıca üçlü negatif meme kanserinde (TNBC) ve BRCA-1 mutant tümörlerinde CSC'ye özgü bir marker olarak da görev yapar.

CD133'ün spesifik fonksiyonları belirlenmemiş olsa da CD133'ün farklı birleşme varyantlarının kolesterol ile etkileşime girdiği ve bu nedenle Hedgehog sinyal yolunda rol oynadığı bilinmektedir (Liu ve ark., 2013b).

Tümör başlatan hücreler ayrıca farelerde lümen progenitör hücrelerinden gelişen Her2/neu ile indüklenen meme tümörlerinde CD49f ve CD61 tarafından tanımlanır (Lo, P.K ve ark., 2012).

### **1.3.3. Kanser kök hücreleri ve sinyal yolları**

Embriyonik gelişim ve kök hücre bakımı, karmaşık ve oldukça düzenli süreçlerdir. Yetişkin dokularda kök hücrelerin embriyonik gelişimi ve idamesi için sayısız sinyal yolu esastır (Burdon ve ark., 2002), başlıca Notch, Wnt ve Hedgehog ve bunların çapraz bağlantıları olan birkaç anahtar sinyal yolu kök hücreye özgü özellikleri dikte eder (Katoh, 2007).

Bu sinyal yollarının işlevsizliği, kendini yenileme özelliklerini gösterir ve böylece CSC fenotipinin azalmasına yol açar, köklülükle ilişkili genlerde aşırı aktif aktivasyon veya mutasyon sıklıkla bildirilir ve saldırganlık ve kanser nüksü ile ilişkilidir (Takebe ve ark., 2011).

#### **1.3.3.1. Meme kanseri kök hücre fenotipinin düzenlenmesinde Notch( Çentik) sinyalleşmesi**

Notch, embriyogenez (embryogenesis) boyunca gerekli olan ve kök hücre kaderinin, hücre farklılaşma, apoptoz ve hücre döngüsü ilerlemesinin belirlenmesinde rol oynayan önemli bir transmembran sinyal reseptörüdür.

Notch (çentik) ailesi, Notch 1-4 reseptörlerinden oluşur, bunların pürüzlü proteinler (JAG1 ve JAG2) ve delta benzeri ligandlar (DLL1, DLL3 ve DLL4) gibi beş farklı ligand ile bağlandığı bilinmektedir, hem Notch reseptörleri hem de ligandları, bitişik hücrelerde eksprese edilen transmembran proteinleridir (Chillakuri ve ark., 2012).

Hücre teması boyunca ligand-reseptör etkileşimi, Notch sinyalini aktive eder. Çentik (Notch) proteinleri, hücre dışı ve hücre içi alanlarını içerir. Hücre dışı bölge, ligand bağlanması için önemli olan EGF (Epidermal Growth Factor) benzeri tekrarlardan oluşur. Notch-ligand etkileşimi, ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) ve sekretaz tarafından Notch hücre içi alanını (Notch Intracellular Domain, (NICD)) serbest bırakmak için art arda iki proteolitik bölünme meydana getirir (Ranganathan ve ark., 2011).

Daha sonra, NICD çekirdeğe yer değiştirir ve aşağı akım sinyal (cascades) çağlayanlarının aktivasyonuna yol açan CSL'den (CBF1 / Tüysüz / LAG1 Baskılayıcı / LAG1) / RBPJ transkripsiyon faktörlerinden yer değiştirir (Acar ve ark., 2016).

Fare meme tümör virüsü (Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)) kaynaklı fare meme tümöründe Notch sinyalizasyonu ve meme kanseri arasındaki ilk olası bağlantı yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir.

### **1.3.3.2. Meme kanseri kök hücrelerinin korunmasında Wnt sinyalleri**

Wnt sinyalizasyonunun, evrimsel olarak korunmuş ve embriyonik gelişim, doku homeostazı ve kanser dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik fonksiyonlarda hayati bir rolü vardır (Wang ve Wynshaw-Boris, 2004).

Wnt, Frizzled (FZD), bir yedi transmembran serpantin reseptörü ve düşük yoğunluklu reseptör ile ilgili protein 5/6 (LRP5/6) için bir ligand olarak görev yapan bir glikoproteindir (MacDonald ve He, 2012).

Şimdiye kadar on dokuz Wnt ligandı tanımlanmıştır. Wnt, cysteine-rich korunumlu bir motifine sahiptir, salgı için bir N-terminal sinyal peptidi ile birlikte 350-400 amino asitten oluşur.

Wnt ve reseptörü arasındaki etkileşim, kanonik veya kanonik olmayan sinyalizasyon gibi iki farklı mekanik basamağı tetikler, kanonik yolda, Wnt ligandlarının reseptörlerle bağlanması, kanonik Wnt sinyalleşmesinin merkezi oyuncusu olan  $\beta$ -katenin stabilitesini belirler, Wnt ligandlarının yokluğunda, sitoplazmada

bulunan  $\beta$ -katenin fosforilasyona uğrar ve sonuçta deformasyon kompleksi ile proteazomal (proteasomal) bozulma geçirir.

İmha kompleksi, axin, adenomatous poliposis coli (adenomatous polyposis coli), glikojen sentaz kinaz(synthase kinase)  $3\beta$  ve kazein kinaz(casein kinase) I- $\alpha$  gibi birkaç proteinden oluşur (Reya ve Clevers, 2005).

Wnt'nin kendi konik reseptörleri ile bağlanması, yıkılan kompleksi hücre içi proteini olarak imha kompleksi oluşturur, bu nedenle, çeşitli  $\beta$ -katenin-TCF / LEF hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu modüle etmek için  $\beta$ -katenin nükleusa translokasyonuna yol açan sitoplazmada fosforile edilmemiş  $\beta$ -katenin seviyeleri artar (Takebe ve ark., 2011).

### **1.3.3.3. Meme kanseri kök hücre fenotipinin düzenlenmesinde kirpi sinyal (Hedgehog signaling)**

Hedgehog (Kirpi) (HH) sinyalleri, embriyonik gelişim ve doku homeostazı sırasında çeşitli hücresel süreçlerde önemli bir rol oynar ve ayrıca hücre kaderinin ve kendini yenilemenin kilit bir düzenleyicisidir (Briscoe ve Thérond, 2013).

Memelilerde, Sonic Hedgehog, Hint Hedgehog (Kirpi) ve Çöl Hedgehog gibi üç Hedgehog(Kirpi) homologu (ligand) bildirilmiştir, bu proteinler bir öncü protein olarak sentezlenir ve ayrıca oto-proteolitik bölünme, çift lipit modifikasyonları ve asilasyon (Hedgehog asiltransferaz ile) dahil olmak üzere çeşitli transasyon sonrası modifikasyonlar ile aktive edilir ve bu proteinlerin, plazma zarının sitoplazmik tarafındaki Dispatched (Disp) ve Scube2 proteini ile bağlanması, bu proteinlerin sinyal hücrelerinden hücre dışı boşluğa boşaltılmasıyla sonuçlanır.

Genel olarak, HH (Hedgehog) ligandlarının karşılık gelen hücreye yokluğunda, bir hücre dışı transmembran proteini olan Patched (PTCH), transmembran proteininin, plazma zarındaki Pürüzsüzleştirilmiş (SMO) lokalizasyonunu yapısal olarak inhibe eder. Sonuç olarak, tam uzunluktaki GLI proteini, Sufu (erimiş baskılayıcı) proteini içeren kompleksin içinde tutulur ve daha sonra HH (Hedgehog) hedef gen ekspresyonunu inhibe etmek için GLI transkripsiyonel baskılayıcıyı üretmek üzere PKA, GSK3 and ve  $\beta$ -TrCP'nin alınmasıyla kısmen ayrılır (Takebe ve ark., 2011).

#### 1.3.4. Meme kanseri kök hücrelerinin düzenlenmesinde diğer sinyaller ve karışma

Diğer sinyal yolları ve PI3K/Akt/mTOR ve JAK/STAT dahil çapraz konuşmaları KKH zenginleştirilmesi ve bakımı ile ilgilidir, bağımsız sinyallerin anormal düzenlenmesi meme kanserine neden olabilir, ancak bu sinyal yollarında neredeyse hiç izolasyon kullanmamaktadır.

RTK (receptor tyrosine kinases) sinyalinin düzensizliği, meme kanseri nüksüne ve ilaç direncine önemli bir katkıda bulunur, EGFR, PDGFR, VEGFR, AXL, vb. Dahil olmak üzere farklı RTK sınıflarının, meme kanserinde büyük bir rol oynadığı ve BCSC'lerin bakımında rol oynayan çeşitli anahtar sinyallerle çapraz bağlanan ortak aşağı akış sinyalleşme (cascades) kaskadlarını paylaştığı bilinmektedir (Butti ve ark., 2018).

PI3K, anahtar kök yollarını birbirine bağlayan birçok RTK için önemli ortak akış aşağı moleküllerden biridir, AXL, bir RTK üyesidir ve aşırı ekspresyonu, meme kanserinde tümör evresi ile ilişkilidir.

AXL sinyalinin zenginleştirilmesi, MAPK, NF- $\kappa$ B, STAT, PI3K / Akt gibi çeşitli sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile ilişkilidir. AXL'in kurucu aktivasyonunun BCSC'lerde bildirildiği ve Snail, Slug, E-cadherin ve N-cadherin dahil CSC ile ilişkili EMT markörlerinin ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir (Zhang ve Grivennikov, 2013).

NF- $\kappa$ B'nin parakrin aktivasyonunun, meme kanserinde Notch sinyalleşmesinin aktivasyonu yoluyla CSC'lerin genişlemesini arttırdığını bildirmiştir, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler), CAF'ler ve immün hücreler, büyüme faktörleri ve sitokinler sağlar ve böylece CSC popülasyonunu zenginleştirir ve korurlar.

leptin-LEPR-JAK-STAT3 sinyalinin, kendini yenileme ve kemorezlenmeye bağlı BCSC'lerde yağ Asit Ox- Oksidasyonunu (FAO) aktive ettiğini önermiştir, FAO'nun aktivasyonu, ATP üretimini artırarak ve oksidatif stresi azaltmak için reaktif oksijen türlerinin birikimini azaltarak CSC'lerin sayısız metabolik avantajına katkıda bulunabilir (Wang ve ark., 2018).

## 1.4. Meme Kanseri İlerlemesinde Kanser Kök Hücrelerinin Rolü

### 1.4.1. Metastazı teşvik etmede meme kanseri kök hücrelerinin rolü

Metastaz, kanser hücrelerinin primer tümörden vücudun uzak kısımlarına yayılmasıdır, metastaz süreci, çoklu sinyal yolları ile sıkı bir şekilde düzenlenir, kanser hücrelerinin istila işlemi ile kan dolaşımına girdiği ve uzak bölgelerde yeni bir tümör oluşturmak için dolaşımda hareket ettiği karmaşık bir süreçtir.

Artan kanıtlar, içsel anoikisine dirençli(anoikis-resistant) özelliği nedeniyle KKH'lerin metastazdan sorumlu olduğunu göstermektedir.

Anoikis, ankraj bağımlı hücrelerde substratı çıkardıklarında indüklenen düzenlenmiş bir hücre ölümüdür. Kanser hücrelerinin çoğu dolaşımda ölürken, KKH'ler hayatta kalmakta ve uzak bölgelerde metastatik lezyonlar kurmaktadır (Kim ve ark., 2012, 2016).

Dolaşımdaki tümör hücrelerinin (CTC'ler), bu hücrelerin hayatta kalmasına yardımcı olabilecek gelişmiş LKB1 seviyeleri gösterdiği gözlenmiştir (Trapp ve ark., 2017).

Meme KKH'ler, CXCR4'ün daha yüksek ifadesini gösterir. CXCR4 sinyalinin SDF-1 ile uyarılması, meme kanseri hücrelerinde mamofor oluşturma kapasitesini ve anoikis direncini indükler (Ablett ve ark., 2014).

Wnt aktivasyonunun ayrıca anoikisine dirençli hücre popülasyonunda daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Lamb ve ark., 2013), Metalloproteaz-disintegrinin (metalloprotease-disintegrin) aşağı regülasyonu, ADAM12, EGFR sinyal yolunun aktivasyonunu baskılayarak claudin düşük meme kanseri hücrelerinde hücre göçünü, istila ve anoikis direncini azaltır (Duhachek-muggy ve ark., 2017).

CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> Meme KKH alt popülasyonunda, CD44v varyantını eksprese eden hücreler, CD44 varyant eksprese eden hücrelerinkinden daha yüksek meta-statik yetenek gösterir, CD44'ün farklı varyantlara eklenmesine epitel ekleme düzenleyici proteinleri (ESRP'ler) aracılık eder. MCF10CA1h hücrelerinde ESRP1'in aşırı ekspresyonunun CD44v'nin ekspresyonunu arttırdığı ve akciğer metastazını arttırdığı da gözlenmiştir (Hu ve ark., 2017).

Wnt/ $\beta$ -catenin yolu, Meme CSC aracılı metastazın düzenlenmesinde rol oynayan önemli yollardan biridir, Survivin'in sakın Meme CSC'lerde eksprese edildiği bulunmuştur ve bu nedenle meme kanseri metastazı lehinedir. Survivin, PI3K/Akt

bağımlı Wnt yolunu aktive ederek KKH'lerin kendini yenilemesine yardımcı olur (Siddharth ve ark., 2016).

Ayrıca, antraks toksin reseptörü 1 (ANTXR1) gibi BCSC fonksiyonel biyobelirteçinin RNAi yaklaşımıyla aşağı doğru regüle edilmesinin susturulması da bulunmuştur, Wnt yolu BCSC'lerde metastazı genler ve azaltır, ve buna bağlı olarak, meme kanseri hücrelerinin Çin bitkisel ilaçları olan Shikonin (Shk) ile tedavisi, STAT3, FAK ve Src'nin metastaz için önemli olduğunu ortaya koymuştur.

STAT3'ün başlatılmasının CSC fenotipini FAK veya Src'nin inhibisyonuna kıyasla anlamlı şekilde etkilediği görülmüştür. STAT3 ve Src veya STAT3 ve FAK'ın kombine inhibisyonu, bireysel atmosferlerin inhibisyonundan ziyade, mammosphere oluşumunu, istilasını ve göçünü önemli ölçüde azaltır (Thakur ve ark., 2015).

Tümör çekirdeğinde bulunan intrinsik CSC'ler (iCSC'ler), kök olmayan hücreleri göç eden CSC'lere (mCSC'ler) dönüştürerek metastazda yardımcı olur, MCSC'lerin CXCR4'ü ifade ettiği ve tümör metastazından sorumlu oldukları, ancak iCSC'lerden sorumlu oldukları bildirilmiştir, ayrıca CD44, CXCR4 ve OPN ekspresyonunun BCSC'lerde daha yüksek olduğu ve meme kanseri hücrelerinin kemiğe metastazında rol oynayabilecekleri gösterilmiştir (Ling vd., 2008).

Benzer şekilde, Smo ekspresyonu, CSC'lerde kök olmayan kanser hücrelerine kıyasla yüksektir, Smo ekspresyonunun spesifik siRNA tarafından inhibe edilmesinin, Smo'nun, meme kanserinde CSC'nin aracılık ettiği metastazında önemli bir rol oynayabileceğini düşündüren MCF-7 hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9'un aşağı regülasyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2014a).

#### **1.4.2. Meme kanseri kök hücreleri kemo ve radyasyon direnci**

Radyoterapi, yüksek DNA radyasyonunun doğrudan DNA aşırı tahribatına neden olan veya serbest radikallerin oluşumuna neden olarak kanser hücrelerini öldürmek için kullanıldığı, meme kanseri tedavisi için standart bir yöntemdir ve bununla birlikte, radyasyon direnci meme kanseri tedavisi için önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir, radyo direnci esas olarak katı tümörlerde bulunan BCSC'lerden kaynaklanır (Balaji ve ark., 2016).

CSC'ler, değiştirilmiş / daha yüksek DNA onarım enzimleri ekspresyonu, DNA onarım kontrol noktası proteinleri ve serbest radikal süpürme sisteminin daha yüksek aktivasyonu yoluyla radyoterapiye direnç gösterir (Wang, 2014a).

Meme CSC'ler, kanser kök hücre olmayanlara kıyasla serbest radikal temizleme sisteminin bileşenlerinin gelişmiş ifadesi nedeniyle daha yüksek serbest radikal temizleme kapasitesine sahiptir. Bu reaktif oksijen türlerine (Reactive Oxygen Species, (ROS)) bağlı DNA hasarını ve hücre ölümünü azaltabilir (Diehn ve ark. 2009).

Bildiğimiz gibi NFκB, transkripsiyon faktörü olarak çeşitli patolojik ve fizyolojik süreçlerde zorunlu bir rol oynar, bu bağlamda, NFκB, ROS / diğer serbest radikallere zarar veren DNA temizleyicileri olan ve apoptotik sinyal yollarının aşağı regülasyonunda yer alan MnSODandMKP1 gibi bir dizi anti-apoptotik genin aktivasyonunu indükler, böylece BCSC'ler, tekrarlayan memekanserin saldırganlığının artmasına neden olan NFκB modülasyonlu bir prosurvival sinyal yoluyla DNA'ya zarar veren radyoterapiye direnç kazanır (Guo ve ark., 2003).

Her2 (reseptör tirozin kinaz), CSC'ler için güvenilir bir biyobelirteç olarak kabul edilmiştir ve Her2'nin aşırı ekspresyonu, artan tümör agresifliği ve nüksü ve zayıf prognoz ile ilişkilidir (Korkaya ve ark., 2008).

Daha önceki çalışmalar radyoterapinin Her2'nin ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir. Bu, radyoterapinin neden olduğu Her2 + ve BCSC'lerin tümör tedavisine direnç ve artmış agresiflikle nüks etmekten sorumlu olabileceğini göstermektedir (Duru ve ark., 2012).

Tümör heterojenliği ve BCSC'ler, bu östrojen karşıtı ilaçlara karşı kazanılmış direnç geliştirilmesinde ana aktörlerdir, anti-östrojen tedavisi, tümörleri plastisite uyandırır ve prolaktin ile tahrik edilen ER + ve meme tümörlerinde kanser köklüğünü artırır (Shea ve ark., 2018), ayrıca, miRNA'ların CSC aracılı ilaç direncinde çok önemli bir rol oynadığı da bildirilmiştir.

Kök hücre yollarının düzenlenmesinde farklı miRNA'ların rolü, CSC bakımı ve CSC aracılı ilaç direnci Tablo 1.4.2.'de listelenmiştir.

Li ve ark., (2016), miR-24'ün BCSC fenotipini düzenlediğini göstermiştir, Hipoksik stres ve diğer toksik uyarıcılar (İlaç tedavisi koşulları) altında miR-24 ekspresyonu BCSC'lerde artmıştır ve sırayla FIH1 ve BimL'i düşürerek bu faktörlere karşı direnci arttırmaktadır, miR-24 ayrıca BimL ekspresyonunu baskılayarak kemoterapinin neden olduğu apoptozise müdahale eder, miR-221/222, Akt / NF-κB aracılı COX-2 ekspresyonunu aktive ederek BCSC fenotipini uyarır (Li ve ark., 2016).

Ayrıca miR-221 / 222'nin p27'yi hedefleyerek meme kanserinde ilaç direncini düzenlediğini göstermiştir (Miller ve ark., 2008), daha önce tartışıldığı gibi, BCSC'ler yüksek seviyede ALDH1 ifade eder. Detoksifiye edici bir enzim olarak, hücrelerde

ALDH1 ve 3, siklofosfamid gibi anti-kanser maddelerini ve ifosfamid, mafosfamid ve 4-hidroperoksi siklofosfamid gibi analoglarını metabolize eder (Parajuli ve ark., 2014).

Tüm bu raporlar, CSC aracılı ilaç direncinin hedef alınmasının, tümör nüksünü kontrol etmek ve hastalıksız sağkalımı artırmak için yararlı olabileceğini göstermektedir.

**Tablo. 1.4.2** KKH'nin aracılık ettiği meme kanseri ilerlemesini ve ilaç direncini düzenlemede miRNA'ların rolü.

| miRNA       | Fonksiyon                                                                    | Aksiyon modu                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| miR-24      | 1 Kök bakım<br>2 İlaç direncini artırır                                      | 1 FIH1'in aşağı regülasyonu (Rosigno et al., 2017)<br>2 BimL'nin Aşağı Yönlendirilmesi (Rosigno et al., 2017)                                                                                                                                                                              |
| miR-221/222 | 1 BCSC fenotipini uyarır<br>2 İlaç direncini artırır                         | 1 Akt / NF-κB aracılı COX-2 ifadesinin aktivasyonu (Li et al., 2016)<br>2 Hedefleme p27 (Miller et al., 2008)                                                                                                                                                                              |
| Let-7c      | 1 CSC'lerin kendini yenilemesini azaltır<br>2 İlaç direncini tersine çevirir | 1 ERα geninin 3'UTR bölgesine bağlanarak östrojen reseptörü ekspresyonunu düşürür<br>ve ERα tarafından Wnt sinyalinin aktivasyonunu inhibe eder (Sun et al., 2016)<br>2 CSC'lerin kendini yenileme özelliğini düzenleyerek tamoksifenin anti-tümör aktivitesini artırır (Sun et al., 2018) |
| Mir-208a    | BCSC'lerin kendini yenilemesini artırır.                                     | Let-7a'nın ifadesini yasaklar (Sun et al., 2015)                                                                                                                                                                                                                                           |
| miR-10b     | CSC'lerin kendini yenilemesini artırır                                       | PTEN ifadesini Aşağıya çekerek düzenler (Bahena-Ocampo et al., 2016)                                                                                                                                                                                                                       |
| miR-27a     | BCSC'lerde endotel özelliklerini geliştirir.                                 | VEGF tarafından uyarılan ifade (Tang et al., 2014)                                                                                                                                                                                                                                         |
| miR-142     | BCSC'lerde köklüğünü artırır                                                 | APC seviyesini düşürerek Wnt sinyalini aktive eder. (Isobe et al., 2014)                                                                                                                                                                                                                   |
| miR-374a    | Metastazı artırır                                                            | PTEN ve WIF'yi engelleyerek Wnt sinyalinin aktivasyonu (Cai et al., 2013)                                                                                                                                                                                                                  |
| miR-600     | Susturma kök hücrenin artmasına neden olur<br>Fenotip                        | Susturma, kanonik olmayan Wnt sinyal yolunun aktivasyonuna neden olur. (El Helou et al., 2017)                                                                                                                                                                                             |
| miR-340     | Göç, istila ve metastazı azaltır                                             | Wnt hedef genlerinin aşağı regülasyonu (Mohammadi-Yeganeh et al., 2016)                                                                                                                                                                                                                    |
| miR-489     | Ters İlaç direnci                                                            | Kilit bir apoptotik protein XIAP'ı hedefleyerek BCSC'lerde ilaç direncini tersine çevirir (Wang et al., 2017)                                                                                                                                                                              |

### 1.4.3. Meme kanserinin kök hücrelerinin tümör nüksünde rolü

Tümör başlangıcı ve ilerlemesi kanser gelişiminde iki önemli süreçtir, tümör başlangıcı, kendini yenileme ve farklılaşma olarak bilinen iki temel fenomen gerektirir, CSC'lerin yaşam boyunca kendi popülasyonlarını kendi kendini yenileştirme adı verilen bir işlemle koruduğu ve ayrıca farklılaşma işlemi ile tümör yığına katkıda bulunan fenotipik olarak farklı neoplastik hücreler ürettiği gösterilmiştir.

Kendi kendini yenileme, inen hücrelerin birinin veya her ikisinin, havuzunu koruyan kök hücreler olarak kaldığı bir hücre bölünmesi türüdür, CSC'lerin kendini yenilemesi ve farklılaşması sıkıca kontrol edilen süreçlerdir ve hem iç hem de dış sinyaller tarafından hafifletilebilir, genomdaki mutasyonlar, normal kök hücrelerin neoplastik kök hücrelere dönüşmesine neden olan Wnt, Notch ve Hedgehog gibi kök hücre-kendi kendini yenileme yollarının kontrolsüz aktivasyonunu indükleyen içsel faktörlerin türüdür (Economopoulou ve ark., 2012).

CSC'lerin kendi kendini yenilemesi, CSC'lerin fibroblastlar, bağışıklık hücreleri ve endotel hücreleri gibi stromal hücreler ve stroma kaynaklı büyüme faktörleri ve kemokinler gibi stromal hücrelerle etkileşimi gibi dışsal faktörlerle de düzenlenir (Albini ve ark., 2015).

### 1.5. Üç Boyutlu (Organoid) Kök Hücre Kültürlerin Tarihçesi

Bilim insanları hücrenin normal işleyişini, hastalıklarda yapısının nasıl değiştiğini, tedavide kullanılıp kullanılamayacağını çalışmalarıyla aydınlatmak istemişlerdir. İlk uzun süreli insan hücre kültürü, 1975'de James Rheinwald ve Howard Green tarafından fibroblast ve keratinosit hücreleri ile yapıldı, o zamandan bu yana gelişen teknoloji, bilgi birikimi ve bilim insanlarının farklı açılarla bilinmeyene yaklaşımları sayesinde inanılmaz bir ilerleme kaydedildi, günümüzde hücre sadece yapıtaşı olmaktan çıktı ve tedavi hedefi haline geldi.

İki boyutlu klasik hücre kültüründen üçüncü bir boyuta geçiş, fizyolojik koşullara bir adım daha yaklaşmamızı sağladı, üç boyutlu kültür teknolojisinde embriyonik kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler, erişkin kök hücreleri aracılığıyla bağırsak, mide, akciğer, beyin, retina, böbrek gibi organların yapısal ve fonksiyonel özelliklerini yansıtan organoid yapıları elde edilmektedir.

Literatüre baktığımızda, organoid terimi ilk olarak 1946'da teratom ile aynı anlamda kullanılmıştır. 1965'li yıllarda ise biyologların bu terimi organotipik kültürler için kullandığını görüyoruz. 2009 yılından itibaren Hans Clever ve Toshiro Sato ile başlayan yeni yöntemle organoidler, 3 boyutlu kültürde kök hücrelerden büyüyen organ spesifik yapıları ifade etmektedir.

Enfeksiyon hastalıkları, kalıtsal hastalıklar, toksikoloji çalışmaları, kanser, bireyselleştirilmiş tıp, gen tedavisi gibi araştırma alanlarında organoidlerin kullanımı artmış durumdadır. İlgili organdaki tüm hücresel komponentleri içermesi hücre ilişkilerini anlamamızı kolaylaştırmaktadır. Enfeksiyon hastalıklarında hücreler ile patojen arasındaki ilişki incelenebilmektedir. Kalıtsal hastalıklarda ve kanserde hastalardan alınan örneklerle gen mutasyonları araştırılabilmekte, normal hücrelerde CRISPR/CAS9 teknolojisi ile genetik değişiklik sağlanarak bu hastalıklar taklit edilebilmekte, ayrıca bu hastalıkların gelişimi ile ilgili ayrıntılı çalışma olanağı elde edilebilmektedir. Toksikoloji ve bireyselleştirilmiş tıpta ise ilaç direnci çalışmaları yapılabilmektedir.

Yeni ve sınırlamaları olan bir kültür sistemi olsa da organoid kültürleri umut vaat etmekte ve araştırmalara yeni bir boyut kazandırılmasını sağlamaktadır.

### 1.5.1. Kök hücre kültürü koşulları

Kültür ortamı hazırlanması destek hücreleri ile embriyonik kök hücre kültüründe kullanılan kültür ortamı için önerilen oranlar Tablo 1.5.1. de gösterilmiştir.

| <b>Solüsyonlar</b>                         | <b>Destek Hücresi Kültür Ortamı</b> | <b>hES Kültür Ortamı</b> |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| DMEM(*)                                    | 458.5 ml                            | 404.5 ml                 |
| FBS(*)                                     | 50 ml                               | 75 ml                    |
| Penisilin/streptomisin (100X)              | 5 ml                                | 5 ml                     |
| L-Glutamine-200 mM(*) (Günlük)             | 5 ml                                | 5 ml                     |
| Nonesans, Aminoasit solüsyonu (100X), NEAA |                                     | 5 ml                     |
| ITS 100X(*) (Günlük)                       |                                     | 5 ml                     |
| $\beta$ -ME(*)                             | 500 $\mu$ l                         | 500 $\mu$ l              |
| Toplam Hacim                               | 500 ml                              | 500 ml                   |

Tablo 1.5.1: Destek hücreleri ve embriyonik kök hücreleri için kullanılan kültür ortamının hazırlanması

(\*) Kök hücre kültür ortamında DMEM olarak Ko-DMEM, FBS kaynağı olarak kök hücrede test edilmiş FBS (Hyclone) kullanılmaktadır.

Stok olarak hazırlanan kültür ortamları, 50 ml'lik konik falkon tüplere eklenerek, +4°C'de saklanıp 2 hafta içinde tüketilmelidir. Hazırlanan kültür ortamlarını kullanıma hazırlamak üzere, günlük olarak 1/100 L-Glutamin (200 mM) eklenir, insülin-transferin-selenyum (ITS) ise günlük olarak sadece hES kültür ortamına eklenmektedir. Bununla birlikte kültür ortamı hazırlanmasında kullanılan  $\beta$ -ME solüsyonunun, çalışma solüsyonu olarak önceden hazırlanması gerekmektedir. Bu nedenle kültür ortamı hazırlamadan önce 70  $\mu$ l 14.3 M  $\beta$ -ME 10 ml PBS(Ca-mg free) ile seyreltilerek tüplere bölünür ve -20°C 'de saklanır.

Kök hücre kültür ortamı, fare embriyonik kök hücrelerinin izolasyonu ve kültürü için kullanılacaksa fareye özgü LIF içeren (1000 IU/ml) ESGRO ajanı eklenir. İnsan embriyonik kök hücreleri, destek hücresi üzerinde büyütülüyorsa, LIF maddesinin varlığına ihtiyaç duyulmaz ancak kültür ortamlarına rutin olarak ITS (1'e 100 oranında) ve bFGF (4 ng/ml) eklenir.

### 1.5.2. Kök Hücre kültürü sitotoksisite değerlendirilmesi

Sitotoksisite Yöntemleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Metabolik Aktivitenin Ölçmesine Dayalı Yöntemler
- Membran Geçirgenlik Testleri
  - ✓ Nötral Kırmızı Testi
  - ✓ Tripan mavisi Yöntemi
- Alamar Mavisi Yöntemi
- Sülforodamin B(SRB) Yöntemi
- Laktat Dehidrojenaz (LDH) Yöntemi
- Kristal Viyole Yöntemi

Metabolik Aktivitenin Ölçmesine Dayalı Sitotoksisite Yöntemlerinde Kök Hücrenin Yeri; Formazana dayalı testlerden biri olan MTT testi kullanılarak yapılan bir çalışmada, fare spermatogonial kök hücrelerinde grafen oksidin doza bağlı sitotoksisite ve genotoksisitesi ilk kez incelenmiştir.

MTT sonuçlarına göre, hücre sayısı, yüksek konsantrasyonda (100 ve 400 mg/ml) grafen oksit ile muamele edilmiş numunelerde, muamele edilmemiş hücrelere kıyasla azalmıştır. Çalışmanın sonucunda, yüksek konsantrasyon grafenin spermatogonial kök

hücrelere toksit olabileceği fakat bu toksisitenin grafen nanomalzemelerinin yüzey modifikasyonu ile azaltılabileceği kaydedilmiştir.

Mevcut çalışma, genetik materyali yavrulara aktaran germ hücreleri üretmeten sorumlu olan spermatogonial kök hücrelerin nanaparçacıklar gibi toksik maddelere karşı çok hassas olduğunu dile getirmektedir. Bununla birlikte, grafen nanomalzemelerin biyotıp ve endüstride giderek daha fazla kullanıldığı bilinmektedir (Hashemi, E., Akhavan O., ve ark., 2016).

Nötral kırmızısı testinde kök hücrenin yeri; İnsan adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerinde arsenik ve kurşunun sitotoksik ve genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, sitotosik etki nötral kırmızısı, genotoksik etki ise comet yöntemi ile değerlendirilmiştir, çalışmanın sonunda hücrelerin büyümesi, artan arsenik konsantrasyonu ve maruziyet süresi ile azalmıştır, mevcut çalışma hem arsenik hem de kurşunun bu küçük hücreler üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir, ancak arseniğin kurşun ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu bildirilmiştir (Ahmad, A., Shakoori, A.R., 2013).

Tripan mavisi yönteminde kök hücrenin yeri; Kuskov ve arkadaşları, non-steroidal, anti-inflamatuvar ilaçlar için taşıyıcı olarak amfifilik poliN-vinilpirolidon nanopartiküllerin in vitro sitotoksikite ve in vivo akut toksisitesini değerlendirmişlerdir.

Hücre canlılığı, sitotoksikite parametresi olarak seçilmiş ve bu çalışma tripan mavisi testinin yanı sıra MMT kullanılarak belirlenmiştir, embriyonik kök hücre kaynaklı fibroblast ve karaciğer kanseri hücrelerindeki (HepG2) sitotoksikite testleri sonucunda aynı konsantrasyonda bulunan serbest indometazine kıyasla indometazin yüklü polimerik anapartiküllerin daha hassas ve yüksek performanslı olduğunu bildirmişlerdir (Kuskov, A.N., Kulikov, P.P., ve ark., 2017).

Alamar mavisi yönteminde kök hücrenin yeri; Hücre canlılığına alamar mavisi testi ile bakılan bir çalışmada, antiseptiklerin adipoz kaynaklı kök hücrelere olan etkisi araştırılmıştır, adipoz kökenli kök hücre canlılığı, 5 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda antiseptik ile muamele edildikten sonra ölçülmüştür, ayrıca, bu hücrelerin çoğalması, adipojenik farklılaşma ve apoptoz ve nekroz üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Mafenid asetatin adipoz kaynaklı kök hücre toksisitesinin düşük olduğu bulunmuş ve yağ dokusu yaralarının tedavisinde uygulanabilir bir antiseptik olduğu bildirilmiştir (Kim, B.S., Ott, V., Boecker., ve ark., 2017).

Sülforodamin B yönteminde kök hücrenin yeri; Salinomisin ve salinomisin sodyumun insan meme kanseri kçk hücresi ile mem kanseri hücrelerindeki sitotoksik

etkisinin karşılaştırmalı değerlendirildiği bir çalışmada SRB yöntemi kullanılmıştır. Kanatlı hayvanlarda ve diğer hayvanlarda yaygın olarak antikoksidial bir ilaç olarak kullanılan salinomisin'in kanser kök hücrelerinin spesifik bir inhibitörü olarak hareket ettiği gösterilmiştir, serbest salinomisin ve sodyum formunun inhibitör etkisinin kanser kök hücrelerinde kanser hücrelerine göre daha kuvvetli olduğu bildirilmiştir. (Zhang, Y., Wang, X.Q., ve ark., 2011).

Laktat dehidrojenaz yönteminde kök hücrenin yeri; İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde Bisfenol A(BPA) toksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada hücre ölümü LDH ile ölçülmüş BPA'nın bu hücrelerde zamana ve doza bağlı lipid peroksidasyon nedeniyle sitotoksiste meydana getirdiği bildirilmiştir. BPA'ya maruz kalan mezenkimal kök hücrelerde, oksidatif stres göstergesi olan malondialdehit(MDA) seviyelerinin doza bağlı artışı gözlenmiştir. Araştırmacılar, insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde BPA toksisitesinin, süper oksit dismutaz mimetik ile ön tedaviye tabi tutulmasıyla belirgin şekilde azaldığını kaydetmişlerdir (Leem, Y., ve ark., 2016).

Kristal viyole yönteminde kök hücrenin yeri; Fernandes ve arkadaşları, düşük seviyeli lazer tedavisinin kendiliğinden düşmüş insan süt dişi kök hücrelerine olan etkilerini araştırmışlardır. Düşük seviyeli lazer tedavi, çeşitli tipte hücrelerin çoğalmasını uyarmaktadır; kendiliğinden düşmüş insan süt dişi kök hücrelerinin canlılığına ve proliferasyonuna lazer tedavisinin etkisi farklı yoğunluklarda uygulanarak değerlendirilmiştir (Fernandes, A.P., ve ark., 2016).

### **1.5.3. Üç boyutlu hücre kültürü ve güncel prelinik kanser tümör modelleri**

Günümüzde, in vitro anti - tümör ilaç testleri, esas olarak bir 2B tek tabakalı kültür tabağında tümör hücrelerinin reaksiyonunun tespit edilmesiyle gerçekleştirilmektedir, kanser biyologlarının % 80'inin, in vivo testlerden önce uygunluğundan dolayı sonuç elde etmek için 2D kültür tekniklerine dayandığı tahmin edilmektedir (Hutmacher DW., 2010), bununla birlikte, klinik çalışmalarda in vitro deneylerde etkili ilaçların, tümörleri olan gerçek hastalarda etkin olmadığı görülmüştür, Bu fenomen, kısmen, 2D kültüründe yetişen hücrelerin karmaşık 3D doku mimarisi, hücre-hücre veya vücutta bulunan hücre dışı matriks (ECM) etkileşimlerinden yoksun olduğu gerçeğine atfedilmiştir (Desrochers TM., ve ark., 2014).

Bu modeller, tümör hücrelerinin patofizyolojisini ve in vivo niş içindeki radyasyona veya ilaçlara karşı gerçek direnç seviyesini tam olarak yansıtmamaktadır (Chen L, ve ark. 2012; Cree IA., ve ark., 2010).

Üç boyutlu iskelelerdeki meme kanseri MCF-7 hücreleri, endokrin terapisinde tamoksifene karşı tek tabakalı kültürde olduğundan daha güçlü bir direnç göstermiştir (Dhiman HK. ve ark., 2005).

Herhangi bir yeni ilaç, insan klinik denemelerinden önce hayvan modellerinde prelinik testlere tabi tutulmalıdır. Bununla birlikte, bu modellerde daha yüksek maliyetler, tür farklılıkları, sınırlı bulunabilirlik ve fizibilite dahil olmak üzere birtakım sorunlar devam etmektedir, ayrıca, tümör araştırmalarında hayvanların kullanımıyla ilgili etik konular oldukça tartışmalıdır (Huh D., ve ark. 2010).

Hayvan modelinin ilk rehberi hayvanların mümkün olan her yerde başka yöntemlerle değiştirilmeleri gerektiğidir, bu nedenle, yeni in vitro hücre kültürü modelleri, tümör araştırmasında ve ilaç değerlendirmesinde kullanılan hayvan sayısını azaltmak için fon sağlayıcıların çoğunluğu tarafından teşvik edilmektedir. Bu sorunları çözmek için, kültür ortamının hücrenin uzaysal organizasyonunu ve ECM'sini dikkate aldığı 3D tümör hücresi kültürü yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin ortak amacı, geleneksel 2D in vitro ve hayvan test modelleri arasındaki boşluğu doldurabilecek bir biyomimetik 3D çok hücreli tümör modelini yeniden yapılandırmaktır (Russell WMS ve Burch RL. 1959; Breslin S ve O'Driscoll L. 2013).

3D modellerdeki tümör hücreleri, in vivo olanlara benzer fizyolojik özelliklere sahiptir, dolayısıyla, 3D kültür, tümör ve ilgili ilaç araştırmalarında güçlü bir araç olabilir. Şimdiye kadar 3B tümör modellerinin temel gelişiminde belirgin ilerlemeler sağlanmış ve son 5 yıl içinde tümör mikro ortamını simüle etmek veya ilaç dağıtımını değerlendirmek için 3B tümör hücre modellerini kullanan belirgin çalışmalar Tablo 1.5.3 'de özetlenmiştir (Chen L., ve ark., 2012; Fong EL., ve ark., 2013; Talukdar S ve Kundu SC., 2012; Munson JM, ve ark., 2013).

**Tablo 1.5.3.** Tümör mikro ortamını simüle etmek ve ilacı değerlendirmek için önceki 3 boyutlu hücre kültürü modelleri (Tümör tipine göre düzenlenmiştir).

| Yazar, YIL              | Model              | Hücreler                                                   | 3D Model                                    | Sonuçlar                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Kaynaklar               |
|-------------------------|--------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Ma ve ark. 2016         |                    | U251                                                       | Kaplı polistiren iskele lamininli           | Sonuçlar, integrin ifadesiyle ilgili 3D bağlamı, özellikle de laminin bağlanma integrin alfa 6 ve beta 4.                                                                                                                                                                                                                | Ma ve ark. 2016         |
| Pedron ve ark. 2013     |                    | U87                                                        | HA JEL                                      | Sadece HA jellerinde glioma hücrelerinin kümelenmesi gözlemlendi ve içerdiği HA içeriği ile iki fazlı olarak kötü huylu genlerin ekspresyonunun ortaya çıktığı ortaya çıktı.                                                                                                                                             | Pedron ve ark. 2013     |
| Munson ve ark. 2013     |                    | RT2,U87 ,C6,9L                                             | HA-Kalojen jel                              | Bu 3D modeldeki boşluklar arası akış, CXCR4'e bağlı bir mekanizma tarafından glioma istilasını artırır                                                                                                                                                                                                                   | Munson ve ark. 2013     |
| Fong ve ark. 2013       | Ewing sarkomu      | TC-71                                                      | electrospun poli (e kaprolakton ) iskeleler | 3D'de kültürlen Ewing sarkom hücreleri geleneksel sitotoksik ilaçlara karşı daha dirençli idi ve sergilendi rapamisin yolağının IGF 1R / memeli hedefinin ekspresyon modelinde dikkate değer farklılıklar.                                                                                                               | Fong ve ark. 2013       |
| Lee ve ark. 2013        | Yumurtalık kanseri | 1847,A2 780,CaO V3, COV644, EFO27,E S-2,FUOVI ,HEY,IG ROVI | çok hücreli tümör sferoidleri               | 3D hücre kültürü, tümörlerin histolojik, biyolojik ve moleküler özelliklerinin 2D'deki primer kültürlerle karşılaştırıldığında geliştirilmiş bir yansımasıdır. Kemosensitivite açısından, 11 hücre hattından 7'si 3B modellerde daha dirençliydi. 11 hücre hattından 7'si de paklitaksel karşı artan direnç göstermiştir | Lee ve ark. 2013        |
| Shin ve ark. 2013       |                    | HEY                                                        | çok hücreli tümör sferoidleri               | Taksol kaynaklı apoptoz, tek tabakalı koşullarda, ancak sferoid kültürlerinde tespit edilmedi.                                                                                                                                                                                                                           | Shin ve ark. 2013       |
| Loessener ve ark. 2013  |                    | OV-MZ-6                                                    | çok hücreli tümör sferoidleri               | Paklitaksel ve KLK / MAPK inhibisyonunun kombinatoryal yaklaşımları, tek başına kemoterapötiklerden daha etkili olabilir                                                                                                                                                                                                 | Loessener ve ark. 2013  |
| Yang ve Zhao 2011       |                    | A2780,A 2780/DD P, SK-OV-3                                 | Nanolif iskeleler                           | Yumurtalık kanseri hücreleri arasında gösterdi iki ve beş kat daha yüksek ilaç direnci                                                                                                                                                                                                                                   | Yang ve Zhao 2011       |
| Fitzgerald ve ark. 2015 | Prostat kanseri    | PC3, LNCaP                                                 | Kolajen bazlı İskele                        | 3D'deki iki hücre çizgisi, doketaksel karşı daha yüksek direnç göstermiştir. Viral olmayan dağıtım vektörleri, lipofektamin ve modifiye edilmiş bir siklodekstrin, bu 3D modelde aracı gen genişletir                                                                                                                    | Fitzgerald ve ark. 2015 |
| Xu ve ark., 2014        |                    | LNCaP                                                      | HA bazlı jeller                             | Hidrojel difüzyon bariyeri görevi görür nanopartiküller için. 3D kültürlen hücreler 2D'ye oranla daha fazla Dozetaksel tedavisi                                                                                                                                                                                          | Xu ve ark., 2014        |
| Lv ve ark. , 2016       | Gliom              | Birincil hücreler, U87                                     | Kollajen yapı iskeleleri                    | 3D kültürlenmiş hücreler ayrıca, çok daha yüksek oranda glioma kök hücreleri ve MGMT'nin regülasyonu ile kemoterapötik alkile edici maddelere karşı daha yüksek direnç göstermiştir.                                                                                                                                     | Lv ve ark. , 2016       |
| Talukdar ve Kundu, 2012 | Meme kanseri       | MDA-M B-231                                                | Dut dışı ipek fibroin proteini iskeleleri   | 3D kültürlerde hücre canlılığı ve istilacı potansiyelde 2B kültürlerle kıyasla karşılaştırılabilir bir azalma elde etmek için belirgin şekilde daha yüksek ilaç konsantrasyonları gerekir                                                                                                                                | Talukdar ve Kundu, 2012 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                 |                                          |                                    |                                                                                                                                                                                    |                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Chen ve ark, 2012                                                                                                                                                                                                                                                                             |                 | MCF-7                                    | Kollajen yapı iskeleleri           | CSCassociated'ın yüksek düzeyde ifadesi kültürlenmiş MCF 7 hücrelerinin özellikleri 3D onaylandı                                                                                   | Chen ve ark, 2012      |
| Dunne ve ark. 2014                                                                                                                                                                                                                                                                            |                 | MCF-7, BT474, SKBR3                      | Yapı iskeleleri                    | Göğüs kanseri hücrelerinin 3B'de büyümüş olması hücreleştirilmiş iskeleler, 2D hücre kültürüne göre doksorubisine karşı duyarlılığın azaldığını gösterdi.                          | Dunne ve ark. 2014     |
| Maguire ve ark., 2016                                                                                                                                                                                                                                                                         |                 | MCF-10                                   | Çok hücreli tümör küremsiler       | Genetik bağımlılıklar, in vivoya benzer şekilde 3B koşullarda büyütüldüğünde hücreler ortaya çıkarılabilir.                                                                        | Maguire ve ark., 2016  |
| Sha ve ark. 2015                                                                                                                                                                                                                                                                              | Mide kanseri    | BGC-823                                  | Çok hücreli tümör küremsiler       | Anti EGFR iRGD, doksorubisin, bevasizumab, nanoparçacık geçirgenliği ve tümör kitlesi boyunca etkinlik gibi antikanser ilaçları iyileştirebilir.                                   | Sha ve ark. 2015       |
| Kundu ve ark. , 2013                                                                                                                                                                                                                                                                          | Hepatokarsinom  | HepG2                                    | Tasarı ipek fibroini İskeleleri    | 3D çok hücreli model, hepatokarsinom progresyonu hakkında fikir verir ve transfeksiyon etkinliği, ilaç tedavisi ve terapötik müdahaleye hücresel yanıtın tahmin edilmesini sağlar. | Kundu ve ark. 2013     |
| Xu ve ark., 2013                                                                                                                                                                                                                                                                              | Akciğer kanseri | Primer akciğer kanseri hücreleri, SPCA 1 | Cihaz destekli kültürde sferoidler | İn vitro ilaç duyarlılıklarını değerlendirmek için yüksek verimli bir model geliştirildi. 2D'ye karşı 3D'ye karşı ilaç duyarlılığı seviyeleri arasında büyük bir fark vardı.       | Xu ve ark., 2013       |
| Simon ve ark., 2016                                                                                                                                                                                                                                                                           |                 | A549                                     | Hidrojel                           | 3D model, Tedaviden önce veya sonra yapılan bir dokudaki hücrelerin alt popülasyonlarına oksijene maruz kalmanın düzenlenmesine yardımcı olabilir                                  | Simon ve ark., 2016    |
| Stratmann ve ark. 2014                                                                                                                                                                                                                                                                        |                 | HCC827, A549                             | decellularized iskeleleri          | Karmaşık 3D tümör modelinde proliferasyon apoptoz ve istila için kantitatif okumalar belirlenmiştir.                                                                               | Stratmann ve ark. 2014 |
| 2D, iki boyutlu; 3D, üç boyutlu; CSC, kanser kök hücresi; KLK, kallikrein ile ilişkili peptidazlar; MAPK, mitojen aktifleştirilmiş protein kinazları; HA, hyaluronik asit; MGMT, O6 metil transferaz; CXCR4, CXC motif kemokin reseptörü 4; IGF 1R, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü. |                 |                                          |                                    |                                                                                                                                                                                    |                        |

#### 1.5.4. Üç boyutlu hücre kültürü yöntemleri

Çok hücreli tümör sferoidleri (MCTS), MCTS, süspansiyon içinde büyütülen veya 3D kültür yöntemleri kullanılarak jellere gömülen kanser hücrelerinin agregalarıdır. Bu model in vivo tümör mikro ortamlarını kısmen özetler, örneğin, daha büyük MCTS (kritik boyut, 400 µm), zayıf vaskularize tümörlerde bulunanlara benzer bir nekrotik çekirdek oluşumu ile sonuçlanan oksijen ve besin gradyanlarını sürdürür, her biri farklı avantaj ve dezavantajları olan MCTS modelleri oluşturmak için kullanılan birkaç farklı yöntem vardır (Friedrich J., ve ark., 2009).

Süspansiyon kültürü yöntemi, 1970'lerde sıçan striatal hücrelerinden sinir kök hücrelerini izole etmek ve kültürlemek için icat edildi, daha sonra yaygın olarak kullanılan bir 3D hücre kültürü yöntemi haline geldi (Reynolds BA ve Weiss S., 1992).

Cihaz destekli süspansiyon kültürü, manyetik kaldırma, döndürme veya döndürme biyoreaktörleri ve mikroakışkan cihazlar da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik cihazlara bağlı olarak statik süspansiyon kültürünün bir gelişimidir. Bu biyoreaktörlerin temel özelliği, tümör hücrelerinin yapışmasını önlemek veya hareketi askıya almaktır, böylece MCTS'ye dönüşebilirler. Ek olarak, mikro taşıyıcılar veya mikrokapsüller, genellikle hücre büyümesinin verimliliğini arttırmak ve hareketli hücrelerin korunmasını artırmak için kombinasyon halinde kullanılır (Zanetta M., ve ark., 2009).

Manyetik kaldırma yöntemi, n3D Bioscience'ın icat ettiği yeni bir süspansiyon kültürü teknolojisidir. Bu yöntemde, gece boyunca inkübasyon sırasında NanoShuttle - PL ile mıknatıslanır ve özel plakalarda manyetik nano partiküller üzerinde kültürlenir, burada plakanın üzerine yerleştirilen bir mıknatıs ile alttan çıkarılırlar, bu yöntem herhangi bir yapay substrat veya özel ortam veya ekipman gerektirmez, ek olarak, 3D kültür hücreleri MagPen de dahil olmak üzere manyetik araçlar kullanılarak toplanabilir ve aktarılabilir. Bu yaklaşımı kullanarak, Su ve arkadaşları, nişleri incelemiş ve miyelom kök hücrelerinin farmasötik bir sinerjizm analizini yapmıştır (Souza GR., ve ark., 2010; Su J., ve ark. 2014).

Spinner biyoreaktör kültür yöntemi, 1970'lerde Durand ve Sutherland tarafından radyoterapiye direnç açısından tümör hücrelerinin çalışmasından türetilmiştir. Bu sistem, hücre kültürünü tutmak için bir kap içerir ve hücrelerin askıda kalmasını ve orta karışmasını sağlamak için sürekli karıştırılan bir çark veya kürek içerir (Durand RE ve Sutherland RM., 1972).

Jel gömme kültürü, Süspansiyon kültüründeki MCTS, karmaşık ECM mikro ortamlarını kaybeder. İn vivo katı tümör hücreleri askıda sferoidler oluşturmamalıdır, diğer hücreler ve ECM ile birleşirler, ECM hücrel organizasyonu ve hücre fonksiyonunu etkilediğinden, ECM'yi içeren yeni 3D kültür metotları, hücre M ECM etkileşimlerine izin verdikleri için, in vivo durumlarda tartışmasız daha taklit olur. Jel, 3D hücre kültürü için bir substrat olarak kullanılır (Gill BJ ve West JL., 2014).

İskele kültürü, 3D iskele, doku mühendisliği gelişmelerinin bir ürünüdür, hücre büyümesi, yapışması ve çoğalması için fiziksel destek sağlayan ve hücrelerin uygun bir uzamsal dağılım ve hücre-hücre veya hücre-ECM etkileşimi oluşturmaya neden olan tümör dokusunun mevcut alanını temsil eden eksik ECM için bir taşıyıcı görevi görebilir. 2D ve 3D iskele kültürü arasında çok sayıda fark vardır, kayda değer bir karşılaştırma, 3D iskelelerde kültürlen tümör hücrelerinin, insan tümör dokularında kültürlen tümör hücrelerine morfolojik benzerlikler göstermesidir. Örneğin,

glioblastoma U87 hücreleri 2D kültüründe füziform, flört ve epitelioiddir, ancak küçük, yuvarlak veya oval hücreler halinde büyümüştür ve 3D iskele kültüründe yüzeylerinde kırpık veya mikrodamarlı kompleks yapılar oluşturmuştur (Lv D., ve ark., 2016).

Farklı yaklaşımlar, Tablo 1.5.4 'de özetlendiği gibi farklı avantajlar ve dezavantajlar sunmaktadır.

Karmaşıklık ve işlevsellikteki doğal farklılıklardan dolayı, model seçimi genellikle uygulamaya bağlıdır. Ek olarak, tümör hücresi biyolojisi, doku mühendisliği, biyomalzemeler, mikro-üretim ve mikro akışkanlıklardaki gelişmeler, 3D tümör hücresi kültürünün hızlı bir şekilde gelişmesini sağlamıştır. Gelecekteki beklentiler, kültür substratının temel özelliklerinin daha gelişmiş malzemeler ve işleme teknolojileri ile kontrol edilebilir ve ayarlanabilir olmasını sağlamaktır. Farklı tümör tiplerine ve araştırma amaçlarına bağlı olarak, farklı biyomalzemeler her spesifik çalışmada 3B kültür için farklı uygunluklara sahiptir. Örneğin, kemik erimesi metastazlarının araştırılması için düşük bozunma oranlarına sahip biyomedikal polimer iskeleleri üretilmelidir.

**Tablo 1.5.4.** 3B tümör hücre kültürünün çeşitli yöntemlerinin karşılaştırılması.

| Metot                                   | Avantajlar                                                                                                                                                           | Dezavantajlar                                                                                                                     |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Statik süspansiyon kültürü              | Nispeten basit, düşük maliyetli, sfero üretimi kolayca erişilebilir, tekrarlanabilir                                                                                 | Sürekli geçiş kültürü zor, nispeten emek yoğun, sadece otokrin ECM                                                                |
| Asılı damla                             | Sfero boyutunun kontrolü, standart 96 kuyucuklu plaka, homojen sfero, homojen sf + eroid, yüksek verim testi için uygun kullanılması durumunda düşük maliyetli       | Özel tabaklar kullanılıyorsa, pahalı, uzun vadeli kültür zor, küçük kültür hacmi, orta değişim zor                                |
| Manyetik kaldırma                       | Nispeten basit bir araç, verimli, herhangi bir özel ortam gerektirmez                                                                                                | 3D kültürünü kahverengi renklendirir ve bazı uygulamaları sınırlar, sayısız hücre de plakanın tabanına yapışır                    |
| Dönücü / dönme tabanlı yaklaşımlar      | Seri üretim, uzun süre kültür, nispeten basit                                                                                                                        | Yüksek kesme kuvvetine maruz kalan sferoidin (boyut, bileşim) homojenliğini kontrol etmek mümkün olmayan özel bir ekipman gerekli |
| Mikroakışkan cihaz                      | Sferoid (boyut, parametreler) kontrolü için uygun, daha hızlı sferoid oluşumu için sürekli perfüzyon                                                                 | Analiz için hücre toplama zorluğu, masraf ve karmaşık ekipman gerektirir                                                          |
| Jel gömme                               | İn vivo koşullara benzerlik, jel ECM sinyallerinin zengin bir ağını sağlar                                                                                           | Zayıf mekanik özellikler, doğal jelin bazı bileşenleri değişikendir ve tanımsızdır, vaskülatürü yoktur                            |
| Yapı iskeleleri                         | İn vivo koşullara azami benzerlik, kompozisyon ve ECM sunumunu hassas bir şekilde kontrol etmek mümkündür, tercih edilen büyüme faktörleriyle birleştirmek mümkündür | Büyük ölçekli üretim için pahalı, iskele ile hücrelerin ayrışması sorunu, karmaşık çalışma                                        |
| 3D, üç boyutlu; ECM, hücre dışı matris. |                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                   |

### 1.5.5. İlaç keşfinde 3B kök hücre kültürünün uygulamaları

3B hücre kültürü sistemlerinin, hücre farklılaşması, gen ve protein ekspresyon özelliklerinin anlaşılması, mikroçevre çalışmaları, biyosensör geliştirme, karmaşık hücresel/fizyolojik mekanizmaların daha iyi anlaşılması kök hücre çalışmaları, rejeneratif tıp, doku mühendisliği gibi farklı alanlarda kullanımı olmasına karşın, en yaygın kullanımı farmakolojik uygulamalar için ilaçların keşfi ve ilaç adaylarının toksik etkilerinin belirlenmesidir (Edmondson R., ve ark., 2014).

İlaç keşif çalışmaları önceleri hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Zamanla daha fazla ilaç adayının ortaya çıkması maddi ve zamansal kayıpları ve etik sorunları beraberinde getirmiştir, bu nedenle in vivo yanıtları in vitro ortamda test edebilecek 2B ve 3B hücre kültür yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Birçok ilaç, hücre yüzeyindeki spesifik alıcıları hedef alacak şekilde tasarlanmıştır. Reseptörlerin ekspresyon seviyesi ve bir ilacın reseptörlere bağlanma verimi, reseptörlerin hücre yüzeyleri üzerindeki yapısal düzenlenişinde 2B ve 3B kültürlerde farklılık gösterir. Ayrıca, 2B hücre kültürlerinde ifade edilen bazı genler ve proteinler 3B kültürlerde göre farklılık gösterir. Bir diğer konu ise, 2B ve 3B kültürlerindeki hücre döngü farklılıklarıdır (Luca AC., ve ark., 2013).

İlaçların etkinlik testlerinde 2B ve 3B kültürlerde farklılık göstermesi ve in vivo benzeri etkinliğin test edilmesi için 2B kültürlerine göre daha avantajlı bir model olması bakımından 3B hücre teknoloji, en yaygın ilaç toksisite ve etkinlik testlerinde tercih edilmektedir. Asetaminofen, amiodaron, diklofenak, metformin, fenformin ve valproik asit gibi ilaçların 3B sferoit kültürlerdeki değerlerinin in vivo çalışmalarla benzerlik göstermiş olması da bu durumu desteklemektedir (Fey SJ., ve ark., 2012).

3B teknolojileri ile yapılan ilaç araştırmalarıyla, birincil hasta kaynaklı hücrelerin moleküler profil verileri ile birleştirilmesi ve hastalığın moleküler tiplerini temsil eden hücrelerin 3B organoit bankalarının oluşturulması mümkün olabilecektir, böylece, kişiselleştirilmiş ilaç adaylarının klinik öncesi taramasını sağlanabilecektir (Langhans SA., ve ark., 2018).

Kişiselleştirilmiş ilaç yaklaşımları özellikle kanser tedavisinde öne çıkmaktadır, aynı tümör içinde hastalık ilerlemesine katkıda bulunan heterojen klonal varyantların birlikte var olduğu bilinmektedir.

Kişiselleştirilmiş ilaç keşiflerinde, bireysel hasta tümörlerinin fonksiyonel ilaç testi için genetik ve fenotipik heterojenliğini sağlayan 3B teknolojiler kullanılmaktadır,

bu teknoloji ile hasta tümör dokuları doğrudan in vitro olarak hasta kaynaklı organoitler olarak geliştirilebilir. Bu sayede kanser hastaları için kişiselleştirilmiş tıbbi tedavilerin geliştirilmesi hızlandırılabilir.

İlaç keşfini iyileştirmek için bir diğer potansiyel yöntem ise, pluripotent kök hücre türevli farklılaşmış hücrelerin 3B teknolojisi ile üretilmesidir. Bu hücreler, hastalık mekanizmalarını, ilaç taramasını ve toksisite testlerini değerlendirilmesinde önemli bir potansiyele sahiptir.

### **1.6. Nanolif Üç Boyutlu İskele Tasarımı ve Kök Hücreler**

İnsan embriyonik kök hücreleri (hESC'ler), pluripotent kök hücreleri (hPSC'ler), insan kaynaklı kültür kök hücreleri (hESC'ler), insan kök hücreleri (hSC'ler) ve mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) gibi yetişkin kök hücreler (J James A., ve ark., 1998; K. Takahashi., ve ark., 2007) ilaç keşfi, tedavi ve rejeneratif tıp için umut verici bir potansiyele sahiptir.

hSC kültürü için biyomalzemelerin geliştirilmesinin doku mühendisliğini ve hSC'lerin kullanımını önemli ölçüde etkilemesi beklenmektedir, hSC kültürü için kullanılan en yaygın yöntem Matrigel'dir (H.K. Kleinman ve G.R. Martin., 2005; Jin Zhou., ve ark., 2010).

Matrigel, “Sarcamos of Engelbreth-Holm-Swarm mice”dan izole edilmiş substratlardan müteşekkildir, bu substratlar arasında laminin, kolajen IV, heparan sülfat proteoglikanlar, enactin ve büyüme faktörleri bulunur, bununla birlikte, ksenojenik bileşenler, hSC'lerin klinik uygulamasını engeller (Jian Zhi Yang., ve ark., 2003).

hSC büyümesini etkileyen anahtar faktörler arasında büyüme ortamı ve çevresel faktörler bulunur, yüzey modifiye nanolifler, hSC'ler için uygun bir yaşam ortamı sağlayabilir, mikro- nano ölçekli nanolifler, hücre dışı matris (ECM) ile benzer bir lifli ortama sahiptir. Yüksek yüzey-hacim oranlarından dolayı hPSC'lerin uzun vadeli kültürünü desteklemek için sentetik veya doğal biyopolimer nano elyaflar uygulanmıştır. Bu nanoyapılar, doğal ECM'yi potansiyel ve doğru şekilde taklit edebilir ve kök hücre eklenmesi ve çoğaltılması için alt hücre ölçeğinde en uygun alanı sağlar (J James A., ve ark., 1998; M. Soleimani., ve ark., 2009; Y.R. Shih., ve ark., 2006).

### 1.6.1. Hsc kültürünü destekleyen nanolif polimerleri

Mükemmel biyouyumluluklara sahip çok çeşitli polimerler nanolifler olarak üretilir.

**Tablo 1.6.1.** Kök Hücreyi Desteklemesi İçin Nanolif olarak Kullanılan Polimerler.

| Polimer      | Hücre Kültürü Substratı | Kök Hücre | Referans(yıl)                           |
|--------------|-------------------------|-----------|-----------------------------------------|
| PEG-PCL      | O                       | PMSCs     | J. Xie., ve ark. (2013), (2012)         |
| PLGA         | PDGF-BB                 | ASCs      | A. Suzuki ve K. Aoki, (2008), (2013)    |
| Collagen     | O                       | NSCs      | F. Ajalloueian., ve ark. (2014), (2014) |
| PCL/chitosan | O                       | BCSC      | E. Seyedjafari., ve ark. (2011)(2014)   |
| PCL/gelatin  | O                       | MSCs      | D. Steffens., ve ark. (2013), (2014)    |
| PCL          | ECM proteins            | MSCs      | L.Y. Yap., ve ark. (2011), (2011)       |
| PLLA         | cRGD                    | NSCs      | B.J. Kang., ve ark. (2014), (2010)      |
|              | DGEA                    |           | S.M. Hashemi., ve ark. (2011), (2009)   |
|              |                         |           | Malcolm K., ve ark. (2010), (2014)      |

Nanolifleri oluşturmak için kullanılan polimerler genellikle sentetik ve doğal polimerler olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir (Tablo 1.6.1).

**Sentetik Polimerler:** Sentetik polimerler örneğin; Poli-L-laktik asit (PLLA) poli (laktik-co-glikolik asit) (PLGA), poli (kaprolakton) (PCL), ve polihidroksialkananoat (PHA) iyi mekanik kapasiteye, biyobozunurluğa ve stabiliteye sahiptirler. Bu yüzden işlenmesi ve değiştirilmesi kolaydır (M. Soleimani., ve ark., 2013).

**Doğal Polimerler:** Kollajen, jelatin ve kitosan gibi doğal polimerler, insan ve yosunların doğal ECM'sinin önemli bileşenleridir. Doğal polimerler, hücre yapışmasını teşvik eden peptid sekansları ile doğal biyoaktiviteye sahiptir (Y.R. Shih., ve ark., 2006; F. Ajalloueian., ve ark., 2014).

**Kompozit Polimerler:** Bununla birlikte, doğal polimerler zayıf mekanik özelliklere ve hızlı deformasyon hızı gibi dezavantajlara da sahiptir. Her iki polimer türünün harmanlanması, her ikisinin dezavantajlarını azaltmak için uygun bir yoldur (W. Li., ve ark., 2008; E. Seyedjafari., ve ark., 2011). Doğal polimerlerin biyoaktivitesinden ve sentetik polimerin fiziksel özelliklerinden faydalanan kompozit nanolifler üretilmektedir. Kitosan kompozit polimerleri (Chitosan composite polymers), Kollajen kompozit polimerleri (Collagen composite polymers) ve Jelatin kompozit polimerler (Gelatin composite polymers) kompozit polimerlere örneklerdir.

### 1.6.2. Üç boyutlu nanoliflerin yüzey modifikasyonu

Nanolifler doku rejenerasyonu için genellikle biyolojik olarak modifiye edilir. ECM proteini ve doğal ECM'den çıkarılan bazı biyomoleküller, fiziksel absorpsiyon veya kovalent yüzey bağlama teknikleri ile polimer nanoliflere dahil edilir. ECM molekülleri hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyebilir. Hücreler ve substrat nanolifleri arasındaki ECM etkileşimleri fonksiyonel ECM proteinleri tarafından yönlendirilebilir.

### 1.6.3. Kök hücre geleceğinde üç boyutlu nanoliflerin fiziksel ipuçları

ECM'ler gibi biyolojik ipuçları, kök hücrelerin farklılaşma yönünü yönlendirebilir. Son zamanlarda araştırmacılar, kök hücreleri etkileyen biyolojik materyallerin fiziksel ipuçlarının potansiyel önemini tanımlamak için önemli çabalar sarf ettiler.

İn vivo biyomekanik ortam, entegre ECM ağlarından oluşur; ECM ağları ve hücreleri, sinir, kas ve iskelet gibi birçok dokuda oldukça hizalı bir yönde bulunur ve bu nedenle, hücre kültürü için mekânsal olarak hizalı nanoliflerin üretilmesinde esastır.

Hüresel bileşenler fibroblast hücre tabakasından çıkarılarak tamamen doğal, homojen ve yüksek oranda hizalanmış nanolif bir ECM iskelesi oluşturulabilir. İskelenin elastik modülünün, elastin liflerinin korunması nedeniyle hücresizleştirme işleminden sonra iyi korunduğu yapılan çalışmalarla bulunmuştur. Yeniden istifleme hMSC'leri, iskelenin temel lifler boyunca hücre hizalamasını ve çoğalmasını yönlendirmede ve desteklemede mükemmel kapasiteyi göstermektedir (Qi Xing., ve ark., 2014).

Yüksek oranda organize edilmiş nanolif ECM'yi taklit etmek için, farklı elyaf düzenlemelerine sahip (tamamen dokunmamış ve kafes benzeri) iki çeşit elektrospun nanolif örgü imal edilmiş ve MSC'lerin in vitro kültürü için kullanılmıştır, sonuçlar osteopontin (OPN), osteokalsin (OCN) ve ALP'nin yanı sıra ilgili genlerin (Runx2 ve Colla genleri), kafes benzeri nanolifli ağlarda dokunmamış olanlara nazaran daha yüksek seviyelerde baskılandığını göstermiştir (J. Zhu., ve ark., 2013).

Shiva Irani ve arkadaşları bir çalışma ile Nanoyapılı rastgele ve hizalı PGLA lifli yapı iskeleleri hazırlanmış ve nanolif morfolojisinin pluripotent P19 embriyonik karsinomu üzerine etkisi retinoik asit indüksiyonuna cevap olarak hücre proliferasyonu

ve nöral farklılaşma incelenmiştir, sonuçlar, hizalanmış fibröz substratların doğal ECM ile benzerliklerinden dolayı hücre fonksiyonu ve hücre farklılaşmasının arttırılması için uygun bir yüzey sağladığını göstermiştir (Shiva Irani., ve ark., 2014).

### **1.7. Elektro-Döndürme ile Üretilen Nanolifler**

Elektro-döndürme (Elektro-spinning) işleminde, nanolifler çok yüksek yoğunluklu bir elektrostatik alanda (10-100 kV) polimerik solüsyonun yüzeyinden polimerik jetler olarak oluşturulur. Nanolifler ya bir kılcal borunun ucunda (iğne ya da kılcal döndürücüler) dönen elektrot üzerindeki sıvı yüzeylerden alarak (iğnesiz teknoloji) oluşturulabilir.

İğneli elektro-döndürme ile karşılaştırıldığında, iğnesiz teknoloji endüstriyel bir ölçekte nanolif üretimine olanak tanınır. Elde edilen sonuçlar iğnesiz Nanospider teknolojisi tarafından üretilen nanoliflerin kök hücre büyümesini ve çoğalmasını desteklediğini doğrulamaktadır.

Sinir dokusu mühendisliği için potansiyel iskele olarak, çeşitli elektrodöndürme ile sentezlenen nanolifleri, nöronal hücre yetiştiriciliği için substratlar olarak incelenmiştir. Elektrodöndürme tekniğinin modifikasyonu, paralel hizalı liflerle nanolif substratların üretimini mümkün kılar.

#### **1.7.1. Elektro döndürme malzemelerinin özellikleri**

Elektrodöndürme tekniğinde, lif çapları ve damlacık oluşumu tekrarlanabilir bir şekilde kontrol edilmesi gereken özelliklerdir. Bu nedenle çözelti ve proses değişkenleri lif morfolojisi üzerinde etkiye sahiptir (Dersch ve ark., 2004).

Viskozite, çözelti konsantrasyonu, elektriksel iletkenlik ve yüzey gerilimi elektro üretim prosesinin çözelti ile ilgili değişkenleridir. Viskozite, polimer konsantrasyonu ve çözücü tipine bağlı olup her iki özellik de lif morfolojisi üzerinde temel etkiye sahiptir, düşük viskozitede, düşük viskoelastik kuvvetlerden dolayı polimer jet kırılması ve dolayısıyla damlacık oluşumu gözlenir.

Genellikle konsantrasyonu düşürmekle daha iyi lif yapısı elde etmek mümkündür ancak düşük konsantrasyon, kütle-yüzey oranının azalması ile sonuçlanacağından istenmeyen damlacıklı lif yapısının oluşma riskini arttıracaktır, bu risk, elektriksel iletkenliği arttırarak ya da yüzey gerilimini azaltarak engellenebilir, genellikle, polimer

çözeltisinin yüzey gerilimi elektriksel alan tarafından aşılabilecek kadar düşük, yük yoğunluğu yüzey gerilimi tarafından aşılabilecek kadar yüksek ve viskozite damlacıklar oluşturmamak kadar yüksek olmalıdır (Kriegel ve ark., 2008).

Diğer bir parametre de polimer çözeltisinin elektriksel iletkenliğidir. İletkenliğin artışı ile yüzey yük yoğunluğunun artması beklenmekte ve böylece lif uzaması sağlanmaktadır, çok yüksek elektriksel iletkenlik damlacık oluşumuna sebep olurken çok düşük iletkenlik de sürekli lif oluşumuna engel olmaktadır (Dersch ve ark., 2004).

### 1.7.3. Meme kök hücreler ve electrospun nanolifler uygulamaları

Kişiye özgü kanser tedavisi etkili bir yöntem olacağı ve başka çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

Elektrodöndürme yöntemi mükemmel bir alternatif yöntem olup çok farklı uzunluk/çap oranlarında sürekli fiber üretimini mümkün kılan tek yöntemdir.

Elektrodöndürme yöntemi ile nanolif üretimi dünya literatüründe yaygın olarak kullanılmakta olup, genellikle büyük molekül ağırlıklı polimerler (PA, PVP, PAN, PE v.b.) kullanılmıştır. Kişiye özgü kanser tedavisi etkili bir yöntem olacağı ve başka çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

Kanser dünya çapında en çok ölüm oranına sahip hastalıklarından biridir. Mevcut teknolojilerin daha ileri düzeyde duyarlılık ve küçültülmesine dayalı olarak 1974 beri hayatımızın birçok alanına giriş yapmış bir teknolojidir.

### 1.8. Kalikserenler Ve Oluşumunu Etkileyen Faktörler

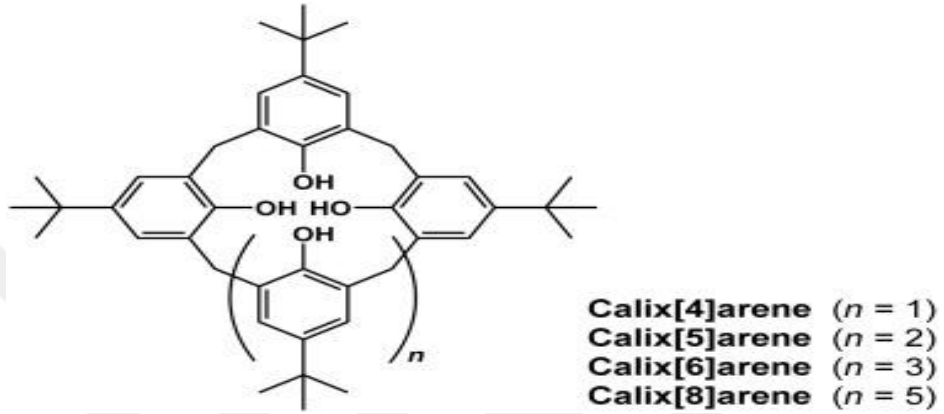
Calix [n] aren, p-ikame edilmiş fenollerin ve formaldehitin yoğunlaşması ile elde edilen sentetik olarak temin edilebilir makrosiklik bileşiklerdir (Gutsche, 1998).

Calix [n] arene familyası, makrosikldeki fenolik ünite sayısında farklılık gösteren çeşitli oligomerler sunar, Parantez içinde rapor edilen bu sayı, 4 ile 20 arasında değişmektedir, en çok çalışılan oligomerler, fenol OH gruplarına orto pozisyonunda metilen köprüleri ile bağlanmış 4, 5, 6 veya 8 fenolik birim tarafından oluşturulan kaliks [4,5,6,8] arenlerdir

Kaliks[n]aren adı; Yunanca “Chalice” (taç) ve uzvi kimyadaki “aren” (aromatik halka söylemi) sözcüklerinin bir araya gelmesiyle meydana gelmiştir. Kaliks[n]aren

sözcüğündeki “n” harfiyse fenolik ünitelerin ölçüsünü yani makrosikliğin büyüklüğünü gözler önüne sermektedir.

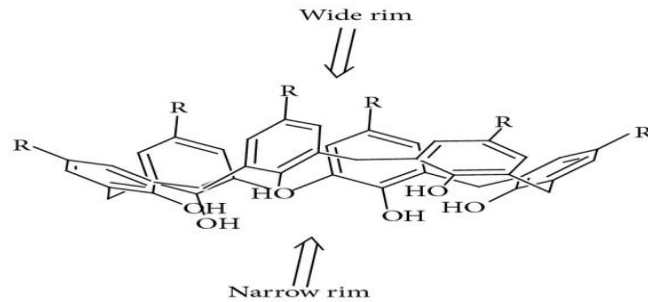
Kaliks[n]arenler 4,5,6,7,8,... gibi değişik sayıda fenolik ünitelerden ve substitue kümelerden oluşabilirler . Değişik substitue fenoller için kaliksarenler adlandırılırken fenolün substitue bölümü kaliksarenlerin önüne yazılır. Bununla alakalı, kaynaklarda p-alkil fenolden meydana gelen dört üyeli siklik tetramer yapıdaki kaliksaren, daha düzenli olarak 5,11,17,23-tetra- 31 alkil-25,26,27,28-tetra-hidroksi kaliks[4]aren biçiminde, daha kısaysa palkikaliks[n]arenler biçiminde adlandırılmıştır (Şekil 1.8.1).



Şekil 1.8.1. Kaliks[n]arenler 4,5,6,7,8 fenolik ünitelerde oluşumu.

Kaliksaren omurgası, "alt veya dar ağız", "üst veya geniş ağız" ve bir merkezi halka ile karakterize edilir. Her iki jant, gelişmiş fonksiyonel moleküller tasarlamak için kolayca işlevselleştirilebilir (Neri ve diğerleri, 2016).

Fenolik halkanın "halka boyunca" dönmesi, çözelti içerisinde farklı şekillendiriciler oluşturur (Şekil 1.8.2).



Şekil 1.8.2. Kaliksaren nin Kaliksaren omurgası

Bu metasiklofanların çalışmalarında, moleküllerin p-tert-butilfenol ve formaldehitten bir baz varlığında sentezlenmesinin, saf üründe yüksek verim sağladığı

görülmüştür. Ürün reaksiyon koşullarına bağlıdır, İnce farklı koşullar, makro döngü içinde mevcut olan farklı sayıda halka ile kaliksarenlerin oluşumuna izin verir.

kalixarenes oluşumunu etkileyen birkaç faktör vardır. İlk olarak, reaktan etkisinin oranı var. Bazın fenol ve formaldehit oranı arttıkça, karışımdaki ana ürün siklik oktamlerden siklik heksamere kadar gider.

Sıcaklık ayrıca bu bileşiklerin oluşumunda rol oynar, kullanılan çözücü tarafından kontrol edilen geri akış için gereken sıcaklık arttıkça, makrosikl içinde yoğunlaşmış halkaların sayısı azalır. Örneğin, kaynama noktası 258 ° C olan difenil eter, ağırlıklı olarak tetramer üretmek için kullanılırken, kaynama noktası yaklaşık 140 ° C olan ksilen, siklik heksamerin oluşumunda kullanılan çözücüdür.

Sulu bazdan gelen katyon ayrıca makrosikl içinde mevcut halkaların sayısı üzerinde bir etkiye sahiptir. Potasyum tetramer oluşumunda en etkilidir ve heksamer, en çok tercih edilen şekilde sezyum kullanıldığında oluşturulurken, sodyum siklik heksamerin oktamer oluşumunu oluşturmak için reaksiyonda tercih edilen katyondur.

kalix (8) areninin kinetik kontrol ürünü olduğu düşünülürken, Dikkat çeken bir diğer etki, çeşitli boyutlardaki kaliksarenlerin farklı kontrol türlerinin ürünleri olmasıdır. kalix (4) aren termodinamik tarafından kontrol edilir. kalix (6 | aren oluşumu şablon etkisi ile kontrol edilir. kalixarenlerin hepsi, boyutuna bakılmaksızın tüm konformasyonel olarak mobildir. koni, kısmi koni, 1,2-altemat ve 1,3-altemat olarak bilinir.

uygun kaliksarenleri oluşturmak için, (fenolik OH )/lower rim veya (fenil halkasının para konumundan) upper rim üzerinden oynarak fonksiyonel gruplarla türevlendirilmesi gerekmektedir (Özkan, 2011).

### 1.8.1. Kaliksarenlerin kimi hususları

Kaliksarenlerin füzyon noktaları moleküler boyutlarıyla orantılı olarak artar. P-tert-butilkaliks füzyon noktaları [4] aren 342-344 0C, p-tert-bütikaliks [6] aren 380-381 0C, p-tert-butilkaliks [8] aren 411-412 0C d. Bazı kalikarinin piridin benzeri çözücüler içinde çözülebilmesine rağmen, Kaliksarenlerin organik çözücüler içindeki çözünürlüğü yeterli değildir. Ester, sülfonat gibi suda çözünür fonksiyonel konsantrasyonların artması, kalkarin yapısına birleştirilerek suda arttırılabilir.

Kaliksarenlerin spektral yönleri analiz edildiğinde, yaklaşık 280 nm emilir. Kızılötesi tayf, parmak izi konumundaki tepe noktasına benzer. Bununla birlikte, fenol

grupları içeren zirveler - 3150-3300 cm<sup>-1</sup>'de işaretlenmiştir, ancak zirveler, molekül içinde oluşturulan moleküller içindeki hidrojen bağları nedeniyle düşüktür. Sikloal formaldehit fenolik olegomerleri, Kaliksarenlerin içindeki parça sayısından farklı bir absorpsiyon oranı ile karakterize edilir, ancak 280-288 nm'de maksimum absorpsiyon sağlar. Tert-butil setleri gömlekleri yüksek sıcaklıklarda, 2 adet dublet düşük sıcaklıkta verir. Bu kalixarin durumu Morfolojinin sıcaklık değişimleri ile değiştiğini gösterir (Gutsche, 1989).

### 1.8.2. Kaliksarenlerin biyolojik yürütüm bölgeleri

Tek 3 boyutlu yüzeyleriyle kaliksarenler, siklodekstrinler, kabakgiller, kriptanlar ile taç eterleriyle beraber aşık en iyi konakçı moleküllerdendir. Gizil yapı blokları içinde moleküler iskeletin üst yada alt kenarı boyunca işlevselliği ile kullanılabilirliği, analiz ve moleküler algılama, tanıma, kataliz ile ilaç icat misali nanoteknoloji için gerekli supramoleküler platformlar olarak uygulamalarda ehemmiyetli reseptörler durumuna almıştır. Biyolojik bileşiklerle seçici komplekslerin bilinmesi ve meydana gelmesi, fonksiyonelleştirilmiş kaliksarenlerin bizzat dikkat çekici uygulamalarıdır. Aynı biçimde protein yüzeyi tanıma, bir kaliksaren çekirdeğiyle türlü sıklık peptidler ile protein grubu yüzeylerinde işlevsel kümenin ve tamamlayıcı geometrinin ehemmiyetinin kavranması üzerine çaba sarf edilmiştir (Nimse ve Kim, 2013).

Biyolojik moleküllerin sentetik bileşiklerle ziyadesiyle özellikli olarak tanınması, hem uygulamalı hem de akademik araştırmalarda süratli büyüyen ve meşaketsiz bir bölümdür. Kaliksarenlerin kullanımı, son 20 senede, biyokimyasal tanıma ve aminoasit, peptid, protein, lektin, nükleotid, nükleosit, sakkarit ile steroid benzeri biyoaktif moleküllerin ayrışın diye kuvvetli bir araç olarak fazlalaşan bir dikkat çekmiştir. 2005 yılında Oshima ve ark. bir kaliks [6] aren karboksilik asit türevinin organik alanda ekstraksiyonunu davet ederek sitokrom c (Cyt c) benzeri katyonik proteinler için yüksek bir afinite sergilediğini haber etmiştir. Benzer küme, bununla beraber, p-tert-oktilkaliks [6] aren ve p-tert-oktilkaliks [8] karboksilik asit türevlerinin büyük boşluklarının meydana çıktığını keşfeden birkaç kaliks [4,6,8] arenini protein ekstraksiyon ajanları olarak da analiz etmiştir (Nimse ve Kim, 2013).

Toksisite, kuvvetli ilaç moleküllerinin bulunmasında ve ilerletilmesinde büyük bir engel teşkil eder. Engellere karşın, çoğu kaliksaren türevleri, hayvan modellerinde düşük toksisite göstermemiştir hata hiç. Kaliksarenler çeşitli antiviral, antibakteriyel,

antifungal, antitüberküler ve antikanser faaliyetler sunmuştur. Perret ve ark. kimi kaliks [4] aren fosfonat türevlerinin insan fibroblastlarının hücre büyümesi konusunda etkisi olmadığını söylemiştir. benzeri özette araştırmacılar, amfifilik fosfonato-kaliks [4] aren türevlerine dayanan dev vesiküllerin, hücre ölümüne sebep olmadan insan fibroblastlarının hücre zarlarıyla birleşebildiğini beyan etmişlerdir (Da Silva ve ark., 2004).

Kaliksarenler DNA üzerindeki tesirlerin araştırmasında ehemmiyeti artan kanser tedavilerinde, başarılı bir ilaç olarak sahne alabilir. Böylelikle tümörlü hücrelere tesirinin varlığı gözler önüne serilmektedir. Literatürde;

Baggetto ve ark.(2010), türlü tümör hücreleri (MU2, MU2F, HT1080, SP6.5, 1PC227, Jurkat, MEWO, H1-60, Huh7, Hep-G2, MEWO, DLM) üzerinde calix [4] aren türevlerinin tesirini sentezleyerek incelemişler ve bu bileşiklerin aktivitesini standart anti-kanser ilaçlarıyla yan yana koymuşlar. Bu işlevsel hale gelen kalix [4] aren türevlerinin, özellikle lenfoblastik lösemi ve melanoma hücre çizgilerinde kuvvetli anti kanser ajanları olduğunu bulmuşlardır.

Santos ile ark.(2015) alt kenarda amid makrosiklik ve asiklik türevleri barındıran bir dizi para-tert-butilkalks [4] aren sentezlemişlerdir ve hücresel tesirleri analiz edilmiştir. G-quadruplex etkileşimi ve stabilizasyonu, kanser hücre hudutları üzerindeki kuvvetli antiproliferatif tesiri G-quadruplex tanınmasıyla ilişkilendirmek için bileşik calix-NH<sub>2</sub> ile değerlendirilmiştir. Kalix-NH<sub>2</sub>, G-quadruplex MYC22 ve h22L'yi etkileşir ve dengede tutar ve MCF-7, LNCaP, U87 kanser hücre dizilerinde düşük mikromolar konsantrasyonda aktiviteyi gözler önüne sermiştir.

Magoulas ve ark.(2017) incelemesinde, artemisinin yapısalca modifiye edildiği ve potansiyel anti-kanser aktivitesi değerlendirilen yeni artemisinin dimerik konjugatları kazanımı için doğal olarak meydana gelen poliaminlere demirlendiği dile getirilmiştir. Test olan bütün artemisinin konjugatları, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin sayısını eksiltmesinde artemisinin kendisinden daha fazla tesir etmiştir. Potansiyel etki mekanizmasını gözler önüne sermek için en aktif 6, 7, 9 ve 12 konjugatlarını ele almışlardır ve kanser hücrelerinin kendilerince anjiyojenik büyüme faktörü pliotrofinin ekspresyonunu ve salınımını eksilttiğini ve in vitro olarak angiogenesis in vivo ve endotel hücre büyümesini inhibe ettiğini keşfetmişlerdir . Bu donelerin, yeni artemisinin dimerlerinin aktif antikanser ilaçlarının geliştirilmesi için iyi bir aday olduğunu göstermektedir.

Duarte ve ark.(2017) hormonal bağımlı ve hormonal bağımsız meme kanseri hücrelerinde 7-klorokinolin-1,2,3-triazoil karboksamit türevleriyle indüklenen seçicilik profili, apoptotik hücre ölümü ve hücre döngüsü arrestini gözler önüne sermişlerdir. Sonuçlar, 7-klorokinolin türevleri QTCA-1, QTCA-2 ve QTCA-3 ile muamele edilince akabinde doz bağımlı biçimde in vitro MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığını mühim miktarda eksilttiğini göz önüne sermiştir. Apoptoz indüksiyonu, hormonal bağımsız meme kanseri hücrelerinde % 16.8'lik bir fazlalık ile aşıkarak yüksekti. nitekim, MCF-7 hücrelerinde G0 / G1 döngüsü tutuklaması görülmüştür.

### **1.9. İnsan Adenocarcinoma Meme Kanseri (MCF-7 Hücre) Hattı Kökeni Ve Genel Özellikleri**

MCF-7, ilk olarak 1970 yılında 69 yaşındaki Kafkas bir kadının meme dokusundan izole edilen bir hücre çizgisidir, aldığı iki mastektomiden ilki, çıkarılan dokunun iyi huylu olduğunu gösterdi, beş yıl sonra, ikinci bir operasyon, sonunda MCF-7 hücre hattına yol açacak bir doku alındığı plevral efüzyonda malign bir adenokarsinom ortaya çıkardı, donör meme kanseri için radyoterapi ve hormonoterapi ile tedavi edildi.

Yaygın olarak incelenen, meme adenokarsinomundan türetilmiş bir epitel kanser hücre dizisi olan MCF-7, farklılaşmış meme epitelinin özelliklerine sahiptir. MCF7 hücreleri, PI3K ve MAPK tutulumunu tespit etmek için ve ERK ve Akt fosforilasyonunun kolay tespiti için kullanılabilir. Ayrıca, sitoplazmik östrojen reseptörleri aracılığıyla bu hücreler östradiolü işleme yeteneğine sahiptir (Fagan DH., ve ark., 2017).

MCF-7 hücreleri, meme epiteline özgü çeşitli ideal özellikleri koruyan hücre çizgisinin bir sonucu olarak in vitro meme kanseri çalışmaları için faydalıdır. Bunlar, MCF-7 hücrelerinin, hücre sitoplazmasındaki östrojen reseptörleri vasıtasıyla östradiol formundaki östrojeni işleme " yeteneğini içerir, bu, MCF-7 hücre çizgisinin bir östrojen reseptörü (ER) pozitif hücre çizgisi olmasına yol açar. MCF-7 ayrıca progesteron reseptörü pozitif ve HER2 negatiftir, Östrojen duyarlılığının korunmasına ek olarak, MCF-7 hücreleri de sitokeratin'e duyarlıdır. Desmin, endotelin, GAP ve vimentin'e karşı duyarlı değildirler (Venugopal K., ve ark., 2017)..

İn vitro büyüdüğünde, hücre çizgisi kubbe oluşturabilir ve epitelyal hücreler tek tabakalarda büyür, büyüme, tümör nekroz faktörü alfa (TNF alfa) kullanılarak inhibe

edilebilir ve MCF-7 kanser hücrelerinin anti-östrojenlerle tedavisi, sonuçta hücre büyümesinde bir düşüşün etkisine sahip olan insülin benzeri büyüme faktörü proteinlerini modüle edebilir.

Bilim adamları, MCF-7 hücrelerinin çoğaltılmasının kolay olmasına rağmen, genellikle yavaş büyüyen bir popülasyon olduğunu keşfettiler. MCF-7 iki katına çıkma süresi tipik olarak 30-40 saattir.

MCF-7 hücreleri, tipik hücre büyüklüğü 20-25 mikron olan oldukça büyük yapışık hücrelerdir. Önerilen ortam, 2 mM L-glutamin, 0.01 mg / mL sığır insülini (% 90), fetal sığır serumu (% 10) içeren (Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM) ve 1.5 g / L sodyum bikarbonat, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asitler ve 1 mM sodyum piruvat içeren(Eagle with Earle's BSS, EarleS BSS) 'dır.

Genetik olarak, MCF-7 çizgisi intial izole klonu ile tam olarak aynı değildir. Başlangıçta, 16 kromozomla indirgenmiş 85 kromozom içeren bir karyotip olduğu tarif edilmiştir.

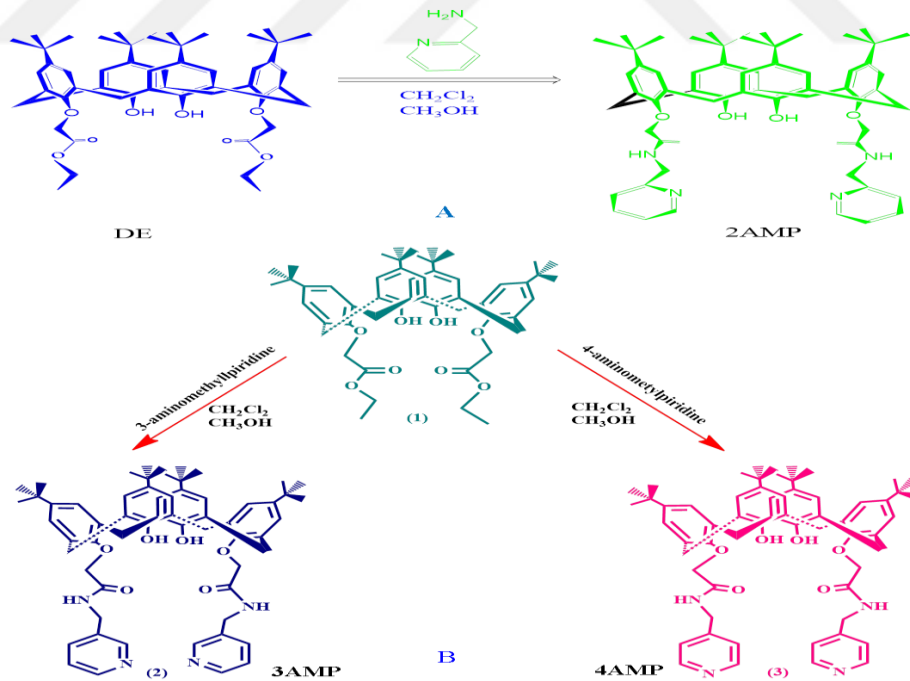
Günümüzün MCF-7 hücre hattında 69 kromozom içeren bir karyotip bulunmaktadır. Ayrıca, Michigan Kanseri Vakfı'ndan MCF-7 hücre çizgisi ve ATCC hücre çizgisi arasında genetik farklılıklar vardır. Bu, ATCC hücre çizgisinin, diğer MCF-7 hücre çizgilerinden farklı bir kaynak olduğunu gösterir (Venugopal K., ve ark., 2017).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Kimyasal Örnek Analizleri

#### 2.1.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]arenin diamiit türevleri sentezi

2.13 g (2.5 mmol) ilk reaksiyonda oluşan diester bileşiği  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (45 ml/45 ml) içerisinde çözülmesi sonrasında 15 mmol (1.62 g) eklenir. Reaksiyon 72 saat manyetik karıştırıcıda, oda ısısında karıştırılır. Reaksiyonu İTK ile bakılarak başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü gözlenir (1:1, Etilasetat : n-Hekzan) (Şekil 2.1), Üstelik reaksiyon FT-IR spektroskopisinde  $1751\text{ cm}^{-1}$ 'deki ester karbonil bandının 2-AMP  $1676\text{ cm}^{-1}$ , 3-AMP  $1681\text{ cm}^{-1}$  ve 4-AMP için  $1638\text{ cm}^{-1}$  amid karbonil bandına dönüşümü tespit edildi. Çözücü buharlaştırılıp, reaksiyondan uzaklaştırdıktan sonra kalan katı partikül 250 ml  $\text{CHCl}_3$  ile çözülür ve ayırma hunisinde saf  $\text{H}_2\text{O}$  ile yıkanarak organik faz kuru  $\text{MgSO}_4$  ile kurutulması sonucunda damıtılır. Süzüntü buharlaşma ile yoğunlaştırılır ve  $\text{CH}_3\text{OH}$  damlatılması ile yerini kristallenmeye bırakır ve kristaller damıtılarak alındı.



**Şekil 2.1** A) 2-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]arenin diamiit türevleri sentezi, B) 3 ve 4-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]arenin diamiit türevleri sentezi.

2-AMP (2-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]aren); (MA: 944.56 g/mol).

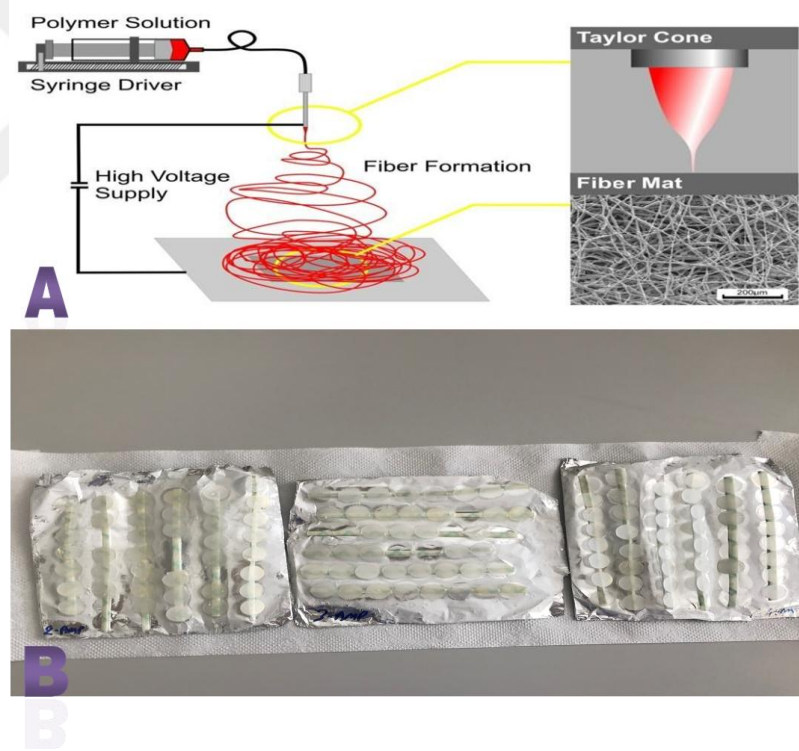
3-AMP (3-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]aren); (MA: 944.56 g/mol).

4-AMP (4-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]aren); (MA: 944.56 g/mol).

### 2.1.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP nanolif yüzeylerin üretimi ve analizleri

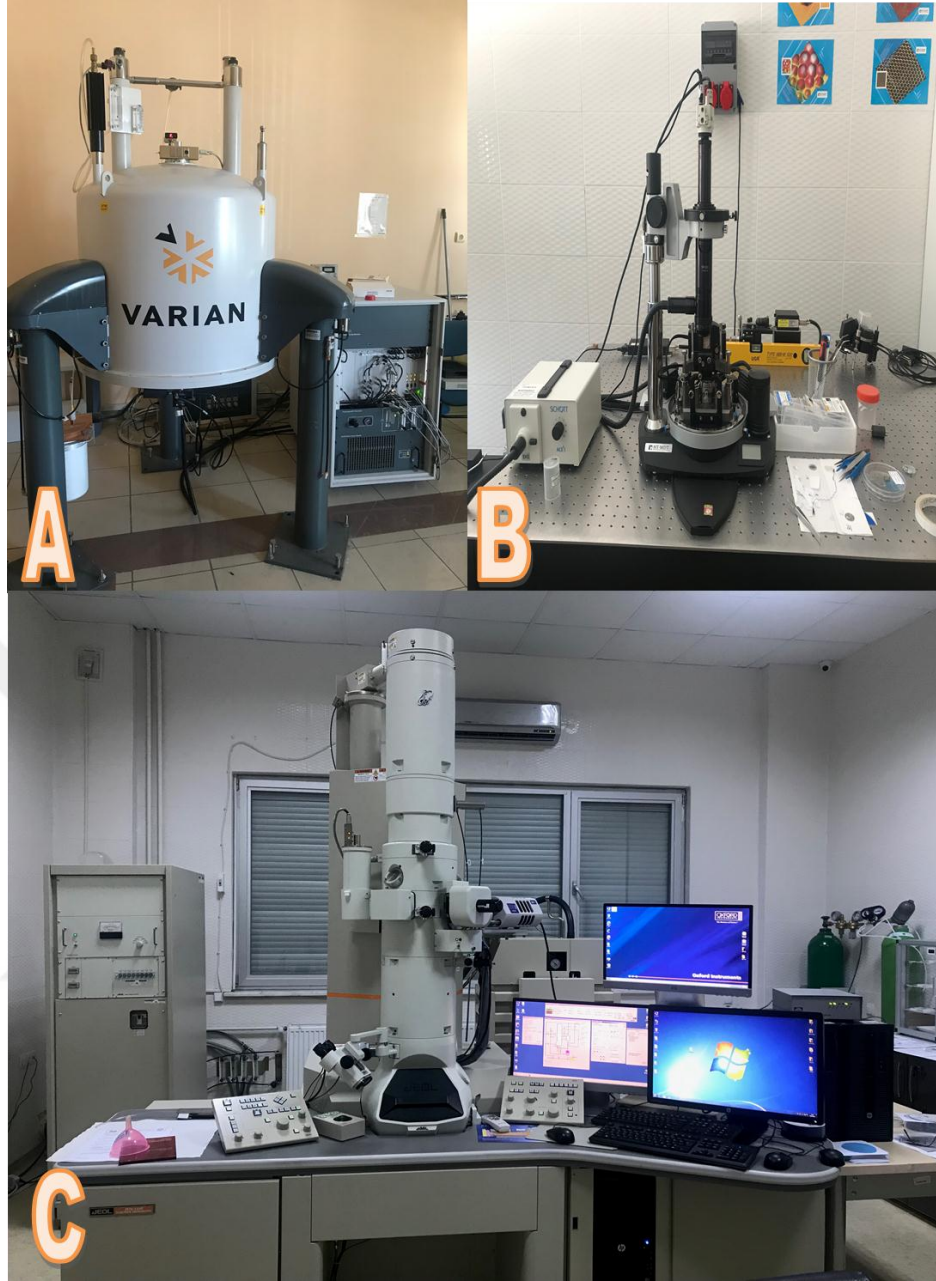
Nanolifler Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Prof.Dr. Şeref Ertul'un laboratuvarında Dr. Fatih Özcan kontrolünde sentezlendi.

Elektrodöndürme sistemi Şekil.2.2'de gözlenir. Bu sistemin esasta üç bileşeni mevcuttur: yüksek voltaj güç kaynağı, kapiler tüp ve metal malzemeden meydana gelmiş bir toplaktır. Kapiler tüp içinde döndürülecek çözelti mevcuttur ki güç kaynağından gelen bu çözelti metal elektrotla temas halindedir. Metal topaç ile kılcal boru arasına uygulanan yüksek voltaj kritik değere ulaştığında, çözelti tüpün ucunda bir damla olarak askıya alınır, rulo ile jet ile hareket etmeye başlar ve elektriksel olarak yüklenir. Tüp ucundan çıkan jette elektrostatik itme güçlerinden ötürü kıvrılma hareketi görülür. Bu jet, kıvrılma hareketinin ve jetteki çözücünün buharlaşması ile incelik ve ruloda nano ebatta gelişigüzel olarak lifler halinde çoğalır. Bu lifler indiyum kalay oksit (ITO) üzerine kaplanarak 3B için nanolif yüzeyler elverişli hale gelmiştir.



Şekil 2.2. A) Nanolif Elektrodöndürme düzeneği B) Üretilen 2,3 ve 4-Aninometilpridin nanolifler

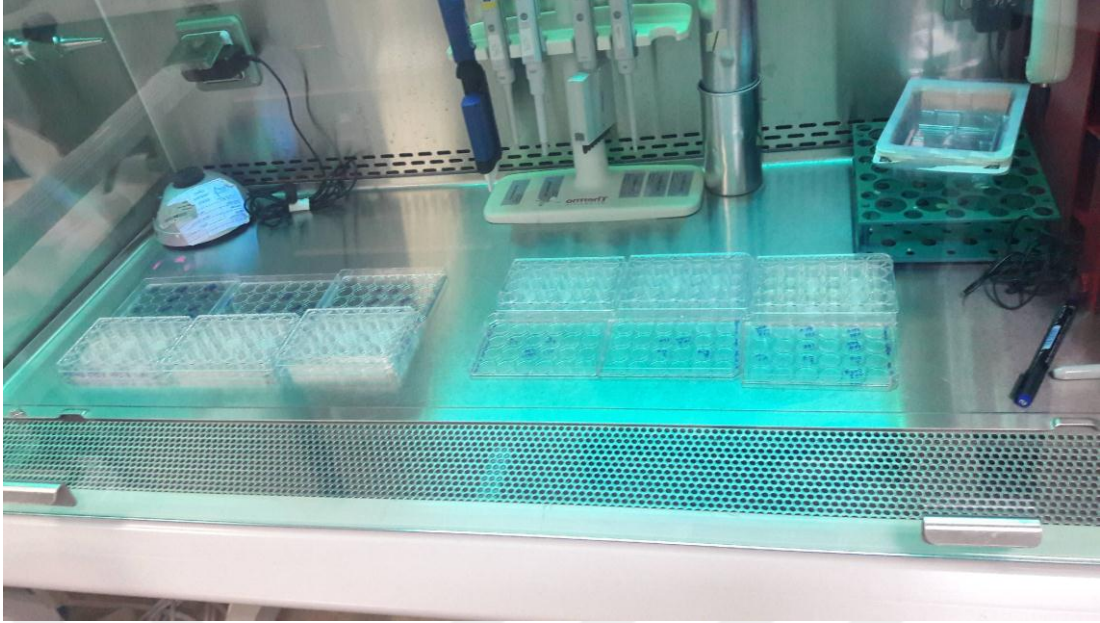
Sentezlenen 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP bileşiklerinin yapıları spektroskopik tekniklerle (FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR), nanolif yüzeyleri SEM, AFM ile TEM türevi teknikler ile karakterize edilmiştir. (şekil 2.3)



**Şekil 2.3.** A) Nükleer manyetik rezonans (NMR). B) Atomik kuvet mikroskobu (AFM). C) Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

## 2.2. Nanolif Yüzey Sterilizasyonu

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP nanolif yüzeylerine hücre ekiminden önce, on iki kuyucuklu plakadaki kuyucuklara *p-ter- bütikaliks*[4]aren nanolifler konularak iki saat boyunca UV’de bekletilir ve sonrasında iki defa 250  $\mu$ l kuyucuk başı Hanks Sln eklenmek suretiyle yıkanır.



**Şekil 2.4.** UV ile yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen nanolifler

### 2.3. Biyolojik Numune Analizleri

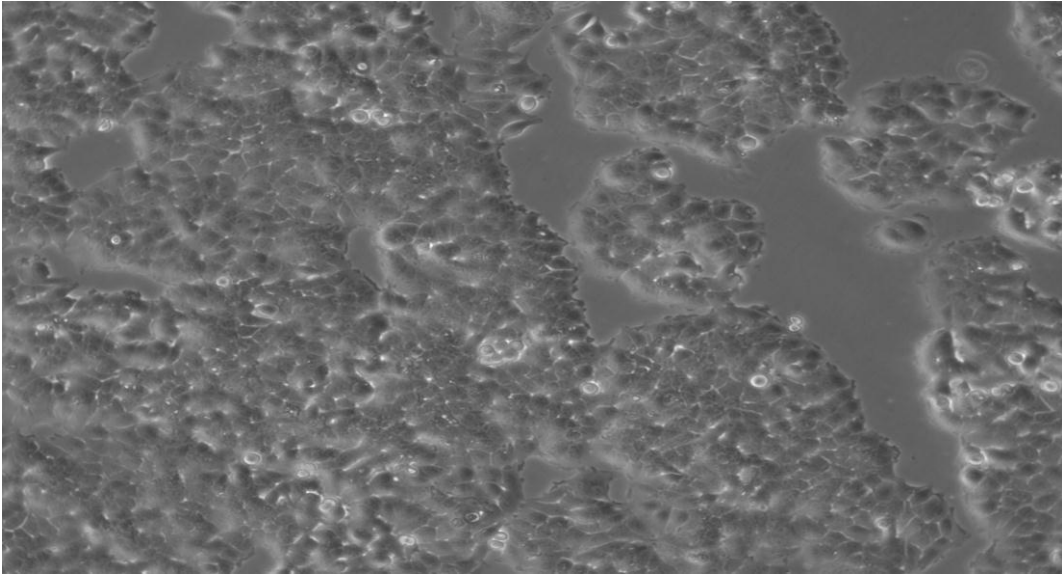
#### 2.3.1. MCF-7 hücre hattının kültürü ve çözündürülmesi

MCF-7 hücreleri 1970’de 69 yaşında Kafkas olan kadının meme dokusundan yalıtılmış ve östrojen artı (ER+) bir hücre hattıdır. Göğüs adenokarsinomasından türetilmiş (ATCC® HTB-22™) geniş çapta analiz edilen bir epitel kanseri hücre hattı olan MCF-7, değişik meme epitelinin niteliklerine aittir. Bununla beraber, sitoplazmik östrojen reseptörleri aracılığı ile, bu hücreler östradiole cevap verebilme kapasitesine sahiptirler. Yüzeye yapışarak kültüre edilen ve tek katmanlı (monolayer) bir hücre özelliği gösterirler.



**Şekil 2.5.** MCF-7-Sıvı azot stoğundan alınan

MCF-7 hücrelerinin don vaziyette olduğu göğüs adenokarsinomasından, sıvı nitrojenden ilgi çekici bir şekilde çıkarıldı ve su banyosunda (37 ° C) çözüme kavuşturuldu. Kriyotüplerin etrafı % 70'lik alkolle iyice temizlenerek kabine bırakıldı. Hücreler 37°C sıcaklıkta 9 mL besiyeride çözdürüldü. Falkona bırakılan hücreler, beş dk 1200 rpm de santrifüj edildi ve hücre pelleti (2-4 mL) % 10 (v/v) fetal bovine serumu (fetal dana serumu, FBS, Bichorom-Merck, Almanya; S-0115), 2 mM L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri ile seyreltilerek T-25 kültür kabına bırakılarak 37 °C'de, % 5'lik T-75 hücre kültür kabına bırakıldı.



**Şekil 2.6.** MCF-7 T-75 lik flaskte 48 saat

### 2.3.2. Hücre hattının pasajlanması

Hücreler açılıp T75 e aktardıktan 48 saat sonra belli yoğunluğa ulaşıncaya kadar kültür kabı yüzeyini dolduran hücreler tuz tampon (Hanks tuz solüsyon Biochrom-Merck, Almanya; L-2045) çözeltisiyle kap yüzeyini kaplayacak şekilde yıkandı akabinde tripsin-EDTA (Biochrom-Merck, Almanya; L-2143) çözeltisi ilave edilerek, hücreler yüzeyden kalkana değin 37 °C % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe yapıldı. Akabinde üzerine yeterli dozda kompleks besiyeri eklenip tripsin aktivitesi durmuş oldu. Santrifüj tüpüne bırakılan hücreler, 5 dk. 1200 rpm'de santrifüj yapıldı. Hücre pelleti kompleks büyüme besiyeriyle seyreltilerek T-75 kültür kabına bırakıldı ve 37 °C'de, % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde kültür bölgesine aktarıldı.



Şekil 2.7. A) MCF-7 Hücre kültüründe kullanılan cihazlar; (A) inkübatör, (B) santrifüj, (C) su banyosu (D) invert mikroskop

### 2.3.3. MCF-7 hücre hattının dondurma işlemi

Mikrobiyal kontaminasyon veya genotipik değişimleri uzun süreli hücre kültürlerinde görülebilir ve iyi karakterli hücre hatlarının kaybolmasına sebep olabilir. Bu kaybın önüne geçmek için , hücreler sıvı nitrojende (-196 °C) ebediyete dek dondurulabilir, saklanabilir ve bu gaye ile yüksek sayıda hücre lazım gelebilir. T75 flask yüzeyini kaplayan MCF-7 hücrelerine pasajlama yapılarak hücre pelleti % 10 DMSO , % 90 fetal sığır serumu dondurma medyumuyla seyreltilmek suretiyle dondurma tüpleri içerisine alındı (Çiçek ve ark., 2006). Bu tüpler, izopropilalkol bulunduran Mr.Frosty ile -80oC dondurucuya nakledilip 1 gece beklemesinin ardından kriyovialler uzun zamanlı sıvı nitrojen (-196 °C) tanklarına kataloglanmak suretiyle aktarıldı.



Şekil 2.8. Hücre kültüründe kullanılan sterilizasyon kabini

### 2.3.4. MCF-7 hücresinin sayımı ve ekimi

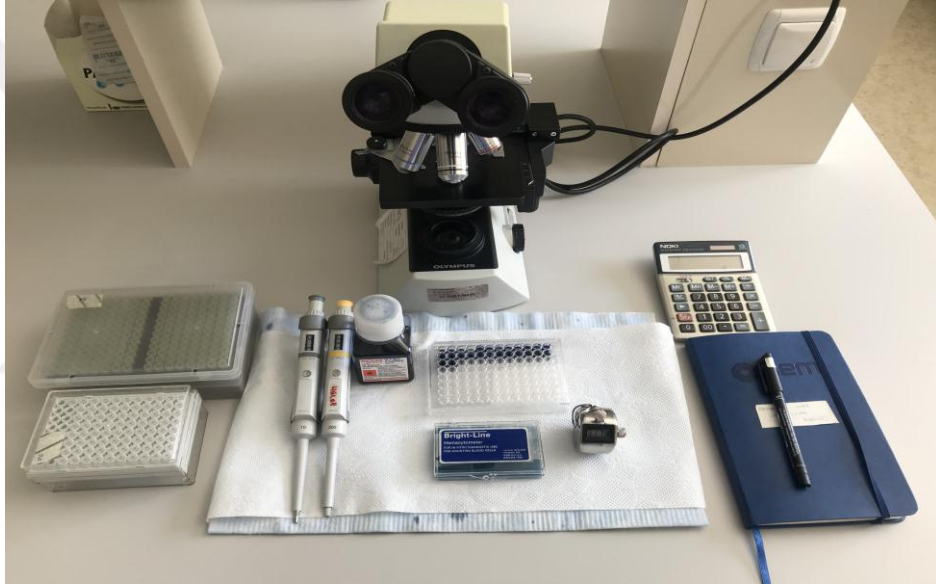
Hücre süspansiyonunun yoğunluğunu azaltmak, hücre sayma işlemi olarak adlandırılır. Santrifüjden gelen hücre süpernatantı çekilmesiyle pelleti hücre besiyeriyle çözülünce pipetaj yapılmış oldu. Hücre sayımı hemositometre isimi verilen hususi lamalar kullanılarak sayımı yapıldı. Hemositometre üzerinde mikroskopik ebatta 3 sınıflı çizgilerle bölünen dokuz büyük kare oluşturan bir mikroskop camıdır. Her büyük

karenin sahası 1 mm<sup>2</sup> 'dir. Lam üzerine bırakılan sıvının derinliği 0.1 mm'dir. nitekim her kare üzerindeki toplam hacim şöyle bulunur:

$$1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{ mm}^3 = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ ml veya } 10^4 \text{ ml}$$

Sayımın önce hücreler benzeşik hale getirilir akabinde hücre süspansiyonundan 50µl alınıp üzerine 50µl trifen mavisiyle (1:1) güzelce karıştırılarak bu solusyondan 10µl hemositometreye yüklenip ışık mikroskop altında hücreler araştırıldı. Boyama akabinde ölü hücreler koyu mavi renkte boyanınca canlı hücreler parlaklığını korur (Kocakli ve ark., 2014). Işık mikroskop altında mililitredeki hücre sayısını bulmak için şu formüle başvuruldu:

$$\text{Hücre sayısı / mL} = \text{Hücre sayısı (lam üzerinde)} \times 10^4$$



**Şekil 2.9.** Hücre sayımı için kullanılan malzemeler ve ışık mikroskobu

Bu formül ile MCF-7 hücre sayımı tamamlanıp önceden 24 kuyucuklu plakaya yerleştirilen 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Kaliks[4]aren nanoliflerin üzerine mililitredeki hücre yoğunluğu  $1 \times 10^4$  olacak biçimde ekildi. sonradan plaklar 48 saat bekletildi inkübasyona aktarıldı. XTT, MTT, xCELLingence, SEM ve konfokal analizleri için hücre ekimi benzer aşamalarla yapıldı.

### 2.3.5. MCF-7 hücre hattının canlılık testi-XTT analizi

XTT, mitokondriyal enzimler ile suda çözülen portakal rengine sahip formazanına indirgenerek sağlanmış bir tetrazolyum tuzudur aslında. Bu araştırma, metabolik etkin hücrelerin dehidrojenaz enzimlerince XTT'yi turuncu rengine sahip formazan bileşiklerine

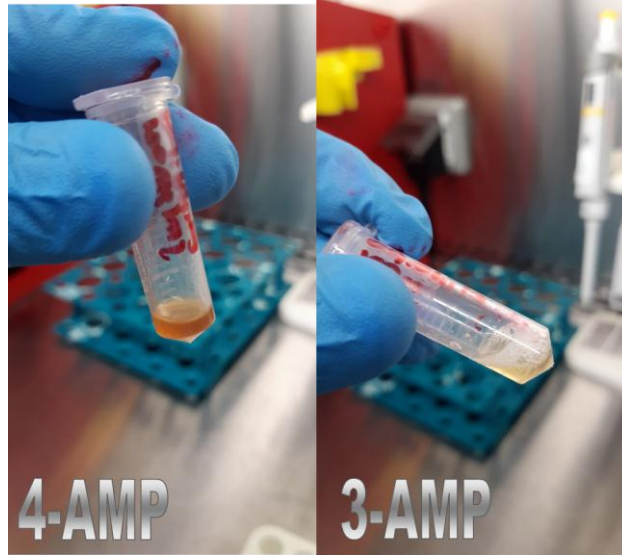
indirgeme kabiliyetine ilişkilidir (Gabrielson ve ark., 2002). XTT araştırma neticesinde boyanın yoğunluğu, metabolik etkin hücrelerin sayısı ile ilintilidir (Roehm ve ark., 1991).

Yüzeylerine MCF-7 hücresi ekimi yapılmış 2, 3 ve 4-AMP kaliks[4]aren nanolifler, yetmiş iki saat inkübasyondan sonra remgsiz DMEM ve XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)(Biological Industries) solüsyonundan eklenmesiyle hücreler solüsyon içerisinde 5 saat % 5 CO<sub>2</sub>, % 95 nem içeren 37°C'deki inkübasyona ilave edildi. Zaman neticesinde, plaklarda çözünmeye uğrayan formazan kristalleri epoch biotek marka ELISA okuyucuda 460 ve 650 nm dalga boylarında spektrofotometrik belirlendi.



Şekil 2.10. Elisa cihazı

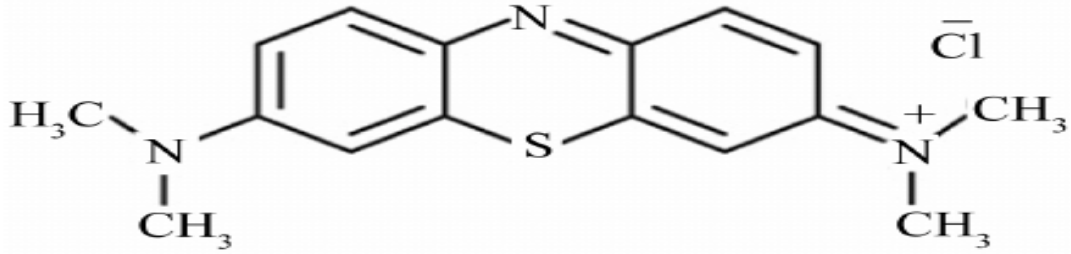
96 kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış MCF-7 hücrelerine bir gece inkübasyon sonrasında üzerlerine hücrenin kendi besiyerinde ve % 0.1 DMSO ile çözdürülmüş 2-AMP, 3-AMP ve 4- AMP kaliks[4]aren maddeleri eklenmiş ve 48 saat sonra sitotoksosite etkilerine bakılmıştır. Bunun için plaka üzerine XTT solüsyonu eklenerek 5 saat inkübasyona bırakılıp Epoch Biotek marka ELISA okuyucuda 460 ve 650 nm olmak üzere iki dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek canlı hücre sayısı incelenmiştir.



Şekil 2.11. Çözülmüş 3 ve 4-aminometilpiridin

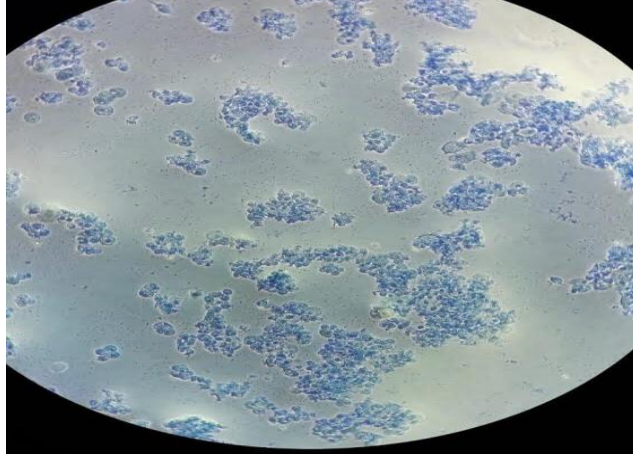
### 2.3.6. MCF-7 hücre hattının metilen mavisi boyama analizi

Metiltiyoninyum klorür olarak da bilinen metilen mavisi ( $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ), bir ilaçtır ve bronz benzeri bir parlaklığa sahip koyu yeşil kristaller veya kristal tozdan oluşan sentetik bazik bir boyadır. Su veya alkol içindeki metilen mavisi, koyu mavi bir renge sahiptir. Metilen mavisi, bakteriyolojik leke olarak ve indikatör olarak kullanılır



Şekil 2.12. Metilen mavisi boyasının kimyasal yapısı

Hücreler 48 saat 24 kuyu ekimden sonra yeni kuyucuğa aktarılır, üzerine 250  $\mu$ l % 5 ten hazırlanan metilen mavisi % 1 olarak eklenir ve 8-10 dk beklenir , ardından 2 kez 500  $\mu$ l Arıtılmış su ile yıkanır ve mikroskop altında incelenir.



**Şekil 2.13.** MCF-7 hücre hattı Metilen Mavisi ile boyalı mikroskop altında

### 2.3.7. MCF-7 hücre hattının gerçek zamanlı (xCELLigence) analizi

Gerçek zamanlı xCELLigence yöntemi, elektriksel empedansı ölçerek hücrelerin fenotipik değişikliklerinin dinamik ve etiketsiz olarak olanak sağlar. Sistem empedans ölçümünü, doku kültürü e-plakalarında her kuyucuğun tabanına entegre edilmiş birbirine kenetlenen mikroeletrodlar sayesinde yapar.

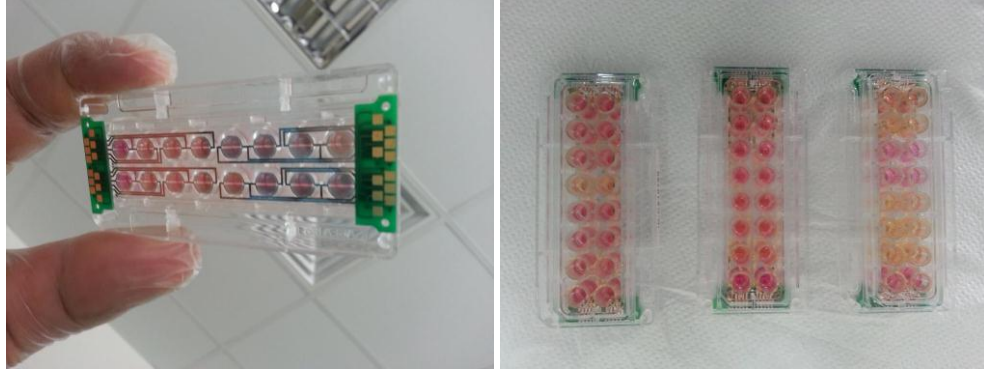
Empedans ölçümleri hücre sayısı, canlılığı ve morfolojisi dahil olmak üzere hücrelerin biyolojik durumu ile ilgili kantitatif bilgi veren Hücre İndeks (CI) değerleri olarak yapılır (Ke ve Abassi, 2013).



**Şekil 2.14.** RTCA (xCELLigence) analiz cihazı

16 kuyu e-plakalara ekimi yapılmış olan MCF-7 hücresi, bir gece inkübasyon bırakılır ve Cell Index'i 1'e ulaştığında e-plaka üzerine besiyerinde çözdürülen 50 µl 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kalıks[4]aren maddeleri eklenerek RCTA cihazına konulup

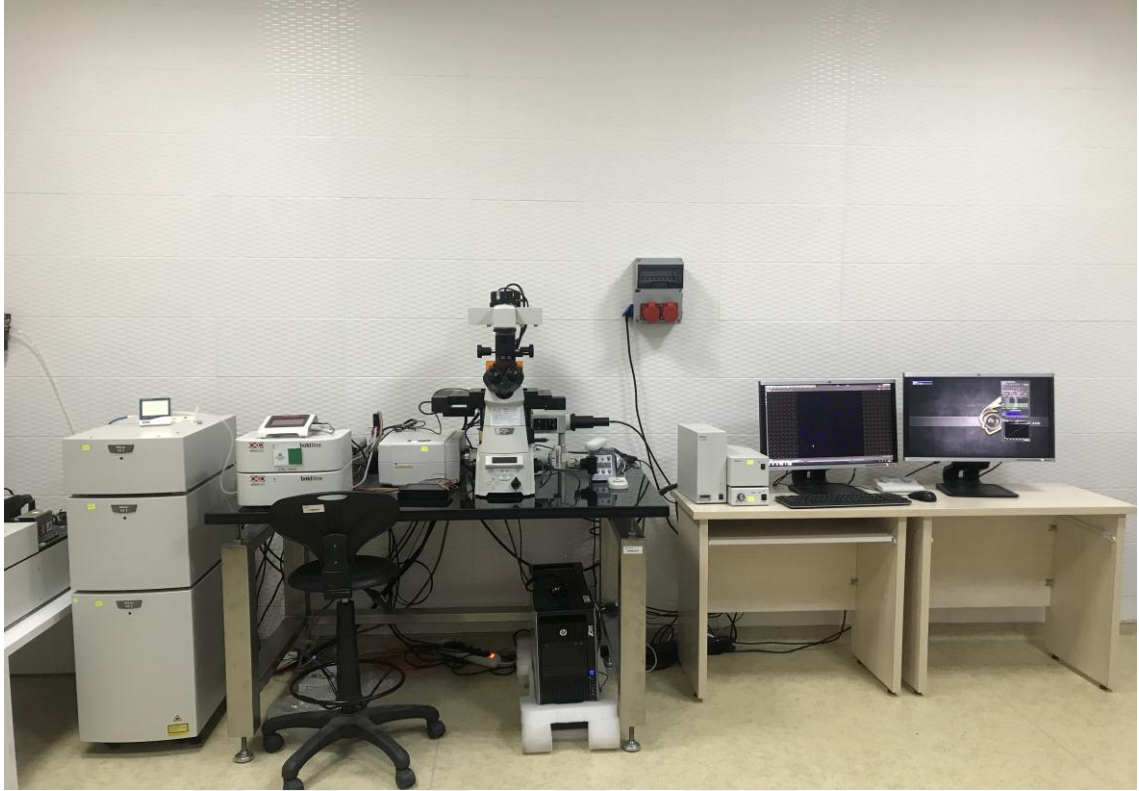
gerçek zamanlı etkileşimleri gözlenmiştir. Bu sayede zamana bağlı doz etkisi gözlemlenmiştir.



Şekil 2.15. xCELLigence cihazının E-plakası

### 2.3.8. Konfokal mikroskopta MCF-7 hücre hattının analizi

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kaliks[4]aren nanoliflerin üzerine ekilen MCF-7 hücrelerinin bu yüzeylerde çekirdekler ve iskeleler boyandı sebep çoğalmalarının ve morfolojilerinin incelenmesi. 24 kuyucuklu plakalara nanolifleri yerleştirmek suretiyle sterilizasyon yapılmasının ardından yüzeylerine MCF-7 hücre ekimi işleminin ardından 48 saat 37°C'de inkübasyona bekletildi. Bu vaktin ardından örnekler üzerindeki mediyum çekilmek suretiyle PBS tamponu ile yıkanınca aspiratör vasıtasıyla tampon uzaklaştırılır ve % 4 paraformaldehit çözeltisi ilave edilerek oda ısısında 10 dakika bekletilmesinin ardından PBS ile seyreltilen % 0.5 Triton 100 X solüsyonu ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında alındı. Phalloidin boyası 40-X PBS ile seyreltilmesinin ardından nanoliflerin üzerine ilave edilip oda ısısında 30 dakika süre bekletildi. PBS tamponu ile yıkama işleminin akabinde PBS ile seyreltilen 1000-X Dapi boyası 15 dakika oda ısısında bekletilmek suretiyle nanoliflerin üzerine ilave edildi. Bu uygulamanın ardından nanoliflerin üzerinden çözelti aspiratör vasıtasıyla uzaklaştırılıp PBS tamponu ile 2 kere yıkanma işlemi yapıldı. Lazer taramalı konfokal mikroskop ile MCF-7 hücre çekirdeğini ve iskeletini 488 nm ve 635 nm dalga boylarında floresan vasıtasıyla uyarılarak izlenime sunuldu.



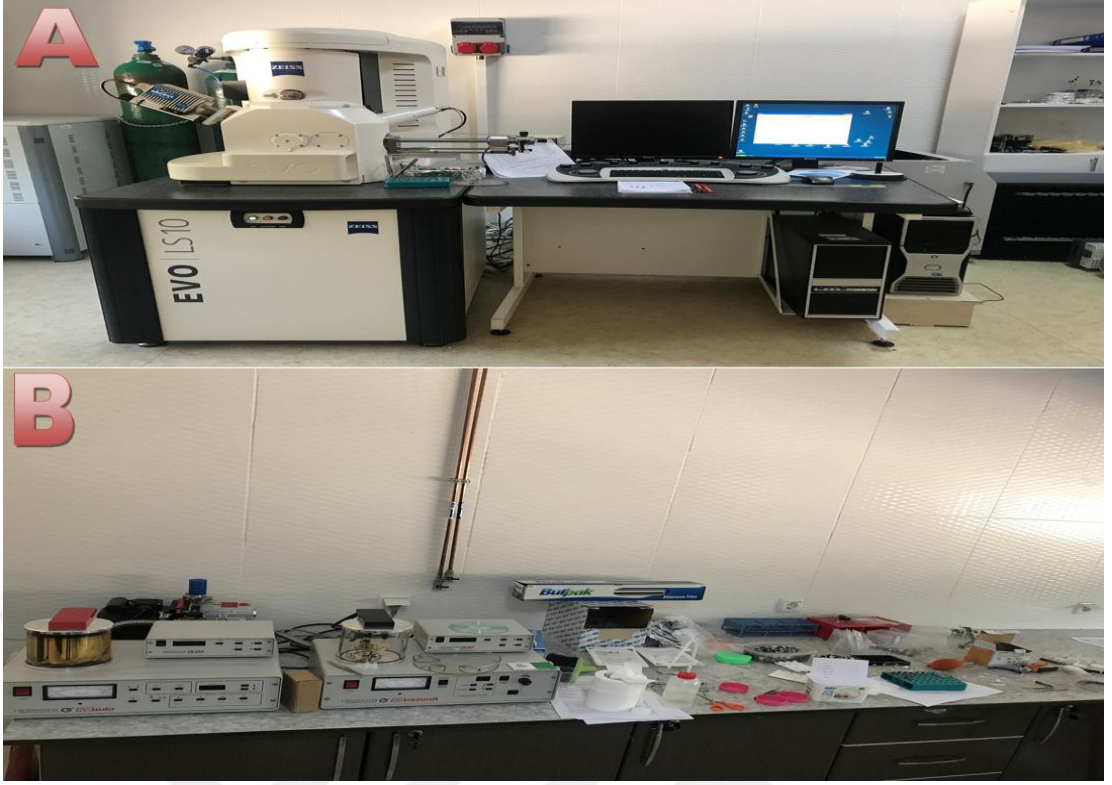
Şekil 2.16. Laser taramalı konfokal mikroskobu

### 2.3.9. Taramalı elektron mikroskopta (SEM) MCF-7 hücre hattının analizi :

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kaliks[4]aren nanolif örneklerin laboratuara alınmasının ardından belli bir süre zarfında sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Yüzeylerine HGF-1 hücresi ekilmesiyle 48 saat inkübasyon ardından fiberler yeni 24 kuyucuklu plaklara bırakılarak 2 kez 0.1 M pH: 7.4 kakodilat tamponu ile yıkama akabinde, kakodilat tamponunda hazırlanan glutaraldehit solüsyonu ilave edilerek oda ısısında ve bir süreliğine bekletildi karanlık ortamda.

Bu zaman neticesinde kuyucuklar iki kez 0.1M kakodilat tamponunda yıkanma işlemi gerçekleştirildi. Tampon uzaklaştırılmak suretiyle plaka -80 °C derin dondurucuda 24 saat (1 gece) beklemeye alındı. Ertesi gün, -110 °C'ye değin soğutan liyofilizatörde plaka 24 saat (1 gece) bekletilmek suretiyle kuruma işlemi gerçekleştirildi.

SEM analizi öncesi örnekler 5nm AuPd ile kaplanmak suretiyle örnek yüzeylerinde tutunup artan hücreler, 500-X, 2000-X, 5000-X ve 10000-X büyümelerde izlenime sunuldu.

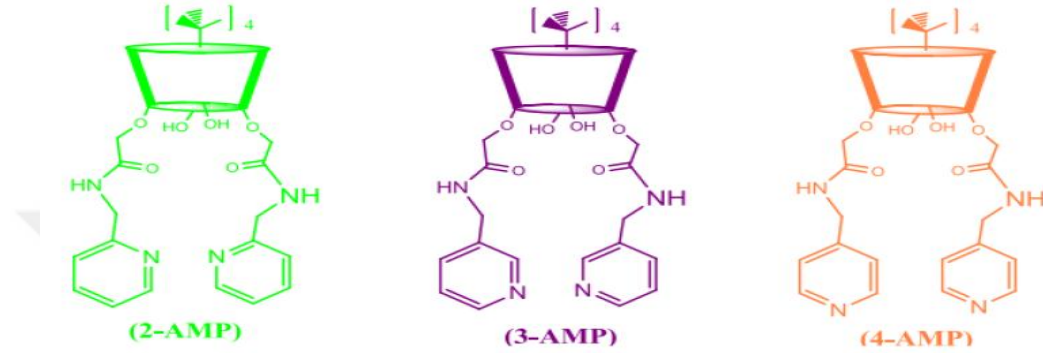


Şekil 2.17. A) Taramalı elektron mikroskobu (SEM) B) AuPd kaplamam cihazı

### 3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

#### 3.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin'nin Yapı, Karakterizasyon ve Analiz Sonuçları

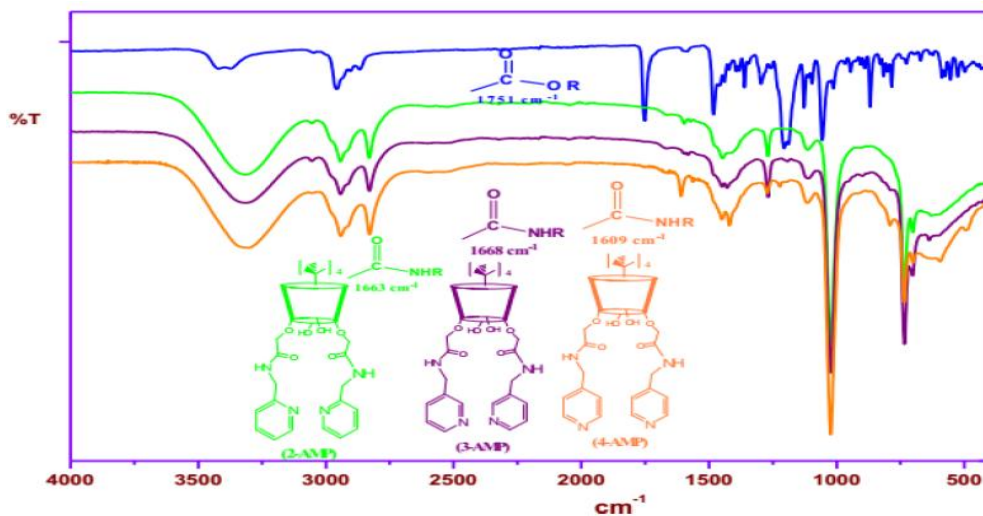
Çalışma aşamalarında 2, 3 ve 4-Aminometilpridin'nin maddelerinden oluşturulan toz ve nanolif yapıları kullanıldı (Şekil 3.1.).



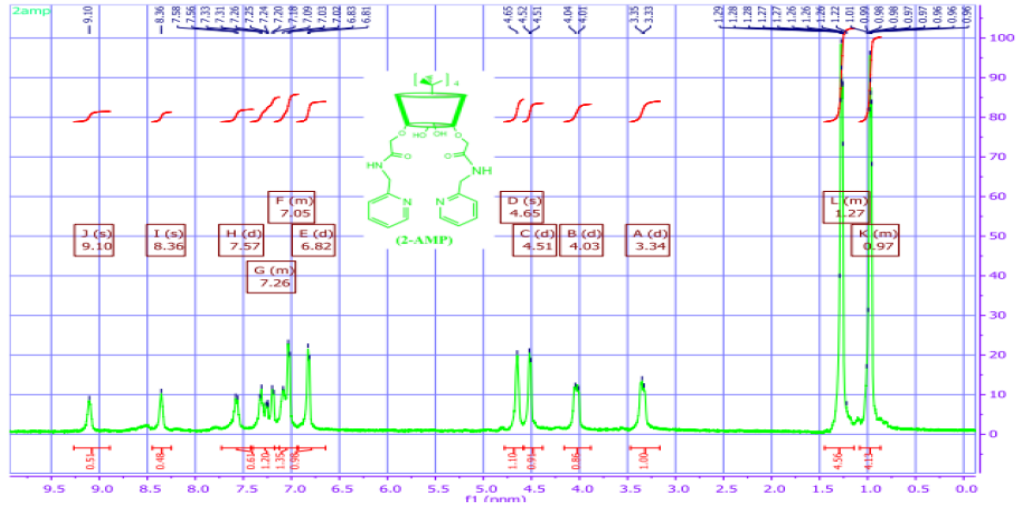
Şekil 3.1. *p*-tert-bütilkaliks[4]arenin yapıları

##### 3.1.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin'nin FT-IR analizlerinin sonuçları

2, 3 ve 4- Aminometilpridin *p*-tert-bütilkaliks[4]arenin FT-IR'larına bakıldığında FT-IR spektroskopisinde  $1751\text{ cm}^{-1}$  deki ester karbonil bandının 2-AMP için  $1663\text{ cm}^{-1}$ , 3-AMP  $1668\text{ cm}^{-1}$  ve 4-AMP için  $1609\text{ cm}^{-1}$  amid karbonil bandına dönüşümü takip edildi (Şekil 3.2).

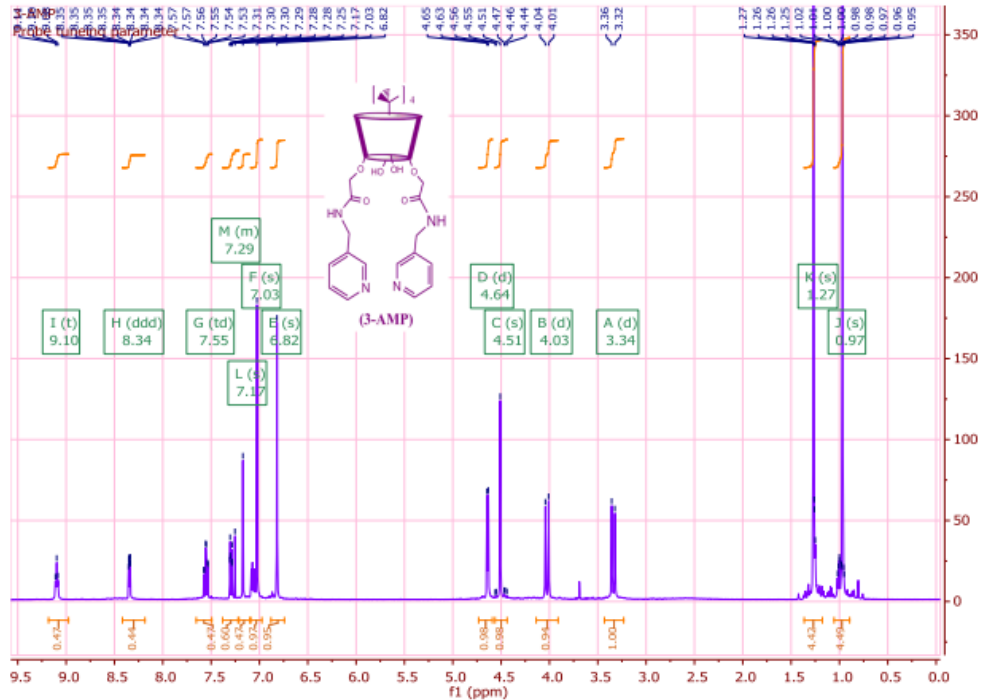


Şekil 3.2. 2 , 3 ve 4-AMP'nin FT-IR analizleri



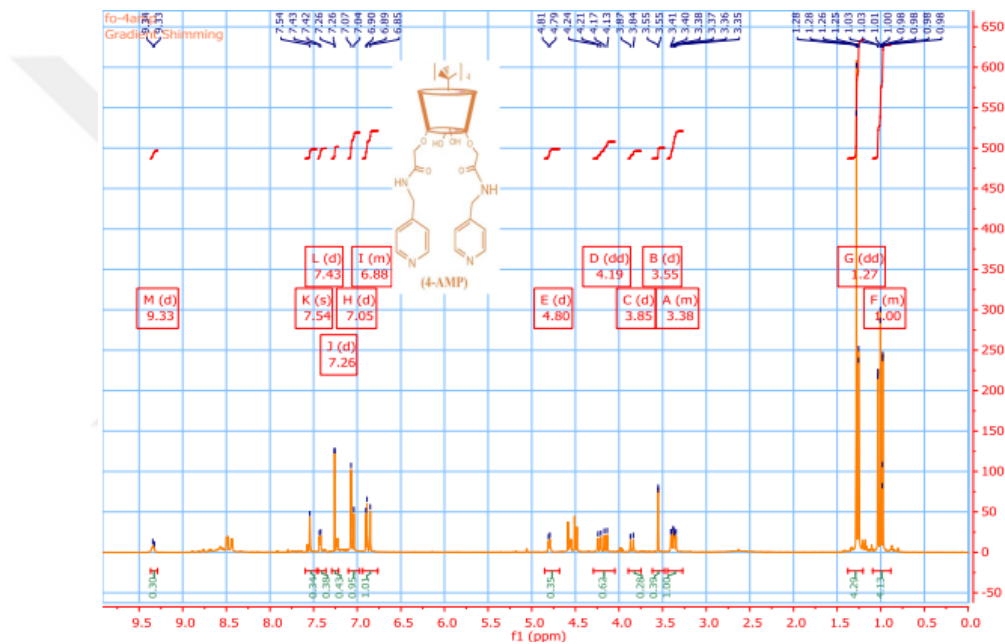
Şekil 3.3. 2-AMP'nin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumları

2-Aminometilpridin'nin; verim: 1.48 g, (% 65.0 ), E.n : 259-262 IR :1676  $\text{cm}^{-1}$  (C=N)  $\nu_{\text{max}}$  (ATR): 3454, 3358, 1676  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.97 (18H, s, tBu), 6.82 (4H, s, ArH), 1.27 (18H, s, tBu), 4.51–4.65 (8H, m,  $\text{OCH}_2$ , Ar- $\text{CH}_2$ -NH), 3.34 (4H, d,  $J$ = 13.3 Hz, Ar $\text{CH}_2$ Ar), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 7.05 (4H, s, ArH), 8.45 (2H, d,  $J$ =4.5 Hz, PyH), 7.31 (2H, s, OH), 4.03 (4H, d,  $J$ =13.3 Hz, Ar $\text{CH}_2$ Ar), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). 7.57 (2H, d,  $J$ =7.8 Hz, PyH), anal. hesaplı.  $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_4$ : C, 76.24; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan; C, 76.28; H, 7.70; N, 5.88% (MA: 944.56 g/mol) (Şekil.3.3).



Şekil 3.4. 3-AMP'nin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumları

**3-Aminometilpridin'in;** verim: 1.5 g,( % 65.8) , E.n : 239-242 IR :1681 cm<sup>-1</sup> (C=N) vmax (ATR): 3454, 3358, 1681 cm<sup>-1</sup> ; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 0.98 (18H, s, tBu), 3.27 (4H, d, J=13.3 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 1.22(18H, s, tBu), 3.90 (4H, d, J=13.3 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.85 (4H, s, ArH), 4.46–4.49 (8H, m, OCH<sub>2</sub>, Ar–CH<sub>2</sub>–NH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, J= 7.8 Hz, PyH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 9.21(2H, t, NH), 8.62 (2H, d, PyH), 8.45 (2H, d, J=4.5 Hz, PyH). anal. hesapl. C<sub>60</sub>H<sub>72</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>: C, 76.23; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan: C, 76.31; H, 7.74; N, 5.83%(MA: 944.56 g/mol) (Şekil 3.4).

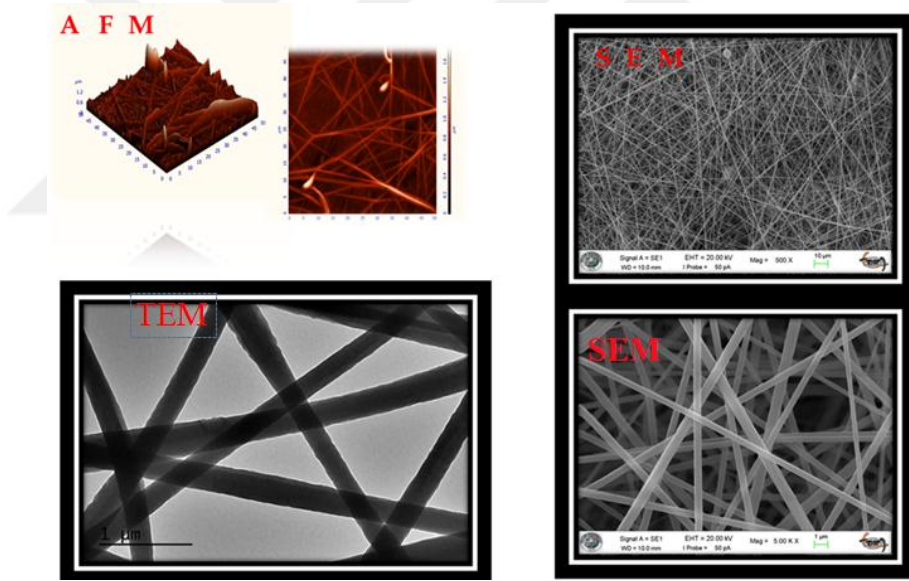


Şekil 3.5. 4-AMP'nin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları

**4-Aminometilpridin'in;** verim: 1.72 g,( % 75.5) , E.n : 239-242 IR :1638 cm<sup>-1</sup> (C=N) vmax (ATR): <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 1.27 (18H, s, tBu), 3454, 3358, 1638 cm<sup>-1</sup> ; 1.0 (18H, s, tBu), 3.38 (4H, d, J=13.3 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.88 (4H, s, ArH), 3.55 (4H, sAr–CH<sub>2</sub>–NH), 4.80 (4H, s, OCH<sub>2</sub>), 3.86 (4H, d, J=13.3 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 7.05 (2H, m, PyH), 6.85 (4H, s, ArH), 7.26 (2H, d, J= 7.8 Hz, PyH), 7.48 (2H, s, OH), 7.54 (2H, d, J= 7.8 Hz, PyH), 9.33 (2H, t, NH). anal. hesapl. C<sub>60</sub>H<sub>72</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub>: C,76.23; H,7.68; N,5.93. Bulunan: C,76.31; H,7.74; N,5.83 % ( MA: 944.56 g/mol ) (Şekil 3.5.).

### 3.1.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin AFM, SEM ve TEM analizleri

2, 3 ve 4-Aminometilpridin'nin nanoliflerin yüzey analizleri AFM, SEM ve TEM gibi karakterizasyon teknikleri kullanılarak aydınlatılmıştır (Şekil 3.6). Bu teknikler kullanılarak nanoliflerin morfolojik özellikleri olarak lif çapı ve çap dağılımı, boncuk büyüklüğü ve sayısı, yüzey özellikleri arasında incelenmektedir. SEM sonuçlarına göre nanoliflerin çaplarının büyüklüğü 186.4 nm boyutunda olup nanolif tabakasındaki dağılımları homojendir. Nanolif yüzeyinde bulunan boncuklar, üzerine damlayan polimer çözeltisi olarak tanımlanmaktadır. Deneylerimizde kullanılan 2, 3 ve 4-aminometilpridin nanolif yüzeyleri polimer katkılı olmadığı için boncuksuz yapıda olduğu SEM, TEM görüntülerinde gösterilmektedir. Nanolifler uzunlukları boyunca gözeneklere sahip olurlar. Gözenek büyüklüğü ve dağılımı belirlenmesi için yapılan 3 boyutlu AFM analizi sonucunda 20x20  $\mu\text{m}$ 'lik alanda gözenek çap ve dağılımı homojendir.

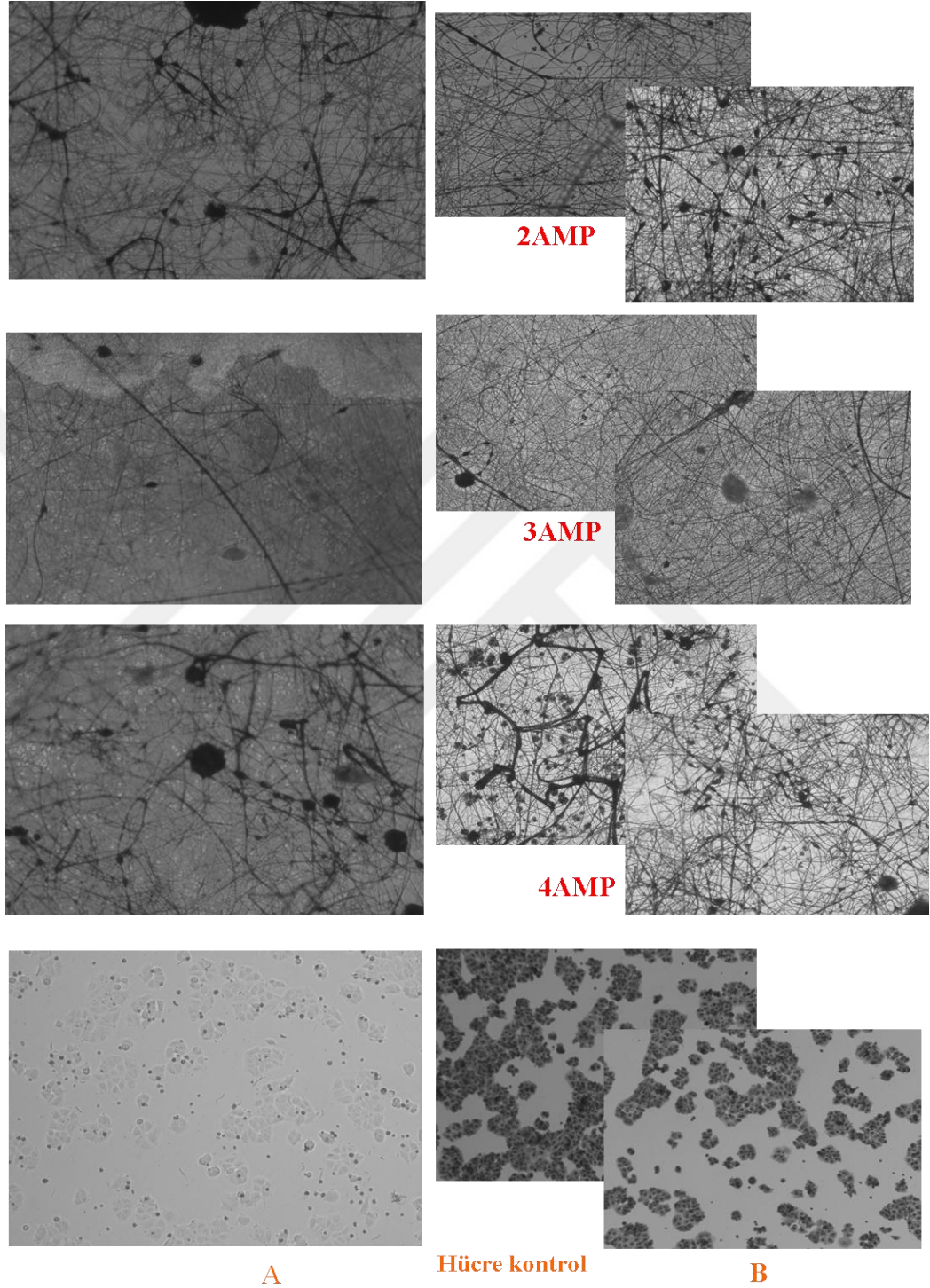


Şekil 3.6. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin AFM, TEM ve SEM görüntüleri

### 3.2. MCF-7 Hücre Hattı Nanolif Üzerinde Ekerken Metilen Mavisi Boyası İle İnvert Mikroskop Görüntüleri

24 kuyucuklu plakalara  $1 \times 10^5$  MCF-7 hücre ekimi yapılarak 2-Aminometilpridin, 3-Aminometilpridin ve 4-Aminometilpridin'nin farklı etkileşimi üzerindeki MCF-7 adenocarcinoma hücreleri ile 48 saate oluşturduğu morfolojik farklılığı % 1 metilen

mavisi ile boyadıktan sonra invert mikroskopla aşağıda belirtildiği gibi incelenerek görüntülendi (şekil 3.7)



**Şekil 3.7.** 24 kuyucuklu plakaya ekilen MCF-7 hücresi 2, 3 ve 4-AMP 'de 48 saat etkileşimlerinin A)Normal boyasız B)Metilen mavisi boyalı 10X invert mikroskop görüntüleri.

İnvert mikroskoptaki analiz sonuçlarına göre MCF-7 hücresi 2, 3 ve 4-AMP'nin üzerinde tutulup çoğalması gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP fiberlerin üzerinde hücre canlılığı aralığında etkili olduğunu incelemek ve  $IC_{50}$  değerini belirlemek için sitotoksosite (XTT+ MTT), konfokal ve SEM deneyi yapıldı.

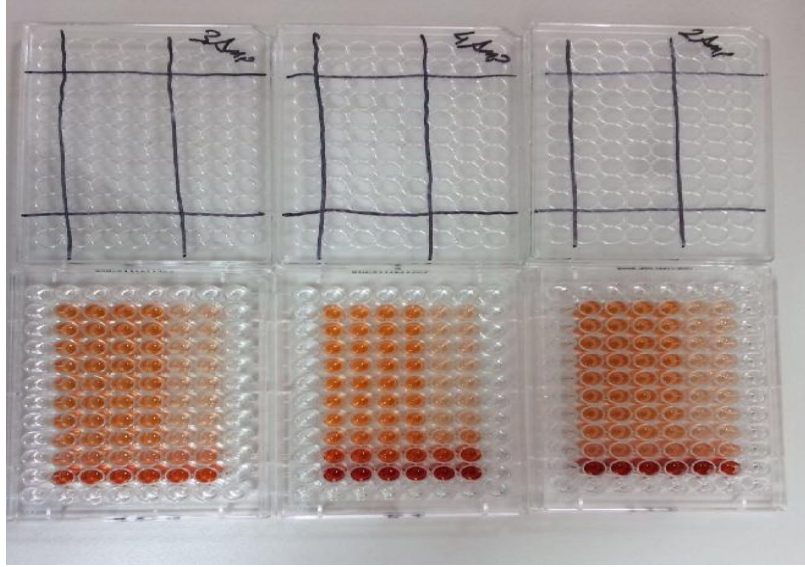
### 3.3. Hücre Canlılık Testleri

#### 3.3.1. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin maddeleri'nin ve nanolifleri'nin hücre canlılığı ve sitotoksosite (XTT+MTT) analizlerinin sonuçları

96 kuyu plakalarda, kuyubaşına  $5 \times 10^3$  MCF ekildi, 24 saat sonra, yeterince çoğalan hücre plakaları üzerine çözünmüş toz 2, 3 ve 4- Aminometilpridin maddeler, konsantrasyonları 500 uM ila 2  $\mu$ M arasında seyreltilerek ilave edildi ve 24 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi (şekil 3.8).

Görüntüler daha sonra, XTT çözeltisi eklenmeden önce ters mikroskop altında elde edildi. Daha sonra, XTT eklendi ve renk değişimi tamamlanıncaya kadar 5 saat süreyle inkübatöre yerleştirildi. Çalışmamızda kullanılan maddelerin hücre ölümü üzerindeki etkisi, eklenen XTT çözeltisinde tetrazolium tuzunu formazan'a dönüştüren canlı MCF-7 hücre çizgisinin mitokondriyal aktivitesinden kaynaklanan turuncu renkle belirlenmiştir. Daha sonra, 460 nm dalga boyunda ELISA cihazı ile spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

MCF-7 hücre hattına 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin  $IC_{50}$  değerleri de hesaplandı. Kaliks [4] arenlerinin hücrelerde sitotoksik etkisi, hücre canlılığını belirleyen yöntemlerden biri olan XTT yöntemi ile değerlendirildi.

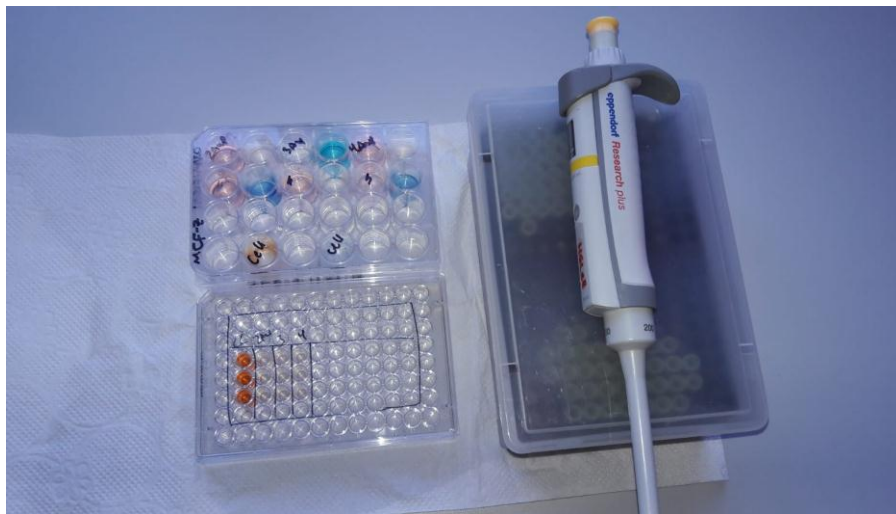


Şekil 3.8. MCF-7 hücre hattı 96 plakaya XTT ekimi

24 kuyu plakaya kuyucuk başı  $1 \times 10^4$  ve  $1 \times 10^5$  olarak MCF-7 hücresi fiber üzerinde ekimi yapılarak plakalar 48 saat inkübatörde bekletildi. Hücre canlılığı ve sitotoksisite analizi yapılacak olan 2, 3 ve 4-AMP fiber bileşiklerini diğer yeni plakaya aktarıldı üzerine 250  $\mu$ l rengsiz DMEM artı 125  $\mu$ l XTT solüsyonu ve 5 saat daha inkübatörde bekletildi.

Süre dolduğundan sonra rengsiz DMEM ve XTT solüsyonu 150  $\mu$ l olarak 96 plakaya aktarıldı (şekil 3.9).

Aktif MCF-7 hücrelerin mitokondriyelerinde bulunan dehidrojenaz adlı enzimler tarafından XTT'deki tetrazolyum tuzunu formazan turuncu rengi indirgenmesi, ELISA cihazı yardımıyla 460 ve 680 nm dalga boylarında maddelerin etkisi sonucu hücrelerde ölüm olup olmadığı spektrofotometrikle ölçüldü.



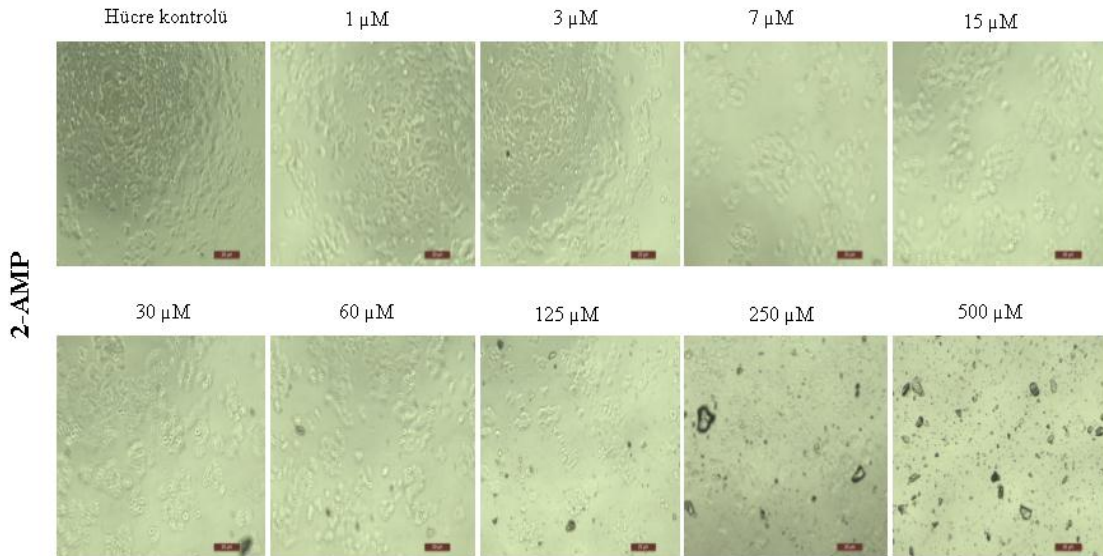
Şekil 3.9. MCF-7 hücre hattı nanolif XTT canlılık testi

24 kuyu plakaya ekilen 2, 3 ve 4-AMP nanolifler üzerine  $15 \times 10^4$  ve  $1 \times 10^4$  olarak MCF-7 hücresi ekimi yapılarak plakalar 48 ve 72 saat inkübatörde bekletildi. hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak kullanılan Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı bir testtir, çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesiyle tetrazolyumu (MTT: sarı, WST1: kırmızı) kullanarak, formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbansının ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır.

MTT testi yapılacak olan 2,3 ve 4-AMP nanolif bileşiklerini diğer yeni plakaya aktarıldı üzerine 1000 µl renksiz DMEM artı 200 µl MTT solüsyonu eklendi, 5 saat inkübatörde bekletirdi.

Süre dolduğundan sonra füberlerin üzerindeki olan besiyer ve MTT solüsyonu olan çekilip fiber üzerine 1200 µl DMSO eklendi ve 30 dk karanlıkta daha bekletirdi, ardından 96 plakaya 150 µl kuyucuk başı aktarıldı. Daha sonra, 570 nm dalga boyunda ELISA cihazı ile spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

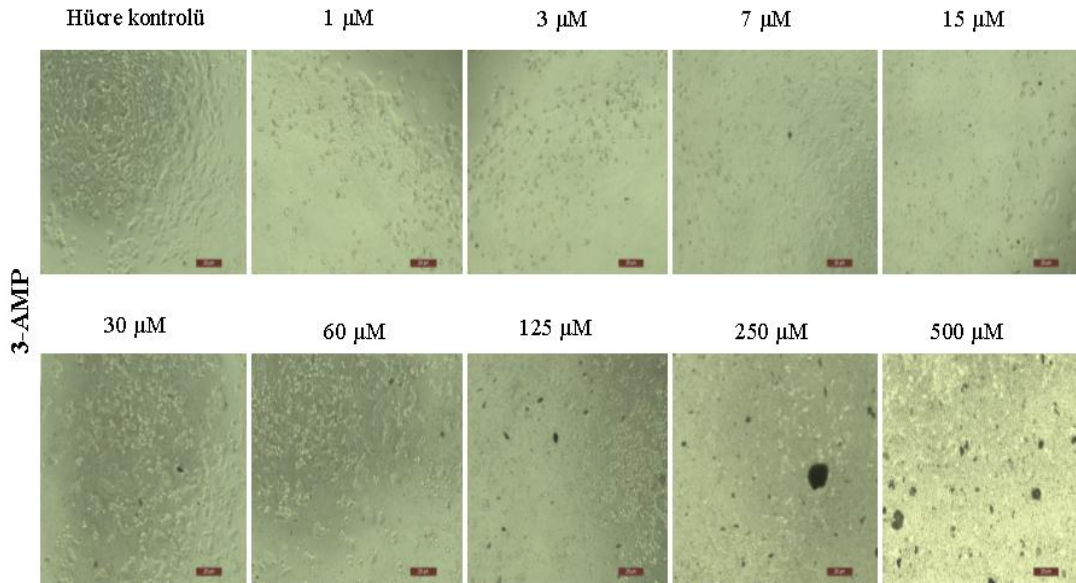
### 3.3.2. 2,3 ve 4-Aminometilpridinlerin XTT yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki MCF-7 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi



**Şekil 3.10.** MCF-7 hücre hattı ile 2- Aminometilpridin 24 saat sonra etkileşimi 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 3.10.deki mikroskop görüntülerine göre , 96 kuyulu plakalara ekilmiş MCF-7 hücreleri, 1-500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 24 saat boyunca kaliks [4] aren, 2-Aminometilpridinlerle inkübe edildi.

Bu maddenin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi mikroskop altında incelendi ve konsantrasyonları arttıkça hücrelerin değiştiği morfolojik özelliklerin meydana geldiği gözlemlendi. Ayrıca, 250  $\mu\text{M}$  ve 500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında maddenin yüksek konsantrasyonundan dolayı hücreler görünmemişti.

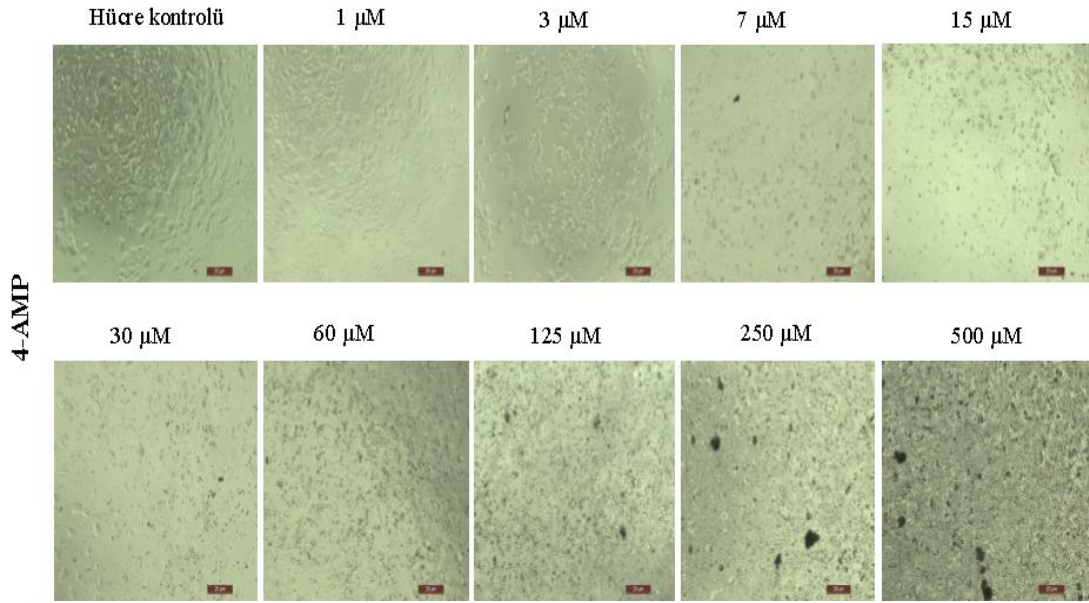


**Şekil 3.11.** MCF-7 hücre hattı ile 3-Aminometilpridin 24 saat sonra etkileşimi 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 3.11.deki mikroskop görüntülerinde , 96 kuyulu plakalara ekilmiş MCF-7 hücreleri, 1-500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 24 saat boyunca kaliks [4] aren, 3-Aminometilpridinlerle inkübe edildi.

Bu maddenin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi mikroskop altında incelendi ve konsantrasyonları arttıkça hücrelerin değiştiği morfolojik özelliklerin meydana geldiği gözlemlendi.

Düşük konsantrasyonlardan daha yuvarlak hale gelen hücre yapılarının ölmeye başladığı görülmüştür. 250 ve 500  $\mu\text{M}$  yüksek konsantrasyonlarda, hücreler tamamen öldürüldüğü gözlemlendi.

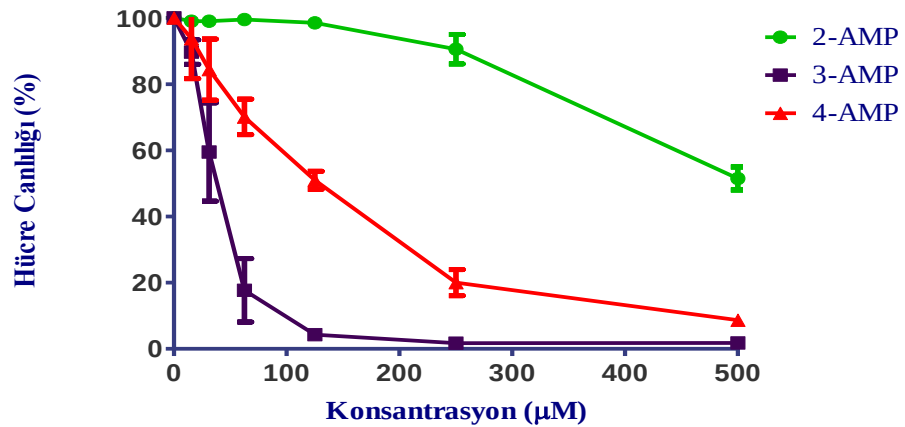


Şekil 3.12. MCF-7 hücre hattı ile 4-Aminometilpridin 24 saat sonra etkileşimi 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 3.12. deki mikroskop görüntülerinde , 96 kuyulu plakalara ekilmiş MCF-7 hücreleri, 1-500  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda 24 saat boyunca kaliks [4] aren, 4-Aminometilpridinlerle inkübe edildi.

Bu maddenin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi mikroskop altında incelenmiş ve konsantrasyonlarındaki artıştan dolayı hücrelerin morfolojik özelliklerinin değiştiği görülmüştür. Ek olarak, tüm hücrelerde 250 ve 500  $\mu\text{M}$  yüksek konsantrasyonlarda ölümler gözlemlendi.

### 3.3.3. 2, 3 ve 4-Aminometilpridin MCF-7 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı grafiğinin ve $\text{IC}_{50}$ değerlerinin hesaplanması

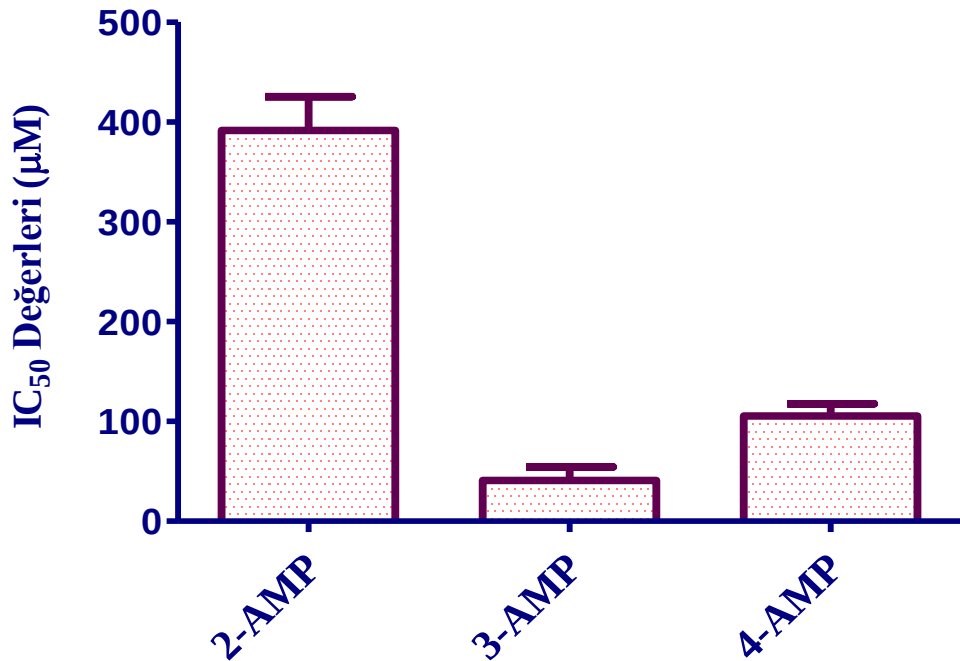


Şekil 3.13. 2, 3 ve 4- Aminometilpridinlerinin MCF-7 hücre hatları üzerindeki konsantrasyonlarına bağlı olarak 24 saat sonraki % hücre canlılığı grafiği

Hücre canlılığı (%) grafiğine göre MCF-7 hücrelerine etki eden, yükselen konsantrasyonlarda uygulanan kalix[4]aren türevli bileşikler belli konsantrasyonlarda % hücre canlılığını düşürmüştür. Kullanılan kaliks[4]aren türevli bileşiklerden 2-AMP'de artan konsantrasyona göre % hücre canlılığı eğrisi neredeyse düşmemiştir. Bununla birlikte  $IC_{50}$  değeri de 391.40  $\mu M$  olarak belirlenerek en yüksek konsantrasyona yakın bir değer olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Bu sonuca göre 2-AMP'nin MCF-7 hücrelerine olan sitotoksik etkisinin çok az olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 4.12).

3-AMP'de ise artan konsantrasyona orantılı olarak % hücre canlılığı eğrisi düşük konsantrasyonlarda düşüş göstermeye başlamıştır. Maddenin  $IC_{50}$  değeri de 40.96  $\mu M$  olarak belirlenerek MCF-7 hücreleri üzerinde düşük konsantrasyonda sitotoksik etkisinin olduğu görülürken en yüksek konsantrasyonda kuyucuktaki MCF-7 hücrelerinin neredeyse tamamının öldüğü görülmüştür (Şekil 4. 13).

4-AMP'de de artan konsantrasyonla birlikte % hücre canlılığı eğrisi belirli bir konsantrasyon aralığından itibaren düşüş göstermiştir.  $IC_{50}$  değeri ise 105.52  $\mu M$  olarak belirlenerek maddenin yüksek konsantrasyonlarda MCF-7 hücresinin morfolojisinde değişikliğe neden olduğu ve en yüksek konsantrasyonda maddenin MCF-7 hücrelerine sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.13).



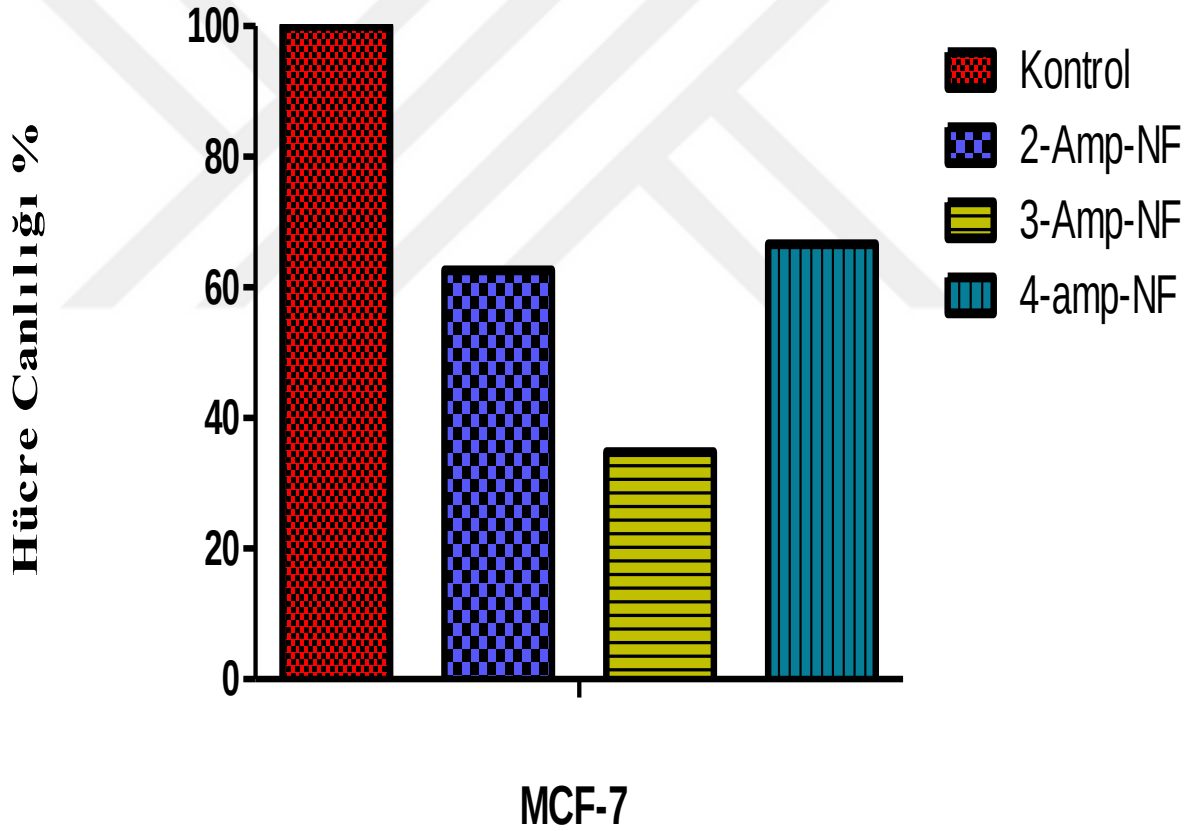
Şekil 4.14. 2, 3 ve 4- Aminometilpridinlerinin MCF-7 hücre hatları üzerindeki konsantrasyonlarına bağlı olarak 24 saat sonraki  $IC_{50}$  değerleri grafiği

XTT yönteminin sonuçları ve görüntülenen mikroskop görüntüleri birbirleriyle uyumludur ve birbirlerini destekler.

Bu sonuçlara dayanarak, MCF-7 kanser hücrelerine karşı en etkili sitotoksik ajan, 3-AMP, daha sonra 4-AMP ve en az sitotoksik, 2-AMP idi.

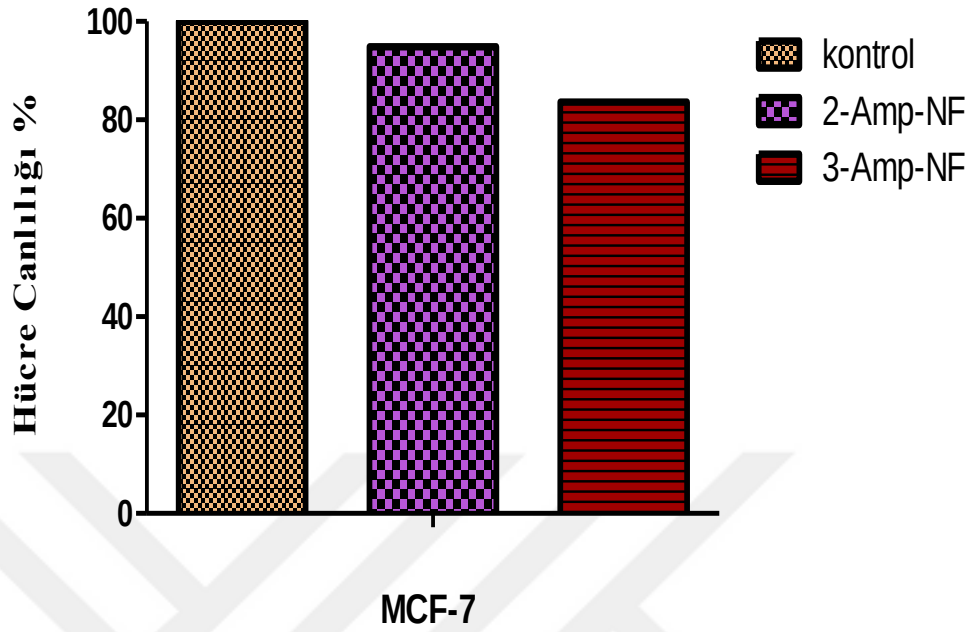
Araştırmamız kaliks [4] arenlerinin, 3. pozisyondaki piridinyum grubunun modifikasyonu ile gösterilen geliştirilmiş tercihli sitotoksosite ile 25 ila 100 uM'lik bir konsantrasyon aralığında MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı etkili tercihli sitotoksosite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Yukardaki aşamalardan sonra MCF-7 hücreler 2, 3 ve 4-AMP nanofiberleri üzerinde  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk başı 72 saat inkübe edildi (4.15)



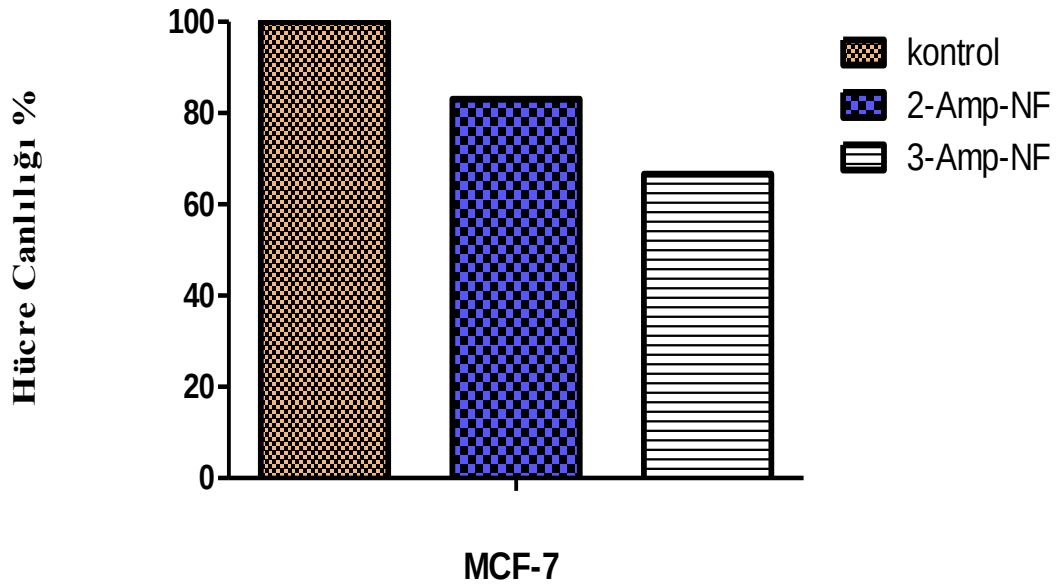
**Şekil 4.15.** MCF-7 hücre hattı  $1 \times 10^4$  sayıda 2, 3 ve 4-AMP nanolifleri üzerinde 72 saat hücre XTT canlılık grafiği

Sonra hücre ekimi 2 ve 3-amp nanolif üzerinde  $15 \times 10^4$  hücre kuyucukta 48 saat inkübatörde devam edildi şekil (4.16)



**Şekil 4.16.** MCF-7 hücre hattı  $15 \times 10^4$  kuyucukta 2 ve 3-AMP üzerinde 48 saat XTT hücre canlılık grafiği

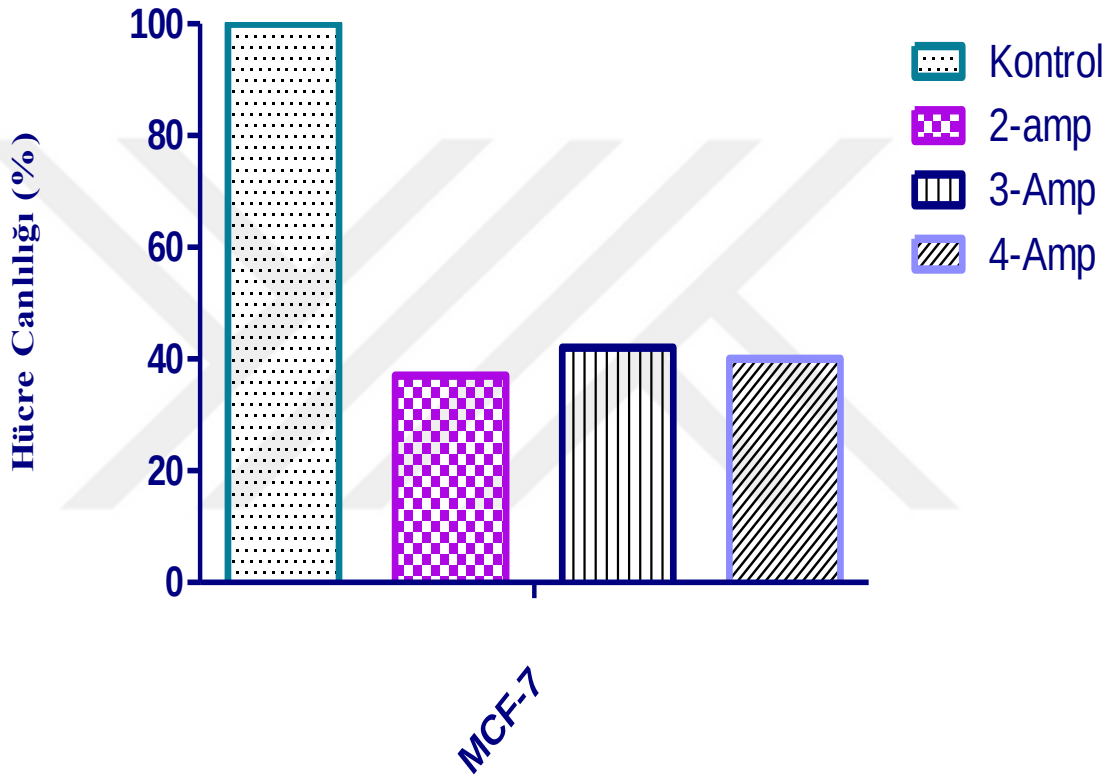
Bunun ardından MCF-7 hücreleri  $1 \times 10^4$  sayısı ile kuyucukta 2 ve 3-amp nanolifleri üzerinde 8 gün boyunca inkübe edildi (4.17)



**Şekil 4.17.** MCF-7 hücre hattı  $1 \times 10^4$  kuyucukta 2 ve 3-AMP nanolifleri üzerinde 8 günlük XTT hücre canlılık grafiği

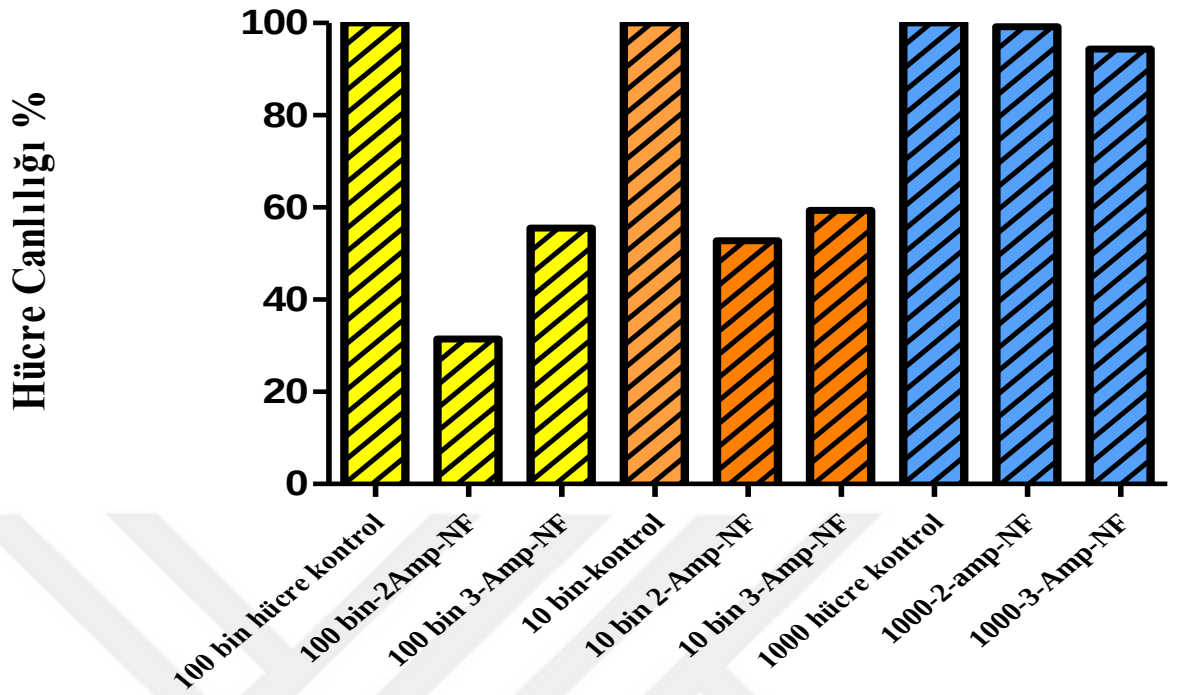
Üsteki grafiklere göre 2, 3 ve 4-amp nanofiber yüzeylerden MCF-7 hücre proliferasyonunu en iyi destekleyen 2-AMP sonra 4-AMP nanolif yüzeyleri görüldü. 2 ve 4-AMP hücrenin ECM matrisine benzer bir ortam oluşturmaya izin vermiştir ve en iyi 3B ortamı sağlayan 2-AMP fiberleridir.

Bununla birlikte MTT analizi yapmak üzere MCF-7 hücresi  $15 \times 10^4$  hücre kuyucukta 2, 3 ve 4-AMP nanolifler üzerinde ekildi ve 48 saat inkübe edildi (3.18)



**Şekil 3.18.** MCF-7  $15 \times 10^4$  kuyucukta 2, 3V3 4-AMP nanolif üzerinde 48 saat MTT hücre canlılık grafiği

MTT analizi 2 ve 3-AMP nanolifi üzerinde devam ederek MCF-7 hücre hattı  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  ve  $1 \times 10^5$  sayıda olarak ekildi ve 48 saat boyunca inkübe edildi (4.19)

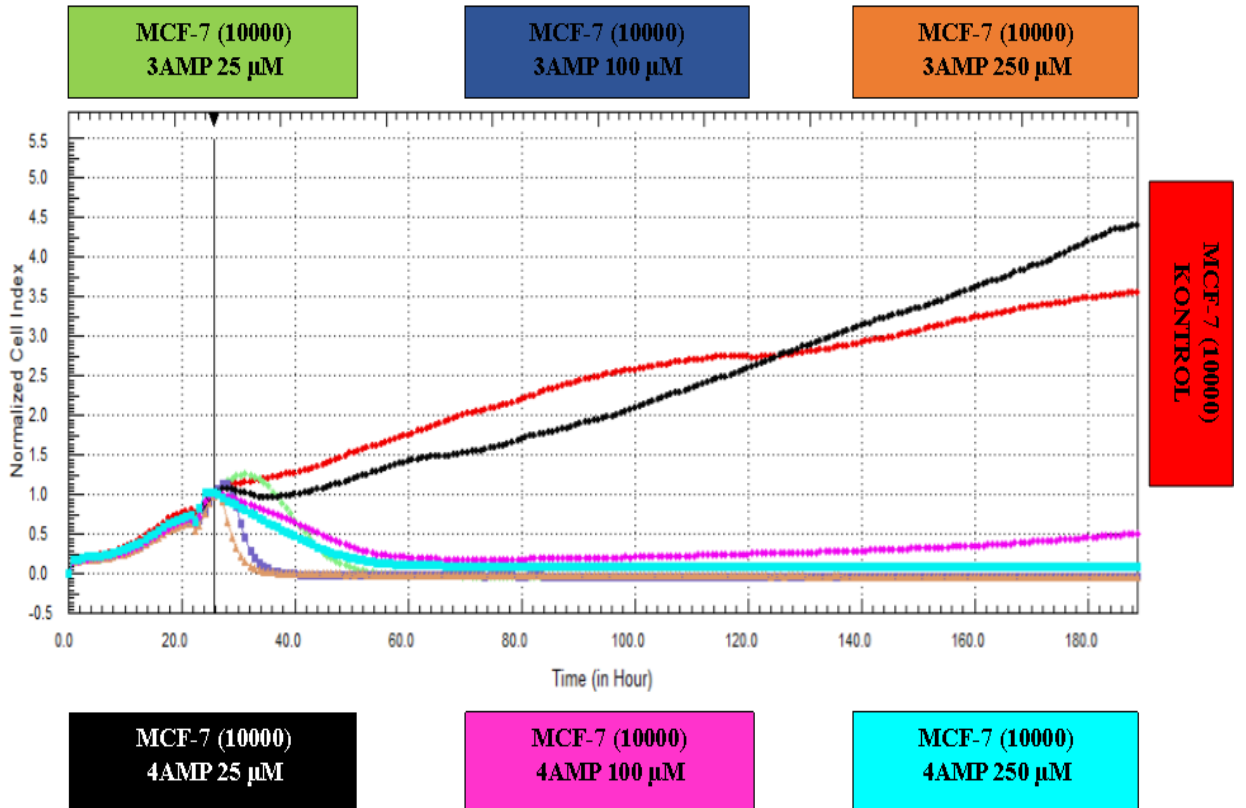


**Şekil 3.19.** MCF-7 hücre hattı 2, 3 ve 4-AMP nanolip üzerinde  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  ve  $1 \times 10^5$  sayıda 48 saat MTT hücre canlılık grafiği

MTT hücre canlılığı için kullanılan metod olarak sonuçlarına göre 3-AMP daha yükek olduğunu gösterdi. Hücrelerde sitoplazma birleşmemiş demektedir. 2-AMP yüzeye yapışıp büyüdüğü için aktivite vermemiştir.

### 3.3.4. (xCELLigence) 2, 3 ve 4-Aminometilpridinlerin MCF-7 Hücre Hatlarına Karşı Gerçek Zamanlı Analiz Yöntemi ile Sitotoksosite Analizi

16 kuyucuklu e-plaka, 200000 hücre / ml'de bir plaka olarak MCF-7 hücreleri ile ekildi ve gece boyunca inkübe edildi. Sitotoksosite analizi için kullanılan 2,3 ve 4-Aminometilpridinlerde % 0.1 DMSO + kompleks besiyeri ile çözülmüştür. Hücre e-plakalarına 25-100-250  $\mu$ M konsantrasyonlarda maddeler ilave edildi, hücre indeksi 1'e ulaştı ve elektrotlar üzerinde yeterince büyüdü. Maddelerin hücreler üzerindeki etkisi daha sonra gerçek zamanlı olarak gözlemlendi. Hücre kontrol grubunun büyüme ve çoğalma kapasitesi dolduğunda, cihaz kapatıldı ve veriler kaydedildi.



**Şekil 3.16.** 2, 3 ve 4-Aminometilpridinlerin 16 kuyucuklu e-plakalara kuyucuk başı  $10^4$  ekilmiş MCF-7 hücresi etkisinin xCELLigence grafiği

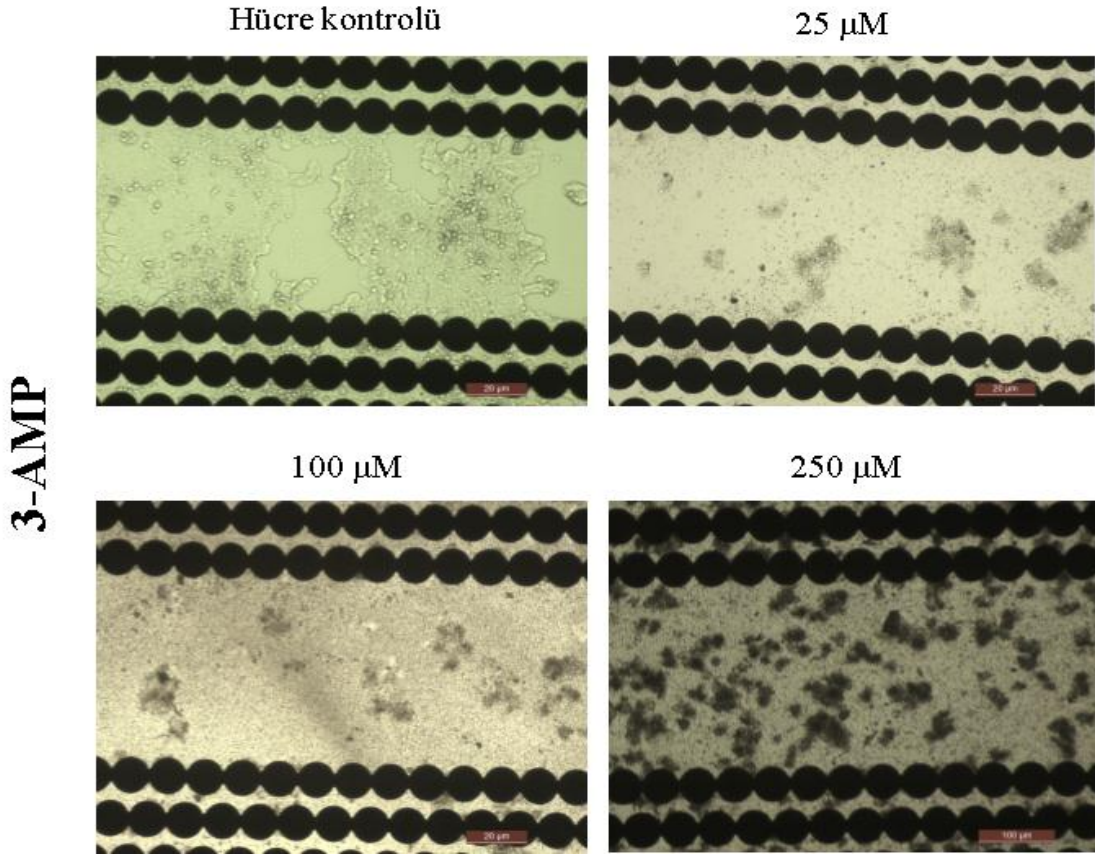
Şekil 3.16’de verilen xCELLigence grafiğine göre kullanılan 3-AMP ve 4-AMP’lerin MCF-7 hücrelerindeki etkisi 25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda yaklaşık olarak 180 saat gerçek zamanlı olarak gözlenmiştir.

Maddeler eklendikten sonra yapılan gözlemlerde 3-AMP’nin 25 $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda hücre ölümünün başlamadığı, 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda hücre ölümünün başladığı görülmektedir. 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda ise yüksek konsantrasyon kullanıldığı için hücre ölümü hızlı gerçekleşmiştir.

XTT sonuçlarıyla da desteklenen xCELLigence grafiğinde de 3-AMP’nin MCF-7 hücrelerini yaklaşık 40  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda hücre ölümü üzerinde etkilediği ve sitotoksik olduğu gözlenmiştir. 4-AMP’nin 25  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda hücreleri neredeyse hiç etkilemediği ve hücrelerin çoğalmaya devam ettiği, 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyondaysa hücrelerin ölmeye başladığı görülmektedir. 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda ise hücrelerin ölümleri hemen gerçekleşmiştir ve 180. saate kadar belli zaman aralıklarında gözlemlensede grafikteki eğride değişiklik olmamıştır. Bu nedenle 4-AMP’nin de

yaklaşık 104  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda hücre ölümü üzerine etkisi olduğu ve sitotoksik olduğu gözlenmiştir.

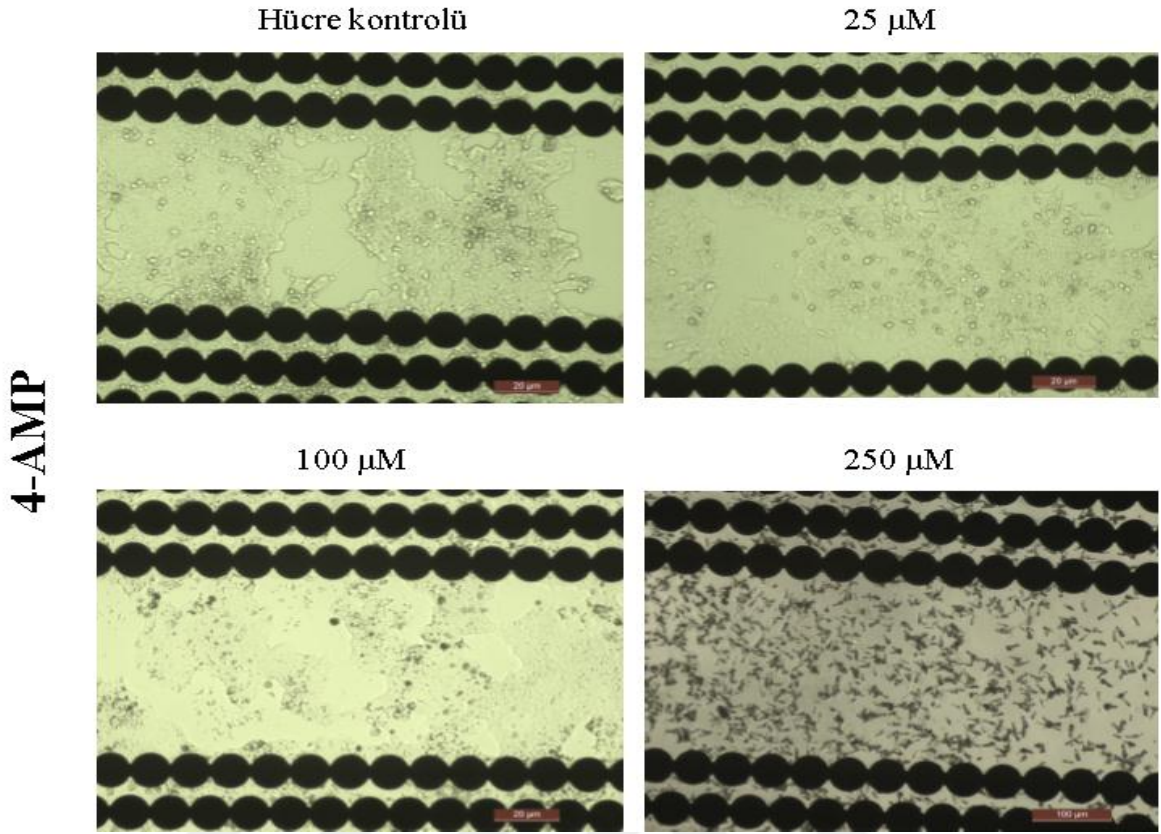
### 3.3.5. (xCELLigence) 2, 3 ve 4-Aminometilpridinlerin MCF-7 hücre hatlarına karşı gerçek zamanlı analizi kullanılarak invert mikroskop altındaki MCF-7 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi



**Şekil 3.17.** 3-Aminometilpridinlerin 16 kuyucuklu e-plakalara ekilmiş MCF-7 hücre hatlarına olan etkisinin 20  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 3.17'deki invert mikroskopik görüntülere göre hücre kontrolüyle karşılaştırıldığında 3-AMP'nin 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda tamamen öldürüldüğü görülmektedir.

Mikroskopik görüntüler, Şekil 4.16'deki XCELLigence grafiğiyle örtüşmektedir.

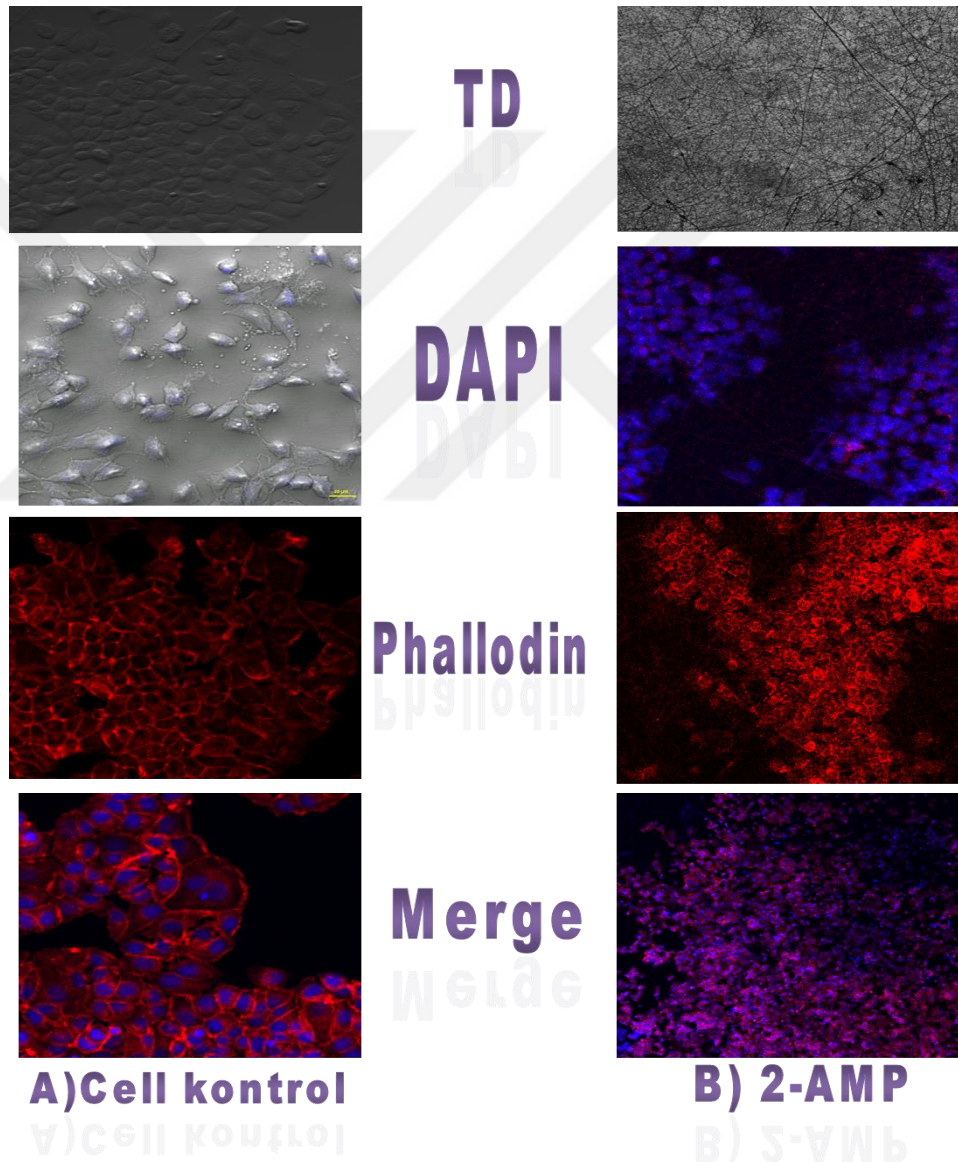


**Şekil 3.18.** 4- Aminometilpridinlerin 16 kuyucuklu e-plakalara ekilmiş MCF-7 hücre hattına olan etkisinin 20  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M ölçekli 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 4.18'deki invert mikroskopik görüntülere göre düşük konsantrasyon olan 25  $\mu$ M 'da hücre kontrolü ile karşılaştırma yapıldığında hücrelerin ölümleri üzerinde fazla etkili olmadığı görülürken, yüksek konsantrasyon olan 250  $\mu$ M'da ise tamamen etkilediği ve nerdeyse hiç canlı hücre kalmadığı gözlenmektedir ve madde tamamen ölü hücrelerin üzerini kaplamıştır, 100  $\mu$ M'da ise hücrelerin üzerinde morfolojik değişiklikleri meydana getirerek hücre ölümlerinin başladığı görülmektedir. Şekil 4.16'deki XCELLigence grafiğiyle de mikroskopik görüntüler uyumlu görünmektedir.

### 3.4. Lazer Konfokal Mikroskobu Sonucu

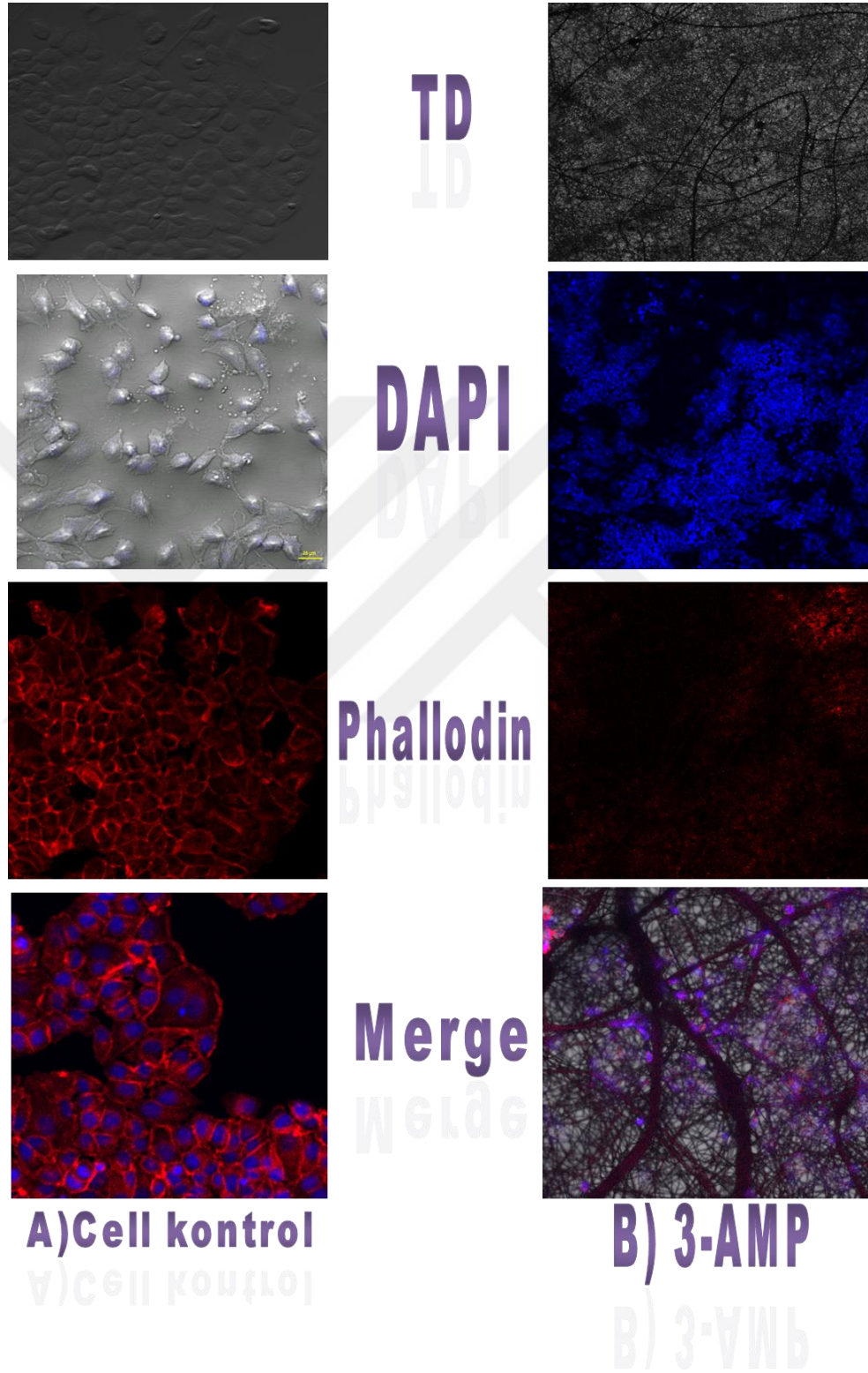
MCF-7 hücrelerinin ekimi yapılarak 2, 3 ve 4-Aminometilpridin nanolif yüzeylerin üzerinde hücreler  $1 \times 10^5$  kuyucuk başı sayımında olarak 48 saat etüvde bekletirildi. Sonra konfokal lazer taramalı mikroskobu ile morfolojisinin incelenmesi için hücre çekirdekleri ve iskeleleri yıkamalar ve boyamalı yapıldı. Lazer konfokal mikroskop kullanılarak MCF-7 hücre organellerinin 488 ve 635 nm dalga boylarında görüntülendi (şekil 3.19) (şekil 3.20) (şekil 3.21)



**Şekil 3.19.**  $1 \times 10^5$  MCF-7 hücrelerinin 2-AMP nanolifi üzerinde 48 saat sonra konfokal görüntüleri.

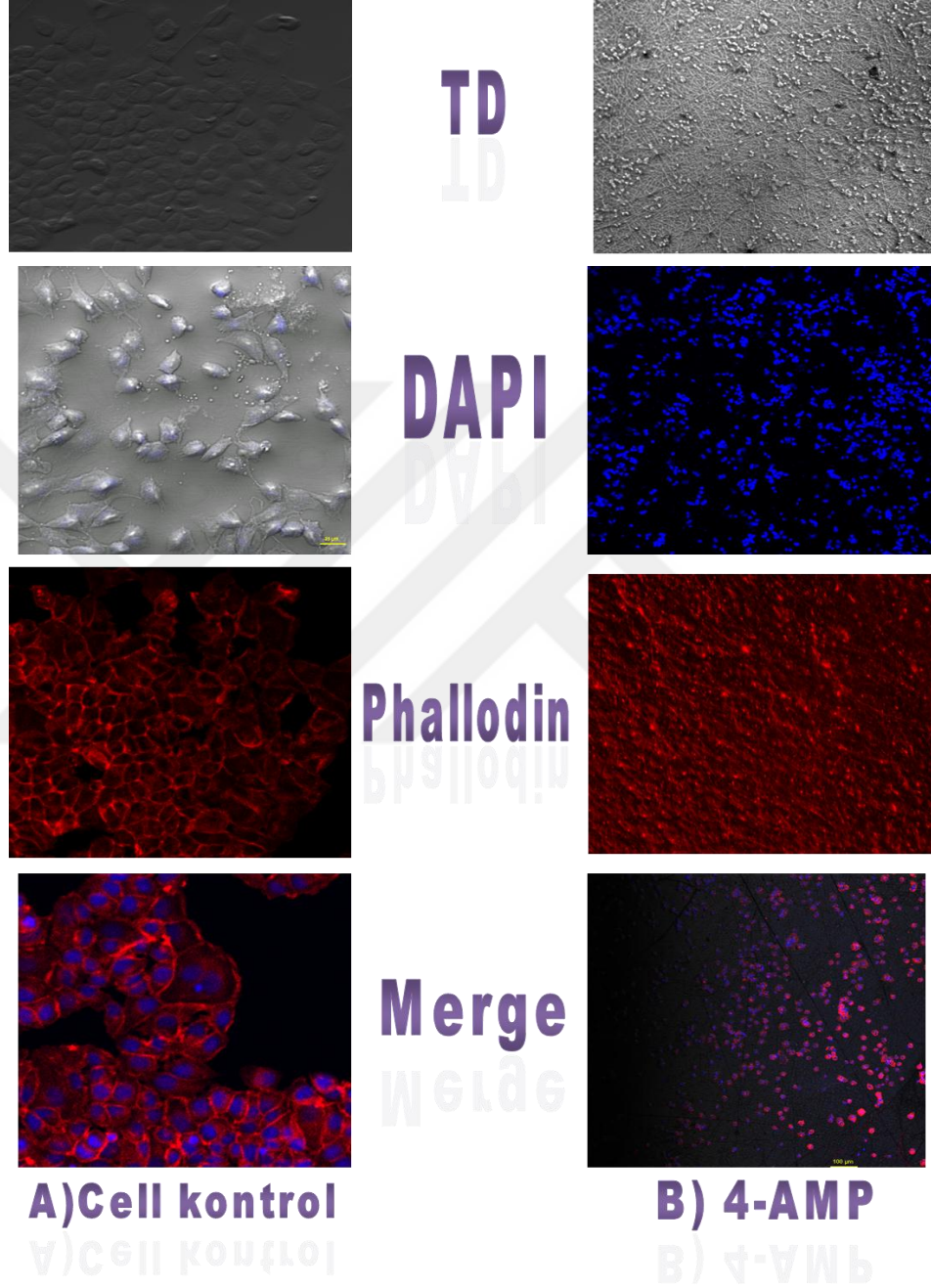
Şekil 3.19'deki konfokal görüntülere göre MCF-7 hücreleri receptor ile bağlandığı için 2-AMP fiberleri üzerine hücreler büyümüş yayılmışlardır. Hücre

yayılması farklılaşmaya başlamak demektir, 2-AMP nanolifler üzerinde MCF-7 hücre çekirdeğinin hacim büyüklüğünü ve hücreler arası iskelet bağlantılarının devam etmesi gözlemlendi.



**Şekil 3.20.**  $1 \times 10^5$  MCF-7 hücrelerinin 3-AMP nanolifi üzerinde 48 saat sonra konfokal görüntüleri.

Şekil 3.20'deki görüntülere göre MCF-7 hücre hattı 3-AMP nanoliflere tutulup ve üst üste çoğalıp yayılmamış (Farkılaşmamış), çekirdek hacimi küçük ve hücreler arası iskelet bağlantıları devam etmemesi gözlemlendi,

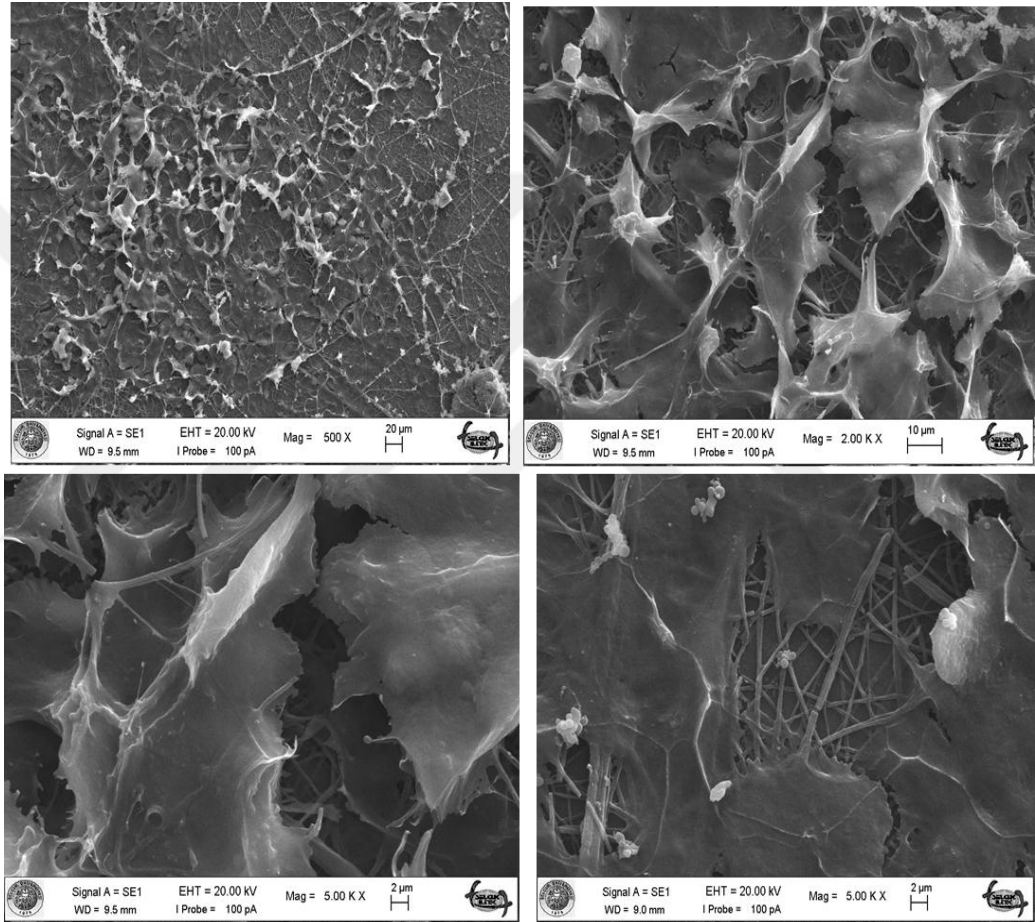


Şekil 3.21.  $1 \times 10^5$  MCF-7 hücrelerinin 4-AMP nanolifi üzerinde 48 saat sonra konfokal görüntüleri.

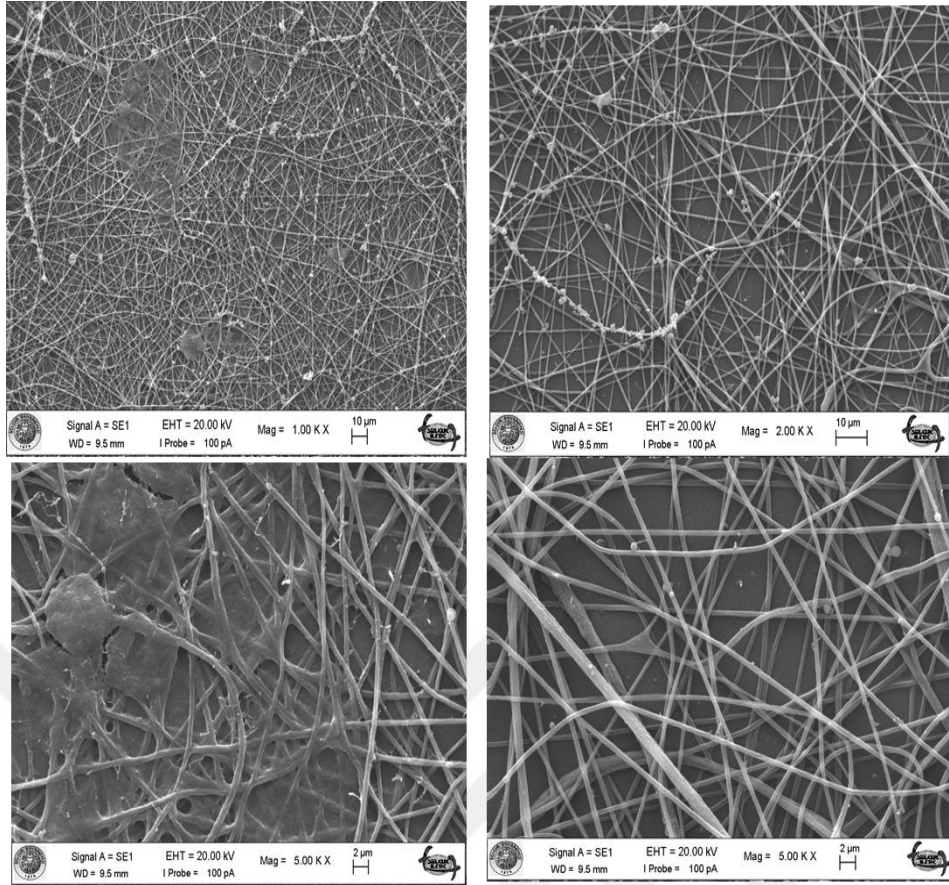
Şekil 3.21'deki konfokal görüntülere göre MCF-7 hücrelerinin 4-AMP nanolifleri üzerinde morfoloji değişimi ve yayılması gözlemlendi.

### 3.5. 2, 3 ve 4-AMP Nanolifelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Sonucu

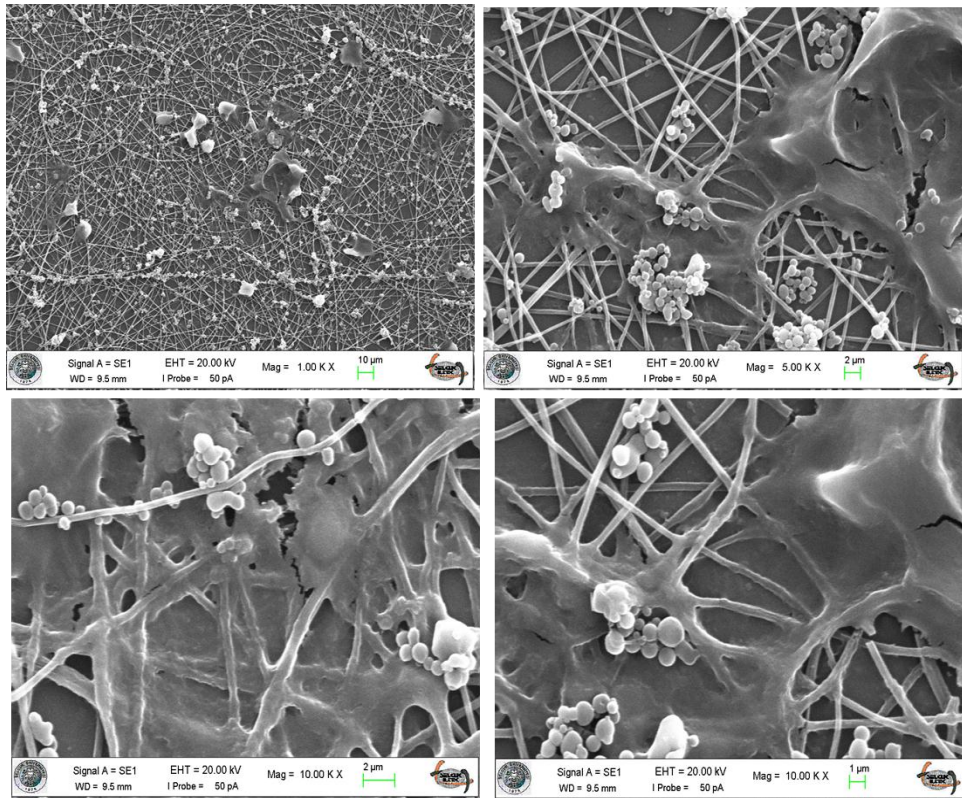
24 kuyucuklu plakaya ekilmiş 2, 3 ve 4-Aminometilpridin fiberlerinin üzerine  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olarak 48 saat inkübatörde bekletirildi. SEM analizi için yıkamalar yapıldı ve sonrasında nanolifler 5 nm AuPd ile kaplandı. Daha sonra nanolifler, SEM ile incelenip yüzeyde tutunup çoğalan hücreler 250X, 100X, 200X, 1000X büyütmelemlerde görüntülendi ve hücrelerin nanolif üzerinde yayılması gözlemlendi (şekil 3.22) (şekil 3.23) ((şekil 3.24)



**Şekil 3.22.** MCF-7  $1 \times 10^5$  ekilen hücresinin, 2-Aminometilpridin nanolifin üzerinde proliferasyonunun taramalı elektron mikroskobu (250X, 100X, 200X, 1000X) görüntüleri.



Şekil 3.23. MCF-7  $1 \times 10^5$  ekilen hücresinin 3-Aminometilpridin nanolifin üzerinde proliferasyonunun taramalı elektron mikroskobu (250X, 100X, 200X,1000X) büyütmelerde görüntüleri.



Şekil 3.24. MCF-7  $1 \times 10^5$  ekilen hücresinin 4-Aminometilpridin nanolifin üzerinde proliferasyonunun taramalı elektron mikroskobu (250X, 100X, 200X,1000X) büyütmelerde görüntüleri.

2, 3 ve 4-AMP nanolif iskeleleri üzerinde MCF-7  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olarak 48 saatten sonra ekilen hücre hattı hücrelerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM, S-3000N; Hitachi, Tokyo, Japan) ile incelendi.

MCF-7 hücrelerin 2 ve 4-AMP nanolifi üzerinde çoğalması ve yayılması gözlenmiştir, fakat hücreler 3-AMP fiberleri üzerinde bu yayılda gözlenmedi.

Müslüm ve ark. (2018) Çalışmalarında kaliks[4]aren türevlerini 2.3 ve 4-aminometilpridinm kullanarak hücresel etkileri değerlendirmişlerdir. Kolorektal adenokarsinoma (Caco-2) hücre hattı üzerinde 96 kuyucuklu plakalarda yaptıkları deneyler ile kaliks[4]aren türevlerinin  $500 \mu\text{M}$ 'deki Caco-2 hücre canlılığını etkileyen 2-AMP'de % 52, 3-AMP'de % 33 ve 4-AMP'de % 47.5 olarak bulmuşlar. 2, 3 ve 4-AMP nanolif yüzeyinde Caco-2 hücrelerinin büyümeleri ise 2-AMP'de % 33.8, 3-AMP'de % 64.79, 4-AMP'de % 49.29 olduğunu analiz etmişler. Caco-2 hücre hattı için kaliks[4]aren türevli nanolifler de 3B hücre kültürleri için ideal platformlar olduğunu belirlemişlerdir. Caco-2 hücre hattı en benimsediği 3-AMP'dir ve hücre canlılığını arttırmaktadır. Çünkü 3-AMP hücrenin ECM matrisine benzer bir ortam oluşturmaya izin vermiştir. Anti-kanser olarak etkilerinde de kaliks[4]aren türevi bileşikler çok başarılıdır. Bunlar içerisinde Caco-2 hücresinin ölümüne en etkili olan anti-kanser ilaç olarak 4-AMP olduğunu belirlemişlerdir.

Zuhair ve ark. (2019) insan gingival fibroblast (HGF-1) Hücre hattı yara iyileşmesi için 2, 3 ve 4-AMP kaliks[4]aren türevlilerinden üretilen nanolifler hücre kültürleri için kullanmışlar ve bu türevliler arasında HGF-1 hücresinin canlılığını artarak en benimsediği 2-AMP, HGF-1 hücresinin ölümüne en etkili olan anti-iyileşme olarak 4-AMP olduğunu bulmuşlar. Çünkü 2-AMP hücrenin doğal ECM matrisine ve hücre hareketliliğini destekleyen benzer bir ortam oluşturmaya izin vermiştir. Fakat çalışma boyunca 2-AMP nanolif yüzeylerine hiç bir büyüme faktörü eklemeyen bu yüzeylerde HGF-1 hücrelerinin çoğalma ve yayılmaları görülmüştü. Bizde araştırmamızda kullandığımız türevlendirilmiş haldeki kaliksaren maddelerin insan meme kanseri (MCF-7) hücreleri üzerine pasif hedefleme yapılarak etkili sitotoksiste gösterdiğini ve güvenli bir antikanser ajanı olabileceğini belirledik ve bu iki çalışma bizim çalışmamızı destekliyor.

## 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 4.1. Sonuçlar

Çalışmamızda, MCF-7 hücrelerini içeren 96 kuyucuklu plakalara, farklı fonksiyonel gruplara (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) sahip *p-ter*-butil-kaliks [4] aren bileşikleri değişik konsantrasyonlarda ilave edildi ve 24 saat süreyle inkübe edildi. Bu maddenin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi mikroskop altında incelenmiş ve konsantrasyonları arttıkça hücrelerin morfolojik özelliklerinde değişikliklerin arttığı gözlenmiştir.

Düşük konsantrasyonlarda daha yuvarlak hale getirilerek hücre yapılarının ölmeye başladığı görülmüştür. 250 ve 500  $\mu\text{M}$  yüksek konsantrasyonlarda, hücrelerin tamamına yakını ölmüştür. XTT sonuçlarından elde edilen sonuçlara göre, MCF-7 hücrelerinde kullanılan en düşük 3-AMP ve 4-AMP dozlarında bile hücrelerin yaşama kabiliyeti % 50'nin altına düşmüştür, ancak en yüksek 2-AMP dozunda yaşama kabiliyeti bile % 50'nin altına düşmemiştir.

XCELLigence hücre analiz sistemi, gerçek zamanlı elektriksel iç direnç kullanarak hücre proliferasyonu, hücre göçü, morfoloji değişikliği ve hücre istilası gibi hücrelerde fenotipik değişiklikler ölçülerek hücre hareketlerinin izlenmesine izin verir.

3-AMP ve 4-AMP'lerin MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi, 25, 100 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda değerlendirildi ve yaklaşık 180 saat boyunca gerçek zamanlı olarak gözlemlendi.

Maddelerin eklenmesinden sonra MCF-7 hücreleri üzerindeki etkiye bakıldığında, maddenin konsantrasyonu grafikteki 25. saatten itibaren değişmiştir. Grafikte 3-AMP'nin konsantrasyon aralığında 25 ila 100  $\mu\text{M}$  arasında bir azalma oldu. 4-AMP'de, 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonundan sonra grafik eğrisi azaldı.

Bu sonuçlara göre, kaliks [4], piridinyum grubunu 25 ila 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyon aralığında değiştirerek gösterilen tercih edilen sitotoksisiteyi artırarak MCF-7 meme kanseri hücreleri ile başarılı antikanser etkisini göstermiştir. Piridinyum grubu 3 pozisyonunda bulunan bileşik, 2 ve 4 pozisyonlarından daha sitotoksik görünüyör.

Elektrodöndürme ile oluşturulan NFS, gözeneklidir ve mekanik özellikleri hücrelerin yönlendirilmesinde ve desteklenmesinde avantajlarını göstermektedir.

Çalışmamızda, 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP kaliks [4] aren türevli nanolif yüzeyler 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiş ve MCF-7 hücre morfolojisini araştırmak için hem çekirdekler hem de iskeletler boyanmıştır.

Konfokal görüntünün bir sonucu olarak, 2-AMP nanoliflerin yüzeylerinde hücre çekirdeğinin hacim büyüklüğü gözlendi ve hücreler arasındaki iskelet bağlantıları nanolif yüzeyine yayıldı.

3-AMP nanolifinde, hücre çekirdeği daha küçük bir hacimde bulundu, hücreler bölündü, ancak süreksizlik ve hücreler arasında farklılaşma gözlendi.

4-AMP nanolifinde hücrelerin ölüme ve morfolojik bozukluklara duyarlı olduğu görülmüştür.

Yine çalışmamızda, 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP nanolif yüzeyleri MCF-7 hücresinin çoğaltılması için 24 oyuklu plakalarda kültürlendi. Bu numunelerin 5nm AuPd ile kaplanması, elektron mikroskobu (SEM) taranarak görselleştirildi.

SEM görüntülerinin bir sonucu olarak, hücrelerin 2-AMP nanolif yüzeylerinde lifler yönünde çoğaldığını, yayıldığını ve uzadığını gözlemledik.

2-AMP, 3D yüzey formuna benzer özellikler gösterir ve bu nedenle MCF-7 hücresi, 3D ortamındakilere benzer morfolojik özellikler gösterir; 3-AMP, hücre proliferasyonunda nanolif, ancak büyümeyizler; 4-AMP nanolifinde 2-AMP ile aynı sonuçlar gözlendi.

## 4.2. Öneriler

Meme tiplerinin alt tipleri, moleküler imzası ve mutasyon durumuna bağılı olarak yönetilmesi için çeşitli terapötik girişimler geliştirilmiştir. Bununla birlikte tedavi yöntemlerine edinilmiş direnç, antikanser tedavisi için büyük yüzleşmeler yaratır ve tümör nüksünü kolaylaştırır.

Bu artışla birlikte kanser hastalarına daha az zarar verebilecek çeşitli çözümler geliştirilmiştir. Bu çözüm önerilerinden biri, in vivo ortamın mümkün olan en düşük seviyeye yönlendirilmesine izin veren ex vivo 3D nano iskelelerdir.

Farklı yüzey modifikasyon alternatifleri olan kaliks [4] aren nanolifler, epitel hücrelerinin in vitro yapışma ve çoğalmasını destekler ve daha iyi platformlar sağlayabilirler.

Bu fiberlerin in vivo olarak kullanılabileceğini öngörebiliyoruz, çünkü bu 3D nanoliflerin geliştirilmesi, in vivo ortama benzer normal dokuları taklit ederek hücre çoğalmasına ve farklılaşmasına izin verir.

## KAYNAKLAR

- Ablett, M.P. , Singh, J.K.; Clarke, R.B., 2012, Stem cells in breast tumours: Are they ready for the clinic? *Eur. J. Cancer*, 48, 2104–2116. [CrossRef] [PubMed]
- Ablett, M.P., O’Brien, C.S., Sims, A.H., Farnie, G., Clarke, R.B., 2014, A differential role for CXCR4 in the regulation of normal versus malignant breast stem cell activity. *Oncotarget* 5, 599–612. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1169>.
- Acar, A., Simões, B.M., Clarke, R.B., Brennan, K., 2016, A role for notch signalling in breast cancer and endocrine resistance. *Stem Cells Int.* 2498764. <https://doi.org/10.1155/2016/2498764>.
- Ahmad, A., Shakoory, A.R., 2013, Cytotoxic and Genotoxic effects of Arsenic and Lead on Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells (AMSCs). *Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine*, 9(2), 29-36.
- Albini, A., Bruno, A., Gallo, C., Pajardi, G., Noonan, D.M., Dallaglio, K., 2015, Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity. *Connect. Tissue Res.* 56, 414–425. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1066780>.
- Alferez, D.G.; Simoes, B.M.; Howell, S.J.; Clarke, R.B., 2018, The Role of Steroid Hormones in Breast and Effects on Cancer Stem Cells. *Curr. Stem Cell Rep*, 4, 81–94. [CrossRef] [PubMed]
- Al-Hajj, M.; Wicha, M.S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F., 2003, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3983–3988. [CrossRef] [PubMed]
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., Seed, B., 1990, CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303–1313. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90694-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90694-A).
- B.J. Kang,, H. Kim, S.K. Lee, J. Kim, Y. Shen, S. Jung, K.S. Kang, S.G. Im, S.Y. Lee, Choi, N.S. Hwang and J.Y. Cho., 2014, // *Acta Biomaterialia* 3007.
- Baggetto L.G., Coleman W.A., Lazar A.N., Magnard S., Michaud M.H., 2010, Calixarene Derivatives as Anticancer Agent., *US Patent 20100056482 A1*, March 4.
- Balaji, K., 2016, Subramanian, B., Yadav, P., Radha, C.A., Ramasubramanian, V., 2016, Radiation therapy for breast cancer: literature review. *Med. Dosim.* 41, 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.meddos.06.005>.
- Begnini, K. R., Duarte, W. R., da Silva, L. P., Buss, J. H., Goldani, B. S., Fronza, M., Segatto, N. V., Alves, D., Savegnago, L., Seixas, F. K. ve Collares, T., 2017, Apoptosis induction by 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer cells, *Biomed Pharmacother*, 91, 510-516.

- Bhola, N.E.; Jansen, V.M.; Koch, J.P.; Li, H.; Formisano, L.; Williams, J.A.; Grandis, J.R.; Arteaga, C.L., 2016, Treatment of Triple-Negative Breast Cancer with TORC1/2 Inhibitors Sustains a Drug-Resistant and Notch-Dependent Cancer Stem Cell Population. *Cancer Res.* 76, 440–452. [CrossRef] [PubMed]
- Bonnet, D.; Dick, J.E., 1997, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.*, 3, 730–737. [CrossRef] [PubMed]
- Breslin S., O'Driscoll L., 2013, Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 18: 240-249,.
- Briscoe, J., Théron, P.P., 2013, The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 416–429. <https://doi.org/10.1038/nrm3598>.
- Burdon, T., Smith, A., Savatier, P., 2002, Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Cell Biol.* 12 (02), 432–438. <https://doi.org/10.1016/S0962-8924.02352-8>.
- Butti, R., (2015), Ghosh, P., Totakura, K.V.S., Venkata, N.N.R., Nimma, R., Kundu, G.C., Role of osteopontin in tumor microenvironment: a new paradigm in cancer therapy. In multi-targeted approach to treatment of cancer. *Adis, Cham.* 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016>.
- Butti, R., Das, S., Gunasekaran, V.P., Yadav, A.S., Kumar, D., Kundu, G.C., 2018, Receptor 645. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1655-5>.
- Chaffer, C.L. Marjanovic, N.D.; Lee, T.; Bell, G.; Kleer, C.G.; Reinhardt, F.; D'Alessio, A.C.; Young, R.A.; Weinberg, R.A., 2013, Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell*, 154, 61–74. [CrossRef] [PubMed]
- Charafe-Jauffret, E. Ginestier, C.; Iovino, F.; Tarpin, C.; Diebel, M.; Esterni, B.; Houvenaeghel, G.; Extra, J.M.; Bertucci, F.; Jacquemier, J.; 2010, Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 45–55. [CrossRef] [PubMed]
- Chen L, Xiao Z, Meng Y, Zhao Y, Han J, Su G, Chen B and Dai J.; 2012, The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials* 33: 1437-1444,
- Chillakuri, C.R., Sheppard, D., Lea, S.M., Handford, P.A., 2012, Notch receptor–ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.01.009>.
- Cree IA, Glaysher S and Harvey AL., 2010, Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Curr Opin Pharmacol* 10: 375-379,.

- Çiçek, C., Bilgiç, A., **2006**, Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı. *İnfeksiyon Dergisi*; 20 (3): 231-241.
- D. Steffens., M. Lersch, A. Rosa, C. Scher, T. Crestani, M.G. Morais, J.A. Costa and P. Pranke., 2013, // J. Biomed. Nanotechnol. 9 710.
- Da Silva, E., Lazar, A. N. ve Coleman, A. W., 2004, Biopharmaceutical applications of calixarenes, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14 (1), 3-20.
- DeBeça, F.F., Caetano, P., Gerhard, R., Alvarenga, C.A., Gomes, M., Paredes, J., Schmitt, F., 2013, Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J. Clin. Pathol.* 66, 187–191.  
<https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201169>.
- Dersch, R., Greiner, A.,Wendorff, J. H., 2004, Polymer Nanofibers Prepared by Electrospinning. Ed Schwarz, J. A. ve Contescu, C. I. Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology- Six Volume Set, Marburg, Germany.
- Desrochers TM., Palma E and Kaplan DL., 2014, Tissue-engineered kidney disease models. *Adv Drug Deliv Rev* 69-70: 67-80,.
- DeVita Jr., Vincent T., and Steven A. Rosenberg., 2012, “Two Hundred Years of Cancer Research.”*New England Journal of Medicine*, v. 366/23
- Dhiman HK., Ray AR and Panda AK., 2005, Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials* 26: 979-986,
- Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., Joshua, B., 2009, Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 458, 780–783.  
<https://doi.org/10.1038/nature07733>.
- Dontu, G., Abdallah, W.M.; Foley, J.M.; Jackson, K.W.; Clarke, M.F.; Kawamura, M.J.; Wicha, M.S., 2003, In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.*, 17, 1253–1270. [CrossRef] [PubMed]
- Dontu, G., Jackson, K.W.; McNicholas, E.; Kawamura, M.J.; Abdallah, W.M.; Wicha, M.S., 2004, Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res*, 6, R605–R615. [CrossRef] [PubMed]
- Duhachek-Muggy, S., Qi, Y., Wise, R., Alyahya, L., Li, H., Hodge, J., Zolkiewska, A., 2017, Metalloprotease-disintegrin ADAM12 actively promotes the stem cell-like phenotype in claudin-low breast cancer. *Mol. Cancer* 16, 32.  
<https://doi.org/10.1186/s12943-017-0599-6>.
- Dunne LW., Huang Z, Meng W, Fan X, Zhang N, Zhang Q and An Z., 2014, Human decellularized adipose tissue scaffold as a model for breast cancer cell growth and drug treatments. *Biomaterials* 35: 4940-4949,.

- Durand RE Sutherland RM.; 1972, Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exp Cell Res* 71: 75-80,.
- Duru, N., Fan, M., Candas, D., Mena, C., Liu, H.C., Nantajit, D., Wen, Y., Xiao, K., Eldridge, A., Chromy, B.A., Li, S., 2012, HER2-associated radioresistance of breast cancer stem cells isolated from HER2-negative breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 18, 6634–6647. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1436>.
- E. Seyedjafari., M. Soleimani, N. Ghaemi M.N. Sarbolouki., 2011, // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 165.
- Economopoulou, P., Kaklamani, V.G., Siziopikou, K., 2012, The role of Cancer stem cells in breast Cancer initiation and progression: potential Cancer stem cell-directed therapies. *Oncologist* 17, 1394–1401.  
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0163>.
- Edmondson R., Broglie JJ, Adcock AF, Yang L., 2014, Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell- based biosensors. *Assay and drug development Technologies* 12(4):207-18.
- Evans MJ, Kaufman MH., 1981, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*,; 292:154-156.
- F. Ajalloueian., 2014, // *Biomed. Res. Int.* [http:// dx.doi.org/10.1155/2014/475280](http://dx.doi.org/10.1155/2014/475280).
- Fagan DH, Fettig LM, Avdulov S, Beckwith H, Peterson MS, Ho YY, Wang F, Polunovsky VA, Yee D., 2017, “Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation.” *Horm Cancer*. Jun 2.
- Fernandes, A.P., Junqueira, M.A., Marques, N.C.T., Machado, M., Santos, CF., Oliveira, T.M., Sakai, V.T., 2016, Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Applied Oral Science*, 24(4), 332-337.
- Fey SJ., Wrzesinski K., 2012, Determination of drug toxicity using 3D spheroids constructed from an immortal human hepatocyte cell line. *Toxicological sciences*;127(2):403-11.
- Fitzgerald KA., Guo J, Tierney EG, Curtin CM, Malhotra M, Darcy R, O'Brien FJ and O'Driscoll CM., 2015, The use of collagen-based scaffolds to simulate prostate cancer bone metastases with potential for evaluating delivery of nanoparticulate gene therapeutics. *Biomaterials* 66: 53-66,
- Fong EL, Lamhamedi-Cherradi SE, Burdett E, Ramamoorthy V, Lazar AJ, Kasper FK, Farach-Carson MC, Vishwamitra D, Demicco EG, Menegaz BA, et al.; 2013, Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 6500-6505,
- Friedrich J., Seidel C, Ebner R and Kunz-Schughart LA., 2009, Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4: 309-324,.

- Friedrichs, K., Ruiz, P.; Franke, F.; Gille, I.; Terpe, H.J.; Imhof, B.A., 1995, High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res.*, 55, 901–906. [PubMed]
- G. Zanatta., D. Steffens., D.I. Braghirolli., R.A. Fernandes., C.A. Netto and P. Pranke., 2012, // *Braz. Med. Biol. Res.* 45 125
- Gabrielson, J., Hart, M., Jarelöv, A., Kühn, I., McKenzie, D., Möllby, R., **2002**, Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J. Microbiol. Methods* 50, 63–73.
- Gill BJ and West JL, 2014, Modeling the tumor extracellular matrix: Tissue engineering tools repurposed towards new frontiers in cancer biology. *J Biomech* 47: 1969-1978,
- Grimshaw, M.J., Cooper, L.; Papazisis, K.; Coleman, J.A.; Bohnenkamp, H.R.; Chiapero-Stanke, L.; Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell, J.M., 2008, Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 10, R52. [CrossRef] [PubMed]
- Guo, G., Yan-Sanders, Y., Lyn-Cook, B.D., Wang, T., Tamae, D., Ogi, J., Khaletskiy, A., Li, Z., Weydert, C., Longmate, J.A., Huang, T.T., 2003, Manganese superoxide dis- mutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2362–2378.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2362-2378.2003>.
- Gutsche, C.D., 1998, *Calixarene Revisited*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- H.K. Kleinman ve G.R. Martin., 2005, // *Seminars in Cancer Biology* 15 378.
- Hashemi, E., Akhavan O., Shamsara, M., Daliri, M., Dashtizad, M., Farmany., 2016, A. Synthesis and cyto-genotoxicity evaluation of graphene on micespermatogonial stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1(146), 770-776.
- Hong Fang Lu., Karthikeyan Narayanan, Sze- Xian Lim, Shujun Gao, Meng Fatt Leong and Andrew C.A. Wan., 2012, // *Biomaterials* 33 2419.
- Herschkowitz, J.I.; Simin, K.; Weigman, V.J.; Mikaelian, I.; Usary, J.; Hu, Z.; Rasmussen, K.E.; Jones, L.P.; Assefnia, S.; Chandrasekharan, S.; et al., 2007, Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*, 8, R76. [CrossRef] [PubMed]
- Hu, J., Li, G., Zhang, P., Zhuang, X., Hu, G., 2017, A CD44v+ subpopulation of breast cancer stem-like cells with enhanced lung metastasis capacity. *Cell Death Dis.* 8, e2679. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.72>.

- Hutmacher DW, 2010, Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nat Mater* 9: 90-93,.
- J James A., 1998, Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall and Jeffrey M. Jones // *Science* 282 5391.
- J. Xie., N. Havlioglu, S.E. Sakiyama-Elbert, M.J.Silva,Y.Xia,R.H.Gelbermanand S. Thomopoulos, ., 2013, // *Acta Biomater.* 9 6905.
- J. Zhu., Q. Cai, X. Zhang, X. Hu, L. Li, W. Wang, Z. Shao, L. Dai, L. Cheng, X. Yang, C. Zhou and Y. Ao, 2013, // *J. Biomed. Nanotechnol.* 9 1757.
- Jian Zhi Yang., Alice Lok Sze Ho, Louis Ajonuma, Sun Yee Lam, Lai Ling Tsang and Ning Tang, 2003, // *Cell Biol. Int.* 27 543.
- Jin Zhou., Ye Zhang, Qiuxia Lin, Zhiqiang Liu, Haibin Wang and Cuimi Duan, 2010, // *Journal of Genetics and Genomics* 37 451.
- K. Takahashi., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka, 2007, // *Cell* 131 861.
- Katoh, M., 2007, Networking of WNT, FGF, notch, BMP, and hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev.* 3, 30–38. <https://doi.org/10.1007/s12015-007-0006-6>.
- Ke, N., Abassi, Y., 2013, Using the Time Resolving Function of the xCELLigence System to Optimize Endpoint Viability and Cytotoxicity Assays.
- Kim, B.S., Ott, V., Boecker. A.H., Stromps, J.P., Paul, N.E., Alharbi, Z., Cakmak, E., Bernhagen, J., Bucala, R., Pallua, N., 2017, The Effect of Antiseptics on Adipose-Derived Stem Cells. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 139(3), 625-637.
- Kim, S.Y., Hong, S.H., Basse, P.H., Wu, C., Bartlett, D.L., Kwon, Y.T., Lee, Y.J., 2016, Cancer stem cells protect non- stem cells from anoikis: bystander effects. *J. Cell. Biochem.* 117, 2289–2301. <https://doi.org/10.1002/jcb.25527>.
- Kim, Y.N., Koo, K.H., Sung, J.Y., Yun, U.J., Kim, H., 2012, Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int. J. Cell Biol.*, 306879. <https://doi.org/10.1155/2012/306879>.
- Korkaya, H., Paulson, A., Iovino, F., Wicha, M.S., 2008, HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 27, 6120–6130. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.207>.
- Kriegel, C., Arrechi, A., Kit, K., McClements, D. J. ve Weiss, J., 2008, Fabrication, functionalization and supplication of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 775-797.

- Kundu B., Saha P, Datta K and Kundu SC.; 2013, A silk fibroin based hepatocarcinoma model and the assessment of the drug response in hyaluronan-binding protein 1 overexpressed HepG2 cells. *Biomaterials* 34: 9462-9474,
- Kuskov, A.N., Kulikov, P.P., Goryachaya, A.V., Tzatzarakis, M.N., Docea, A.O., Velonia, K., Shtilman, M.I., Tsatsakis, A.M., 2017, Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal, anti-inflammatory drugs: In vitro cytotoxicity and in vivo acute toxicity study. *Nanomedicine*, 13(3), 1021-1030.
- Kwon, M.J., Han, J., Seo, J.H., Song, K., Jeong, H.M., Choi, J.S., Kim, Y.J., Lee, S.H., Choi, Y.L., Shin, Y.K., 2015, CD24 overexpression is associated with poor prognosis in luminal A and triple-negative breast cancer. *PLoS One* 10, e0139112. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0139112](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139112).
- L.Y. Yap., J. Li, I.Y. Phang, L.T. Ong, J.Z. Ow, J.C. Goh, V. Nurcombe, J. Hobley, A.B.Choo, S.K. Oh, S.M. Cool and W.R. Birch, .,2011, // *Tissue Eng. Part C, Methods* 17 193.
- Lagadec, C., Vlashi, E.; Della Donna, L.; Dekmezian, C.; Pajonk, F., 2012, Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells*, 30, 833–844. [CrossRef] [PubMed]
- Lamb, R., Ablett, M.P., Spence, K., Landberg, G., Sims, A.H., Clarke, R.B., 2013, Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. *PLoS One* 8, e67811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067811>.
- Langhans SA., 2018, Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*;9(6):1-14.
- Lapidot, T., Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J.; Minden, M.; Paterson, B.; Caligiuri, M.A.; Dick, J.E., 1994, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367, 645–648. [CrossRef] [PubMed]
- Leem, Y., Oh, S., Kang, H.J., Kim, J.H., Yoon, J., Chang, J.S., 2016, BPA- toxicity via superoxide anion overload and a deficit in  $\beta$ -catenin signaling in human bone mesenchymal stem cells. *Environmental Toxicology*, 32(1), 344-352.
- Li Y, Laterra J., 2012, “Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes?”, *Cancer Res* Feb 1;72(3):576-80. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3070.
- Li, B., Lu, Y., Wang, H., Han, X., Mao, J., Li, J., Yu, L., Wang, B., Fan, S., Yu, X., Song, B., 2016, miR-221/222 enhance the tumorigenicity of human breast cancer stem cells via modulation of PTEN/Akt pathway. *Biomed. Pharmacother.* 79, 93–101. [https:// doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.045](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.045).

- Lindeman, G.J., Visvader, J.E., (2010). Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. *Asia-Pac. J. Clin. Oncol.* 6, 89–97. <https://doi.org/10.1111/j.1743-7563.2010.01279.x>.
- Ling, L.J., Wang, S., Liu, X.A., Shen, E.C., Ding, Q., Lu, C., Xu, J., Cao, Q.H., Zhu, H.Q., Wang, F., 2008 , A novel mouse model of human breast cancer stem-like cells with high CD44+ CD24-/lower phenotype metastasis to human bone. *Chin. Med. J.* 121, 1980–1986 <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.009>.
- Liu, M., Liu, Y.; Deng, L.; Wang, D.; He, X.; Zhou, L.; Wicha, M.S.; Bai, F.; Liu, S., 2018, Transcriptional profiles of different states of cancer stem cells in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer*, 17, 65. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., Martin-Trevino, R., Shang, L., McDermott, S.P., Landis, M.D., Hong, S., 2013a, Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Rep.* 2, 78–91. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.009>.
- Liu, S., Cong, Y.; Wang, D.; Sun, Y.; Deng, L.; Liu, Y.; Martin-Trevino, R.; Shang, L.; McDermott, S.P.; Landis, M.D.; et al., 2014, Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Rep.*, 2, 78–91. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, T.J., Sun, B.C., Zhao, X.L., Zhao, X.M., Sun, T., Gu, Q., Yao, Z., Dong, X.Y., Zhao, N., Liu, N., 2013b, CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene* 32, 544–653. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.85>.
- Lo, P.K., Kanojia, D., Liu, X., Singh, U.P., Berger, F.G., Wang, Q., Chen, H., 2012, CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin–TGFβ signaling. *Oncogene* 31, 2614–2626. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.439>.
- Loessner D, Rizzi SC, Stok KS, Fuehrmann T, Hollier B, Magdolen V, Hutmacher DW and Clements JA, 2013, A bioengineered 3D ovarian cancer model for the assessment of peptidase-mediated enhancement of spheroid growth and intraperitoneal spread. *Biomaterials* 34: 7389-7400,
- Lombardo, Y., de Giorgio, A.; Coombes, C.R.; Stebbing, J.; Castellano, L., 2015, Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *J. Vis. Exp.*, 97. [CrossRef] [PubMed]
- Luca AC., Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer KL, et al., 2013, Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One*;8:e59689.
- Lv D, Yu SC, Ping YF, Wu H, Zhao X, Zhang H, Cui Y, Chen B, Zhang X, Dai J, et al., 2016, A three-dimensional collagen scaffold cell culture system for screening anti-glioma therapeutics. *Oncotarget* 7: 56904-56914,.

- M. Soleimani., B. Kazemi, S. Nadri, S. Yazdani and M. B. Eeslaminejad., 2013, // Mol. Biol. Rep. 40 3883.
- M. Soleimani., E. Seyedjafari, I. Shabani and V. Haddadi-Asl., 2009, // Biochem. Biophys. Res. Commun. 382, 129.
- Ma NK, Lim JK, Leong MF, Sandanaraj E, Ang BT, Tang C and Wan AC., 2016 Collaboration of 3D context and extracellular matrix in the development of glioma stemness in a 3D model. *Biomaterials* 78: 62-73,
- MacDonald, B.T., He, X.,(2012),. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Bio.* 14, a007880. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007880>.
- Magoulas, G. E., Tsigkou, T., Skondra, L., Lamprou, M., Tsoukala, P., Kokkinogouli, V., Pantazaka, E., Papaioannou, D., Athanassopoulos, C. M. ve Papadimitriou, E., 2017, Synthesis of nomicronvel artemisinin dimers with polyamine linkers and evaluation of their potential as anticancer agents, *Bioorg Med Chem*, 25 (14), 3756-3767.
- Maguire SL, Peck B, Wai PT, Campbell J, Barker H, Gulati A, Daley F, Vyse S, Huang P, Lord CJ, et al.; 2016, Three-dimensional modelling identifies novel genetic dependencies associated with breast cancer progression in the isogenic MCF10 model. *J Pathol* 240: 315-328, 201
- Malcolm K., Horne, David R. Nisbet, John S. Forsythe and Clare L. Parish., 2010, // Stem Cells and Development 19 843.
- Miller, T.E., Ghoshal, K., Ramaswamy, B., Roy, S., Datta, J., Shapiro, C.L., Jacob, S., Majumder, S., 2008, MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J. Biol. Chem.* 283, 29897–29903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804612200>.
- Moreb, J.S., Ucar, D.; Han, S.; Amory, J.K.; Goldstein, A.S.; Ostmark, B.; Chang, L.J., 2012, The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem. Biol. Interact.*, 195, 52–60. [CrossRef] [PubMed]
- Munson JM, Bellamkonda RV and Swartz MA.; 2013, Interstitial flow in a 3D microenvironment increases glioma invasion by a CXCR4-dependent mechanism. *Cancer Res* 73: 1536-1546,
- NCI, 2018, (National Cancer Institute). Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program. Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> (accessed on 27 May 2018).
- Nimse, S. B. ve Kim, T., 2013, Biological applications of functionalized calixarenes, *Chem Soc Rev*, 42 (1), 366-386.

- Parajuli, B., Fishel, M.L., Hurley, T.D., 2014,. Selective ALDH3A1 inhibition by benzimi- dazole analogues increase mafosfamide sensitivity in cancer cells. *J. Med. Chem.* 57, 449–461. <https://doi.org/10.1021/jm401508p>.
- Pedron S, Becka E., Harley BA:, 2013, Regulation of glioma cell phenotype in 3D matrices by hyaluronic acid. *Biomaterials* 34: 7408-7417,.
- Perou, C.M., Sorlie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Rees, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslen, L.A.; et al., 2000, Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747–752. [CrossRef] [PubMed]
- Poli, V., Fagnocchi, L.; Fasciani, A.; Cherubini, A.; Mazzoleni, S.; Ferrillo, S.; Miluzio, A.; Gaudioso, G.; Vaira, V.; Turdo, A.; et al., 2018, MYC-driven epigenetic reprogramming favors the onset of tumorigenesis by inducing a stem cell-like state. *Nat. Commun.*, 9, 1024. [CrossRef] [PubMed]
- Ponti, D.; Costa, A.; Zaffaroni, N.; Pratesi, G.; Petrangolini, G.; Coradini, D.; Pilotti, S.; Pierotti, M.A.;, 2005, Daidone, M.G. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 65, 5506–5511. [CrossRef] [PubMed]
- Qi Xing., Caleb Vogt, Kam W. Leong and Feng Zhao, 2014, //Advanced Functional Materials 20 3027.
- Ranganathan, P., Weaver, K.L., Capobianco, A.J., 2011, Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat. Rev. Cancer* 11, 338–351. <https://doi.org/10.1038/nrc3035>.
- Reya, T., Clevers, H., 2005, Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature03319>.
- Rios, A.C., Fu, N.Y.; Lindeman, G.J.; Visvader, J.E., 2014, In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature*, 506, 322–327. [CrossRef] [PubMed]
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L., **1991**, An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilising the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 142, 257–265.
- Russell WMS., Burch RL:, 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen, London,
- S.M. Hashemi., S. Soudi, I. Shabani, M. Naderi and M. Soleimani., 2011, // Biomaterials 32 7363.
- Santos, D., Medeiros-Silva, J., Cegonho, S., Alves, E., Ramilo-Gomes, F., Santos, A. O., Silvestre, S. ve Cruz, C., 2015, Cell proliferation effects of calix[4]arene derivatives, *Tetrahedron*, 71 (40), 7593-7599.
- Sayin, S., Ozcan, F. ve Yilmaz, M., 2011, Preparation and Application of Calix[4]arene Derivatives Bearing Pyridinium Units-Grafted Magnetite Nanoparticles for

Removal of Dichromate and Arsenate Anions, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 48 (5), 365-372.

- Schäck, L.M., Buettner, M., Wirth, A., Neunaber, C., Krettek, C., Hoffmann, A., Noack, S., 2016, Expression of CD24 in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells is regulated by TGF $\beta$ 3 and induces a myofibroblast-like genotype. *Stem Cells Int.* 2016, 1319578.  
<https://doi.org/10.1155/2016/1319578>.
- Senbanjo, L.T., Chellaiah, M.A., 2017, CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>.
- Sha H., Zou Z, Xin K, Bian X, Cai X, Lu W, Chen J, Chen G, Huang L, Blair AM, et al.; 2015, Tumor-penetrating peptide fused EGFR single-domain antibody enhances cancer drug penetration into 3D multicellular spheroids and facilitates effective gastric cancer therapy. *J Control Release* 200: 188-200,
- Shea, M.P., O'Leary, K.A., Fakhraldeen, S.A., Goffin, V., Friedl, A., Wisinski, K.B., Alexander, C.M., Schuler, L.A., 2018, Anti-estrogen therapy increases plasticity and cancer stemness of prolactin-induced ER $\alpha$ + mammary carcinomas. *Cancer Res.* 78, 1672–1684. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0985>.
- Shim, Y., Song, J.M., 2015, Quantum dot nanoprobe-based high-content monitoring of notch pathway inhibition of breast cancer stem cell by capsaicin. *Mol. Cell Probes* 29, 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.09.004>.
- Shiva Irani., Mojgan Zandi, Najmeh Salamian, Seyed Mahdi Saeed, Morteza Daliri Joupari and Seyed Mohammad Atyabi, 2014, // *Polymers for Advanced Technologies* 5 DOI:10.1002/pat.3280.
- Siddharth, S., Das, S., Nayak, A., Kundu, C.N., 2016, SURVIVIN as a marker for quiescent- critical for breast cancer stem cell self-renewal and chemoresistance. *Cell Metab.* 27, 136–150. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.11.001>. e5.
- Siegel, R.L., Miller, K.D.; Jemal, A., (2016, Cancer statistics,. *CA Cancer J. Clin.* 2016, 66, 7–30. [CrossRef] [PubMed]
- Simon KA, Mosadegh B, Minn KT, Lockett MR, Mohammady MR, Boucher DM, Hall AB, Hillier SM, Udagawa T, Eustace BK and Whitesides GM.; 2016, Metabolic response of lung cancer cells to radiation in a paper-based 3D cell culture system. *Biomaterials* 95: 47-59,
- Sin, W.C.; Lim, C.L, 2017, Breast cancer stem cells-from origins to targeted therapy. *Stem Cell Investig.*, 4, 96. [CrossRef] [PubMed]
- Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, Bronk LF, Ananta JS, Mandelin J, Georgescu MM, et al.; 2010, Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol* 5: 291-296,

- Stratmann AT., Fecher D., Wangorsch G., Göttlich C., Walles T., Walles H., Dandekar T., Dandekar G and Nietzer SL.; 2014, Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model. *Mol Oncol* 8: 351-365,.
- Su J., Zhang L, Zhang W, Choi DS, Wen J, Jiang B, Chang CC and Zhou X.; 2014, Targeting the biophysical properties of the myeloma initiating cell niches: A pharmaceutical synergism analysis using multi-scale agent-based modeling. *PLoS One* 9: e85059,.
- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., Ivy, S.P., 2011, Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 97–106. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.196>.
- Talukdar S., Kundu SC.; 2012, A non-mulberry silk fibroin protein based 3D in vitro tumor model for evaluation of anticancer drug activity. *Adv Funct Mat* 22: 4778-4788,.
- Thakur, R., Trivedi, R., Rastogi, N., Singh, M., Mishra, D.P., 2015, Inhibition of STAT3, FAK and Src mediated signaling reduces cancer stem cell load, tumorigenic potential and metastasis in breast cancer. *Sci. Rep.* 5, 10194. <https://doi.org/10.1038/srep10194>.
- Thomson JA, Eldor J, Shapiro SS, 1998, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*; 282: 1145-1147.
- Trapp, E.K., Majunke, L., Zill, B., Sommer, H., Andergassen, U., Koch, J., Harbeck, N., Mahner, S., Friedl, T.W.P., Janni, W., Rack, B., 2017, LKB 1 pro- oncogenic activity triggers cell survival in circulating tumor cells. *Mol. Oncol.* 11, 1508–1526. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12111>.
- Van Keymeulen, A., Rocha, A.S., 2011, Ousset, M.; Beck, B.; Bouvencourt, G.; Rock, J.; Sharma, N.; Dekoninck, S.; Blanpain, C. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*, 479, 189–193. [CrossRef] [PubMed]
- Venugopal K, Ahmad H, Manikandan E, Thanigai Arul K, Kavitha K, Moodley MK, Rajagopal K, Balabhaskar R, Bhaskar M. J., 2017, “The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines.” *Photochem Photobiol B.* May 24;173:99-107.
- Visvader, J.E., Stingl, J., 2014, Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: Current status and perspectives. *Genes Dev.*, 28, 1143–1158. [CrossRef] [PubMed]
- W. Li., Y. Guo, H. Wang, D. Shi, C. Liang, Z. Ye, F. Qing and J. Gong, 2008, // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 847.

- Wang, J., Wynshaw-Boris, A., 2004, The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/differentiation. *Curr. Opin. Genetics Dev.* 14, 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.07.013>.
- Wang, L., Duan, W., Kang, L., Mao, J., Yu, X., Fan, S., Li, L., Tao, Y., 2014a, Smoothed activates breast cancer stem-like cell and promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 68, 1099–1104. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.09.012>.
- Wang, T., Fahrman, J.F., Lee, H., Li, Y.J., Tripathi, S.C., Yue, C., Zhang, C., Lifshitz, V., Song, J., Yuan, Y., Somlo, G., 2018, JAK/STAT3-regulated fatty acid  $\beta$ -oxidation is critical for breast cancer stem cell self-renewal and chemoresistance. *Cell Metab.* 27, 136–150. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.11.001>. e5.
- Wicha, M.S., Liu, S.; Dontu, G., 2006, Cancer stem cells: An old idea—A paradigm shift. *Cancer Res.*, 66, 1883–1890. [CrossRef] [PubMed]
- Xu X, Sabanayagam CR, Harrington DA, Farach-Carson MC and Jia X.; 2014, A hydrogel-based tumor model for the evaluation of nanoparticle-based cancer therapeutics. *Biomaterials* 35: 3319-3330,
- Y.R. Shih., C.N. Chen, S.W. Tsai, Y.J. Wang and O.K. Lee, 2006, // *Stem Cells* 24 2391.
- Yu J, Vodyanik MA, Otto K., 2007, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*,; 318: 1917-1920.
- Zanetta M, Quirici N, Demarosi F, Tanzi MC, Rimondini L and Farè S.; 2009, Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of MSCs into osteoblasts. *Acta Biomater* 5: 1126-1136,
- Zanetta M., Weiss S.;1992, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710,.
- Zhang, W., Grivennikov, S.I., 2013, Top Notch cancer stem cells by paracrine NF- $\kappa$ B signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 15, 316. <https://doi.org/10.1186/bcr3565>.
- Zhang, Y., Wang, X.Q., Wang, J.C, Zhang, X., Zhang, Q., 2011, A comparison study of the cytotoxicity of salinomycin and salinomycin sodium toward human breast cancer stem cells as well as breast cancer cells. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 20(4), 368-375.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : NOORA OMAR  
**Uyruğu** : IRAK  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : KERKÜK 01/01/1990  
**Telefon** : +905319409222  
**Faks** : ---  
**e-mail** : [nooraomar904@gmail.com](mailto:nooraomar904@gmail.com)

### EĞİTİM

| Derece        | Adı, İlçe, İl                                           | Bitirme Yılı |
|---------------|---------------------------------------------------------|--------------|
| Lise          | : Kerkük Kız Lisesi/ Kerkük/ Merkez                     | 2008         |
| Üniversite    | : Kerkük Üniversitesi/Fen Fakültesi/Biyoloji Böl.       | 2012         |
| Yüksek Lisans | : Selçuk Üniversitesi/Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler | 2019         |

### İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl         | Kurum                                                                          | Görevi              |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2016 – 2019 | Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Uygulama Merkezi (İLTEK-ARGE) | Araştırmacı Öğrenci |

### UZMANLIK ALANI

Fen Bilimleri

### YABANCI DİLLER

- 1- Arapça
- 2- Türkçe

### BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

6. Kök Hücre Sempozyumu, Kök Hücre Ve Hücresel Tedavi Derneği Ve Marmara Üniversitesi Tarafından Düzeltenen, Marmara üniversitesi, Mayıs 2017 / İstanbul/ Türkiye.

Kök Hücre Kursu, Kök Hücre Ve Hücresel Tedavi Derneği Ve Marmara Üniversitesi Tarafından Düzeltenen, Marmara üniversitesi, Mayıs 2017 / İstanbul/ Türkiye.

1. Konya Bioteknoloji Günleri, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bioteknoloji Topluluğu Tarafından Düzenlenen, Mayıs 2017/ Konya / Türkiye

Deney Hayvanları Kullanım Kursu VI, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi, HADYEK tarafından düzenlenen, Haziran 2019/ Konya/ Türkiye.

## YAYINLAR

- Noora Omar, Fatih Özcan, Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, ‘Evaluation of Biocompatibility of Supramolecular Calixarene on L-929 by Real Time Cell Analysis’, 7<sup>th</sup> International conference “Nanomaterials: Applications and Properties (NAP=2017) ”, Zatoka, Odesa region, Ukraina, (Oral).
- Noora Omar, Fatih Özcan, Mohammed Farman Ahmed, Pembegül Uyar Arpacı, ‘Biocompatibility of p-tert-butylcalix[4]arene for Medical Use-Real Time Cell Analysis’, 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences (ITPCCS 2017), Konya-Turkey, 2017, (Poster)
- Noora Omar, Fatih Özcan, Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı ‘ *In vitro* Biocompatibility of p-tert-butylcalix[4]arene on L-929 by Real Time Cell Analysis’ 5<sup>th</sup> International BAU Drug Design Congress: Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery & Patented Drug Development, Bahcesehir University School of Medicine, Istanbul-Turkey, 2017, (Oral).
- Noora Omar, Fatih Özcan, Pembegül Uyar Arpacı, “Evaluation of Preferential Anticancer Activity of *p-tert-butyl-üğüöoolcalix*[4]arene Against Human Prostate Carcinoma Cell Line, PC3”, 7<sup>th</sup> International molecular biology and biotechnology congress, Konya-Turkey, 2017, (Poster)