

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TİRAMİN İLE MODİFİYE EDİLMİŞ HYALURONİK ASİT (HTA)/JELATİN
(GTA) HİBRİT HİDROJELLERDE KANSER HÜCRE DAVRANIŞLARININ VE
MULTİ-OMİK PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melis IŞIK

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TİRAMİN İLE MODİFİYE EDİLMİŞ HYALURONİK ASİT (HTA)/JELATİN (GTA) HİBRİT HİDROJELLERDE KANSER HÜCRE DAVRANIŞLARININ VE MULTİ-OMİK PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Melis IŞIK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Bu çalışmada, mekanik özellikleri ve hücresel fonksiyonlara etkisi farklı olan hidrojellerin birleştirilmesi ile bir ECM modeli oluşturarak kanser hücrelerinin hücre yapışma kapasitesini ayarlamak ve moleküler fenotipi kontrol ederek metastazlarını incelemek hedeflenmiştir. Enzimatik olarak çapraz bağlanabilir GTA, jelatin ve tiramin hidroklorür arasında NHS / EDC kimyası yoluyla gerçekleşen bir yoğunlaştırma reaksiyonu ile sentezlendi. Sentez başarısı ve hidrojelleşme kapasitesi FTIR, NMR, SEM ve reolojik analizler ile belirlendi. Stabilitayı ve mekanik özellikleri kontrol etmek için farklı konsantrasyonlarda HTA-GTA hibrit hidrojelleri tasarlandı ve mekanik özelliklere bağlı olarak fiziksel özelliklerde meydana gelen değişimler SEM ve reolojik analizler ile karakterize edildi. Kolorektal adenokarsinom (HT-29) hücrelerinin hidrojeller üzerinde kümelenmesini ve tek tabakalı kültürünü kontrol etmek için HTA-GTA hidrojellerinin bileşen oranları 2:1-sert matris, 1:1 ve 1:2-yumuşak matris olacak şekilde değiştirildi ve hücre yapışma kapasitesi kalsein-AM ve YAP boyaması ile incelendi. Optimal HTA-GTA hidrojelinin belirlenen oranlarında, hücre mekanotransdüksiyonuna ve moleküler fenotipe bağlı olarak metastazik genotipin değişimi gen ekspresyon analizleri ile incelendi. Ardından kanser hücrelerinin matris-bağımlı veya tümör-ilişkili hücre ölüm yollarını aydınlatmak amacı ile apoptoz, nekroz ve otofaji ile ilgili genler analiz edildi. Metabolit fenotiplerindeki değişiklikler, omik teknolojilerini içeren geniş bir teknik yelpazesi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, 3B-benzeri hücre kümelenmesinden tek katmanlı hücre kültürüne geçiş göz önünde bulundurulduğunda, %1 HTA- %10 GTA (2:1, 1:1, 1:2) hidrojellerinin kanser hücresi yapışmasını ve hücre-malzeme arasındaki mekanik ilettime bağlı olarak metastazik genotipi kontrol edilebilir kılan bir hidrojel platformu olduğunu desteklemektedir.

Haziran 2022, 100 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kanser, Hücre adezyonu, Mekanotransdüksiyon, Metastaz, Hibrit hidrojeller, Omik teknolojiler, Metabolomik

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF CANCER CELL BEHAVIOUR AND MULTI-OMICS PROFILES ON TYRAMINE MODIFIED HYALURONIC ACID (HTA) / GELATIN (GTA) HYBRID HYDROGELS

Melis ISIK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Emel EMREGUL

In this thesis, the aim of the study was tuning the cell adhesion of cancer cells and examining their metastases by controlling the molecular phenotype by constructing an ECM model composed of combined hydrogels with different mechanical properties but also possessing distinct effects on cellular functions. Enzymatically crosslinkable GTA was synthesized by a condensation reaction between gelatin and tyramine hydrochloride via NHS/EDC chemistry. Success in synthesis and hydrogelation capacity were determined by FTIR, NMR, SEM and rheological analysis. In order to control the stability and mechanical properties, HTA-GTA hybrid hydrogels at different concentrations were designed and SEM and rheological characterizations were proceeded to elucidate the changes in physical properties due to alterations in mechanical properties. The component ratio of the HTA-GTA hydrogel was changed between 2:1-hard matrix, 1:1 and 1:2-soft matrix to control the cell-clustering and monolayer culture of colorectal adenocarcinoma (HT-29) cells on hydrogels and the cell adhesion tuning was examined by calcein-AM and YAP staining. The effect of cell mechanotransduction and molecular phenotype on metastatic genotype was investigated by gene expression analysis after determining the optimal HTA-GTA hydrogel scaffold. Genes involved in apoptosis, necrosis and autophagy were analyzed to elucidate the cell death pathways of cancer cells and clarify whether the cellular death is matrix-dependent or tumor-associated. Changes in metabolite phenotypes were evaluated with a wide range of techniques including omics technologies. Considering the transition from 3D-like cell aggregation to monolayer cell culture, obtained results indicated that %1 HTA- %10 GTA (2:1, 1:1, 1:2) hydrogels support cancer cell adhesion tuning and provide a hydrogel platform that supports the control of metastatic genotype depending of cell-material mechanotransduction.

June 2022, 100 pages

Key Words: Cancer, Cell adhesion, Mechanotransduction, Metastasis, Hybrid hydrogels, Omic technologies, Metabolomics

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek, her türlü konuda gösterdiği üstün sabır, ilgi ve anlayış ile desteğini hep hissettiğim, yüreklendirici sözleriyle bana akademik yolda yürüme şevki ve cesareti kazandıran, bilimsel duruşunun yanında insani duruşunu hep örnek alacağım değerli hocam sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD),

Tez çalışmamın en başından en sonuna kadar her aşamada yardımını benden esirgemeyen, yaptığım çalışmalarda kuvvetli bilgi birikimini benimle paylaşarak ve yol göstererek gelişmeye büyük katkısı olan, beni sınırlamayarak yüksek lisans öğrencisinin yeterliliğini göstermesine olanak sağlayan, bilimselliğini ve akademik başarılarını her zaman örnek alacağım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD),

Eğitim hayatım boyunca her koşulda manevi desteğini hep üzerimde hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Kaan EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD), çalışmalarım sırasında bilgi birikimlerini, yardımlarını ve manevi desteğini benden esirgemeyen Doç. Dr. Sedat ODABAŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD), her zaman yanımda olan ve desteklerini hissettiğim laboratuvar arkadaşlarım Buse SARI'ya, Dilara KURT'a, Mustafa SÜNGÜ'ye, İpek ERTUĞRUL'a, Öğr. Gör. Fulya ÖZDEMİR'e, Oğuzhan DURMAZ'a, Gülşen YILDIRIM'a, beni yüksek lisans eğitimim boyunca maddi olarak destekleyen TÜBİTAK BİDEB'e,

Hayatım boyunca her kararına ve düşünceme saygı duyarak beni sonsuz destekleyen, her koşulda ve her zorlukta büyük sabırlar gösteren ve bana inanan, sevgi, anlayış ve fedakarlıklarını hayatımın her anında hissettiğim, uzağımda olan ama hep en yakınımda hissettiğim en büyük destekçilerim ve hayatımın en değerlisi olan annem Ayşe Başlar IŞIK'a, babam Erol IŞIK'a ve kardeşim Erdoğan IŞIK'a

Tüm kalbimle teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Melis IŞIK

Ankara, Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Kanser ve Oluşma Süreci	4
2.2 Kanserli ve Normal Hücreler Arasındaki Farklar	5
2.2.1 Büyüme	6
2.2.2 Yakındaki dokuları istila etme yeteneği (invaziflik)	7
2.2.3 Vücudun diğer bölgelerine yayılma (metastaz yapma) yeteneği	7
2.2.4 Ölümsüzlük.....	7
2.3 Metastaz	8
2.4 Kanserde Metastaz Mekanizması.....	8
2.5 Epitelyal-Mezenkimal Geçiş.....	9
2.6 Kanser Mikroçevresi.....	12
2.7 Hidrojeller.....	13
2.8 Hidrojellerin Çapraz Bağlanması.....	14
2.8.1 Hidrojellerin fiziksel yollar ile çapraz bağlanması	14
2.8.2 Hidrojellerin kimyasal yollar ile çapraz bağlanması.....	14
2.8.2.1 Foto-çapraz bağlama	15
2.8.2.2 Enzimatik çapraz bağlama.....	15
2.9 Hidrojellerin Kaynağına Göre Sınıflandırılması	15
2.9.1 Doğal hidrojeller.....	16
2.9.1.1 Jelatin ve hidrojel yapısı.....	16
2.9.1.2 Hyaluronik asit ve hidrojel yapısı.....	17
2.9.2 Sentetik hidrojeller.....	18
2.9.3 Hibrit hidrojeller.....	18
2.10 Biyomimetik Hidrojellerin Kanser Modellemesindeki Önemi	19

2.11 Hidrojellerin Kanser Mekanotransdüksiyonu ve Metastazına Etkisi	19
2.12 Kanser Hücrelerinin Hidrojeller Üzerinde Yapışma ve Kümelenme Davranışının Ayarlanması	20
3. KAYNAK ÖZETLERİ	22
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
4.1 Materyal	26
4.2 Yöntem	28
4.2.1 GTA sentezi	28
4.2.2 GTA'nın kimyasal karakterizasyonu: FTIR ve NMR spektroskopisi	28
4.2.3 GTA'nın hidrojelleşmesi	29
4.2.4 GTA hidrojelinin karakterizasyonu	29
4.2.4.1 Reolojik karakterizasyon: GTA'nın hidrojelleşme kapasitesi.....	29
4.2.4.2 GTA'nın mekanik analiz (sıkıştırma) testi	29
4.2.4.3 Morfolojik karakterizasyon: SEM	30
4.2.4.4 GTA hidrojellerinin bozunma testi	30
4.2.4.5 GTA hidrojellerinin su tutma kapasitesinin belirlenmesi.....	30
4.2.4.6 GTA hidrojellerinin UV geçirgenlik özelliğinin test edilmesi	31
4.2.5 Hibrit HTA-GTA hidrojellerinin hazırlanması	31
4.2.6 Hibrit HTA-GTA hidrojellerinin karakterizasyonu	32
4.2.6.1 HTA-GTA hidrojelinin FTIR spektroskopi analizleri	32
4.2.6.2 HTA-GTA hidrojelinin reolojik karakterizasyonu	32
4.2.6.3 HTA-GTA hidrojellerinin mekanik analiz (sıkıştırma) testi	33
4.2.6.4 HTA-GTA hidrojellerinin SEM analizi	33
4.2.7 <i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları.....	33
4.2.7.1 Hücre kültürü	33
4.2.7.2 Hücrelerin HTA, GTA ve HTA-GTA hibrit jelleri üzerine tohumlanması	34
4.2.7.3 XTT testi: HTA ve GTA hidrojelleri üzerinde hücre proliferasyonu	34
4.2.7.4 Canlı/ölü testi.....	35
4.2.7.5 Kalsein-AM boyaması: Hibrit hidrojellerde hücre adezyonunun incelenmesi.....	36
4.2.7.6 İmmüno Floresan boyaması: Hücreye özgü YAP ekspresyonunun görselleştirilmesi	37
4.2.7.7 RT-qPCR: Gen ekspresyon analizi	37
4.2.7.8 Apoptoz-nekroz testi	39
4.2.7.9 Metabolomiks çalışmaları	39
4.2.7.10 Biyoistatistiksel ve biyoinformatik çalışma	40

5. BULGULAR	42
5.1 GTA Sentezi ve Karakterizasyonu	42
5.1.1 FTIR spektroskopi sonuçları	42
5.1.2 NMR spektroskopi sonuçları	43
5.2 GTA'nın Hidrojelleşmesi ve Karakterizasyonu	44
5.2.1 Reolojik karakterizasyon: GTA'nın hidrojelleşme kapasitesi.....	44
5.2.2 GTA'nın mekanik analiz (sıkıştırma) testi bulguları	46
5.2.3 GTA hidrojellerinin SEM analizi bulguları	46
5.2.4 GTA hidrojellerinin bozunma testi bulguları	47
5.2.5 GTA hidrojellerinin şişme testi sonuçları.....	48
5.2.6 GTA hidrojellerinin UV geçirgenlik özelliği	49
5.3 Hibrit HTA-GTA Hidrojellerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	51
5.3.1 HTA-GTA hidrojelinin FTIR spektroskopi bulguları	51
5.3.2 HTA-GTA hidrojelinin reolojik karakterizasyonu.....	52
5.3.3 HTA-GTA hidrojellerinin mekanik analiz (sıkıştırma) testi bulguları	54
5.3.4 HTA-GTA hidrojellerinin SEM bulguları.....	55
5.4 <i>In vitro</i> Hücre Kültürü Bulguları	57
5.4.1 XTT bulguları.....	57
5.4.2 Canlı/ölü testi bulguları	59
5.4.3 Kalsein-AM boyaması ile hücrel adezyonun incelenmesi	60
5.4.4 İmmünofloresan boyaması bulguları	63
5.4.5 RT-qPCR: HTA-GTA hidrojellerinde mekanotransdüksiyon ile EMT ve metastaz gen ekspresyonları arasındaki ilişkiler	65
5.4.6 RT-qPCR: Apoptoz, otofaji ve nekroz gen ekspresyonlarının metastaz ile ilişkilendirilmesi.....	67
5.4.7 Apoptoz-nekroz testi bulguları	69
5.4.8 Metabolomik analiz: HT29 hücrelerinin HTA ve GTA hidrojelleri üzerinde kültürlenmesi ile elde edilen metabolomik profillemesi	71
5.4.9 Metabolomik analiz: HT29 hücrelerinin HTA-GTA hibrit hidrojelleri üzerinde kültürlenmesi ile elde edilen metabolomik profillemesi.....	76
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	81
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER DİZİNİ

CO ₂	Karbondioksit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat

Kısaltmalar

2D	İki Boyut
3B	Üç Boyut
5-FU	5-florourasil
7-AAD	7-aminoaktinomisin-D
BSA	Sığır Serum Albumin
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidroklorür
DMEM-hg	Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini
DTT	Ditiyotritol
ECM	Ekstrasellüler Matris
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EDTA	Etilen Diammin Tetraasetik Asit
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ethd-1	Etidyum homodimer-1
FBS	Fetal Sığır Serum
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
GAG	Glikozaminoglikan
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GelMA	Jelatin-Metakriloil
GTA	Jelatin-Tiramin
GtnSH	Tiyolatlanmış Jelatin
HA	Hyaluronik asit
HRP	Yaban Turpu Peroksidaz Enzimi
HT-29	Kolorektal Adenokarsinom Hücresi
HTA	Hyaluronik Asit-Tiramin

IAA	İodoasetamid
IPN	Polimerik Ağ Hidrojeli
KRK	Kolon veya Kolorektal Kanser
LC-qTOF	Sıvı Kromatografisi-Kuadrapor Uçuş Zamanlı
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MCF-7	Meme Kanseri Hücreleri
MES	Morfolinoetansülfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NHS	N-Hidroksisüksinimit
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
P/S	Penisilin/Streptomisin
PCa	Prostat Kanseri Hücreleri
PCA	Temel Bileşenler Analizi
PEG-TA	Poli(etilen glikol)-Tiramin
PFA	Paraformaldehit
PI3K	Fosfoinositid-3-kinaz
PLGA	Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)
PLS-DA	Kısmi En Küçük Kareler-Ayrımcılık Analizi
PS	Fosfatidilserin
RT-qPCR	Ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
siRNA	Susturucu RNA
TGF- β	Dönüşen Büyüme Faktörü-Beta
TMCS	Trimetilklorosilan
Try	Tiramin
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WNT	Wingless ile İlgili Entegrasyon Bölgesi
XTT	[2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid]
YAP	Yes-Associated Protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kanser, vücuttaki bir hücrede veya küçük bir hücre grubunda genetik veya epigenetik faktörlerden kaynaklanan normal hücre mutasyonu ile başlar ve mutasyona uğrayan hücrelerin sınırsız bir şekilde çoğalması ile tümörler oluşur.....	4
Şekil 2.2 Normal hücre ve kanser hücresi arasındaki fenotipik farklılıklar.....	6
Şekil 2.3 İlk aşama olan EMT geçişinde, dönüştürülmüş epitel hücreleri çoğalır ve birincil tümörü oluşturur. Ardından kanserin ilerlemesi sırasında MET geçişi meydana gelerek ikincil tümör oluşur.....	11
Şekil 2.4 Kanser mikroçevresi, kanser hücreleri başta olmak üzere kanser kök hücreleri, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri ve tüm hücrelerin birbiri ile etkileşimini sağlayan ECM'den oluşur.....	12
Şekil 5.1 Saf jelatin ve sentezlenen GTA'nın FTIR spektrumları	42
Şekil 5.2 Saf jelatin ve sentezlenen GTA'nın NMR spektrumlar	43
Şekil 5.3 %5 ve %10 GTA hidrojellerinin frekans-tarama grafikleri	45
Şekil 5.4 Çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan GTA hidrojellerini gösteren makroskopik/reolojik görüntü	45
Şekil 5.5 %5 ve %10 GTA hidrojellerinin sıkıştırma testi sonucunda elde edilen gerilim-gerinim eğrileri ve young modülleri.....	46
Şekil 5.6 (A) %5 GTA, (B) %10 GTA hidrojellerinin SEM görüntüleri.....	47
Şekil 5.7 Bozunma testi sonucunda %5 ve %10 GTA hidrojellerinin zamana bağlı korunan kütle (%) değişimi	48
Şekil 5.8 %5 GTA ve %10 GTA hidrojellerinin yüzde su tutma kapasitesi (* p > 0,05)	49
Şekil 5.9 GTA hidrojellerinin UV-geçirgenlik (şeffaflık) analizi.....	50
Şekil 5.10 HTA, GTA ve hibrit HTA-GTA hidrojelleri ile ilgili FTIR spektrumları.....	51
Şekil 5.11 (A) HTA'nın jel oluşturma yeteneğini gösteren frekans-tarama grafiği, (B) HTA ve GTA arasındaki zayıf moleküller arası etkileşimi kanıtlayan zaman-tarama grafiği, (C) Enzimatik çapraz bağlamadan sonra HTA-GTA hibrit hidrojelinin frekans-tarama grafiği	53
Şekil 5.12 Enzim aracılı ortogonal reaksiyon yoluyla kovalent çapraz bağlanmadan önce ve sonra HTA-GTA jel oluşumunu gösteren makroskopik görüntü	54

Şekil 5.13 HTA ve HTA-GTA hibrit hidrojenlerinin değişen oranları (2:1, 1:1 ve 1:2 v/v) için gerçekleştirilen sıkıştırma testi sonucunda elde edilen gerilim-gerinim eğrileri ve young modülleri.....	55
Şekil 5.14 HTA, GTA, HTA-GTA hibrit hidrojeninin ve değişen oranlarda hazırlanmış %1 HTA-%10 GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) hibrit hidrojenlerinin mikro yapılarını gösteren SEM görüntüleri	56
Şekil 5.15 GTA ve HTA hidrojenleri üzerinde HT-29 kanser hücrelerinin belirli zaman noktalarında XTT yöntemi ile belirlenen hücre çoğalma oranları (* p < 0,05, ** p < 0,05x10 ⁻³)	57
Şekil 5.16 HT-29 kanser hücrelerinin (A) HTA, (B) GTA hidrojenleri üzerinde kültür edildiği sürede elde edilen mikroskop görüntüleri, (C) HTA ve GTA üzerinde kültür edilen HT-29 hücrelerinin makroskopik görüntüleri	58
Şekil 5.17 Hibrit jel bileşenlerinin HT-29 hücreleri üzerinde in vitro sitotoksitesine ait floresan görüntüleri. (A) Kalsein-AM boyaması ile 2. gün hücre canlılığını temsil eden görüntüler, (B) Kalsein-AM boyaması ile 7. Gün hücre canlılığını temsil eden görüntüler, (C) 7. gün yapılan Ethd-1 boyaması ile ölü hücrelerin elde edilen görüntüleri	60
Şekil 5.18 Kalsein boyama yoluyla HT-29 hücre yapışması ve kümelenmesinin, farklı konsantrasyon ve oran (2:1, 1:1, 1:2) kombinasyonlarında hazırlanan HTA-GTA hidrojenleri üzerinde değerlendirilmesine ait floresan mikroskop görüntüleri, ölçek çubuğu: 200 µm	61
Şekil 5.19 HT-29 kanser hücrelerinin %1 HTA-%10 GTA hibrit hidrojeninin 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarında 2B kültürü ve yapışma davranışlarını mikroskop görüntüleri	63
Şekil 5.20 1% HTA-%10 GTA hidrojenleri üzerinde kültür edilen HT-29 hücrelerinin immünofloresan boyaması sonucu elde edilen floresan görüntüleri. (A) β-aktin boyanması, (B) YAP boyaması	64
Şekil 5.21 %1 HTA- %10 GTA hidrojenlerinin 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarında kültür edilen HT-29 hücrelerinin (A) mekanotransdüksiyon, (B) EMT ve (C) metastazik gen ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri.....	66
Şekil 5.22 %1 HTA- %10 GTA hidrojenlerinin 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarında kültür edilen HT-29 hücrelerinin (A) otofaji , (B) apoptoz ve (C) nekroz ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri.....	68
Şekil 5.23 %1 HTA-%10 GTA hidrojenleri üzerinde kültür edilen HT-29 hücrelerine ait apoptoz-nekroz floresan görüntüleri	70

Şekil 5.24 HTA ve GTA hidrojenleri üzerinde kültürlen HT-29 hücrelerinin metabolomik profillerindeki farklılığı ayırt etmek için uygulanan T-testi	72
Şekil 5.25 HTA ve GTA hidrojenleri üzerinde kültürlen HT-29 hücrelerinin gruplar içi ve gruplar arası metabolit profilindeki ayrımı gösteren PLS-DA diyagramı.....	72
Şekil 5.26 HTA ve GTA hidrojenleri üzerinde kültürlen HT29 hücrelerinde farklılaşan metabolitler tarafından elde edilen hiyerarşik kümeleme analizi	73
Şekil 5.27 HTA ve GTA grupları arasında HT29 hücreleri için en çok farklılığa uğrayan metabolitleri listeleyen VIP grafiği	74
Şekil 5.28 Gruplar arasında yukarı/aşağı ve benzer düzeyde regüle edilen metabolitleri gösteren yanardağ dağılım grafiği.....	74
Şekil 5.29 HTA ve GTA hidrojenleri üzerinde kültürlen HT29 hücrelerinde anlamlı şekilde etkilenen yolları temsil eden yol etki grafiği.....	75
Şekil 5.30 HTA-GTA hidrojenlerinin farklı oranları (2:1, 1:1, 1:2 v/v) üzerinde kültürlen HT-29 hücrelerinin metabolomik profillerindeki farklılığı ayırt etmek için uygulanan ANOVA testi	76
Şekil 5.31 HTA-GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) hidrojenleri üzerinde kültürlen HT-29 hücrelerinin gruplar içi ve gruplar arası metabolit profilindeki ayrımı gösteren PLS-DA diyagramı	77
Şekil 5.32 HTA-GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) hidrojenleri üzerinde kültürlen HT29 hücrelerinde farklılaşan metabolitler tarafından elde edilen hiyerarşik kümeleme analizi.....	78
Şekil 5.33 HTA-GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) grupları arasında HT29 hücreleri için en çok farklılığa uğrayan metabolitleri listeleyen VIP grafiği.....	79
Şekil 5.34 HTA-GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) hidrojenleri üzerinde kültürlen HT29 hücrelerinde anlamlı şekilde etkilenen yolları temsil eden yol etki grafiği	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Hazırlanan hidrojellerin konsantrasyonları ve bileşimleri	31
---	----



1. GİRİŞ

Dünya geneline bakıldığında kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra en çok ölüm oranına katkıda bulunan hastalık olarak görülmektedir. 2018 yılında 9,6 milyon insanın sadece kanser nedeni ile hayatını kaybetmesi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtilmiştir (Bray vd. 2018). Bu bilgiden çıkarılması gereken istatistiksel oran, bir sene içerisinde dünyada gerçekleşen her altı ölümden birinin sebebinin kanser olduğunu göstermektedir. Bütün bu veriler, henüz detayları tam olarak bilinmeyen kanser mekanizmalarının aydınlatılmasının önemini göstermektedir. Moleküler biyoloji alanındaki gelişmelere rağmen son 25 yıldır birçok kanser türünün tedavisi ve mekanizması konusunda önemli gelişmeler olmamıştır.

Vücudumuzda bulunan organ veya dokulardaki hücrelerin düzensiz ve anlamsız bir şekilde bölünmesi ve ardından çoğalması ile oluşan kötü urlar kanser olarak adlandırılmaktadır (Hassanpour ve Dehghani 2017). Çok farklı türde kanser tipleri olmasına rağmen, kanserin oluşma mekanizması her çeşit için aynı olup bu mekanizma, sağlıklı olmayan anormal hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasına ve metastaz yapmalarına dayanmaktadır (Aguirre-Ghiso 2007). Kanser metastazını yönetmenin anahtarı, kanser moleküler mekanizmalarına ek olarak kanser mikroçevresini anlamaya dayanır. Hücre dışı doku bileşeni olarak tanımlanan hücre dışı matris (ECM), farklı fibröz proteinler, proteoglikanlar, glikoproteinler vb. içeren oldukça heterojen bir ağdan oluşur (Cox 2021). Tümör dokusuna ait ECM'nin bileşenleri, metastaz ve invazyon durumunda zamanla birikime uğrayabilir veya bozulabilir (Witjas vd. 2019). Bu dinamik matris, kanser metastazında ve invaziv karakterin ortaya çıkmasında büyük rol oynayan hücre-hücre etkileşimlerinin ana desteğidir (Klein 2020). Ayrıca, kompleks tümör mikroçevresinde meydana gelen karşılıklı hücre-ECM ve hücre-hücre etkileşimleri, kanserin orijinal dokudan komşu dokuya invazyonunu sağlayan epitelyal-mezenkimal geçişe (EMT) katkıda bulunur (Ribatti vd. 2020). Bu matrisin karmaşıklığı göz önüne alındığında, kanser hücresi davranışını kontrol etmek için tümör mikro-ortamını kimyasal ve mekanik özelliklerle yeniden yaratmaya yönelik artan bir ilgi vardır.

Tümör oluşumu sırasında normal hücrelerin genotipinde meydana gelen onkojenik mutasyonların sadece belirli doku veya organlarda meydana gelmesi, potansiyel kanser hücrelerinin fenotip ve genotipinin mikroçevre tarafından düzenlendiğini gösterir (Ciriello vd. 2013). Tümörleri çevreleyen ECM'ler, tümör oluşumuna kıyasla yüksek seviyelerde kollajen ve proteoglikanlardan oluşur. sağlıklı ECM'ler ve kanser metastazı, bu ECM bileşenlerinin sürekli değişen seviyeleri ile şekillenir (Di Martino vd. 2021). Bu nedenle, kompozisyonu ayarlayarak kanser ECM'sini taklit etmek ve kanser hücrelerinin davranışını anlayarak kanseri daha iyi tanımlamak için biyomalzemeler büyük önem taşımaktadır (Tamayo-Angorrilla vd. 2021). Biyomalzemelerin kanser hücrelerinin ve onları çevreleyen bileşenlerin etkileşimlerini taklit eden araçlar olarak kullanılması, kanser hücrelerini in vitro olarak tanımlayarak ve yakalayıp tümörjenez ve metastazın anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunur (Bahlmann vd. 2020). Biyomalzemelerin çeşitli mimari, mekanik ve biyolojik işlevlerini kontrol etme yeteneği, tümör mikro ortamının ana özelliklerini in vitro özetlemek için uygun modeller sağlar (Wang vd. 2020). Kanser en önemli iki aşaması, hücrelerin istilacı göçü ve tümörleri oluşturmak üzere kolonizasyondur (Matthews vd. 2022). Bunu göz önünde bulundurarak, kanser hücrelerinin metastazın ilk aşamasında bağımsız invaziv davranış göstermelerini sağlayacak biyomalzemelerin keşfi giderek önem kazanmıştır.

Kanseri ve metastazı anlamak, uygun biyomateryal seçimi yoluyla kanser hücresi davranışını ayarlamakla yakından ilişkilidir. Hücrelerin metastazın çeşitli aşamalarındaki benzersiz rollerini taklit edebilecekleri biyomateryal platformlar sağlamak, kanserin neden-sonuç döngüsünü aydınlatmayı mümkün kılar. Günümüzde, tümör mikroçevresini taklit etmek için doğal ve sentetik biyomalzemelerin kullanılması, kanserin metastazını ve istilacı mekanizmalarını aydınlatmak için önemli bir strateji haline gelmiştir. Kollajen, jelatin, ipek, vb.'den türetilen doğal ECM kökenli hidrojeller, hücre yapışmasını destekleyen ve kanser hücrelerinin sınırsız çoğalmasını taklit eden yüksek bir biyouyumluluk düzeyine sahiptir (Ozudogru vd. 2021, Blanco-Fernandez vd. 2021). Doğal hidrojeller ve artan konsantrasyonları tümör oluşumunu desteklemesine rağmen, mekanik özellikleri ve biyolojik bozunma hızı üzerinde sınırlı kontrol sergilerler; sentetik malzemeler ise mekanik kontroldeki sınırlamaların üstesinden gelebilmektedir (Esmaili vd. 2021). Hücrelerin mekanik ve biyolojik uyaranlara

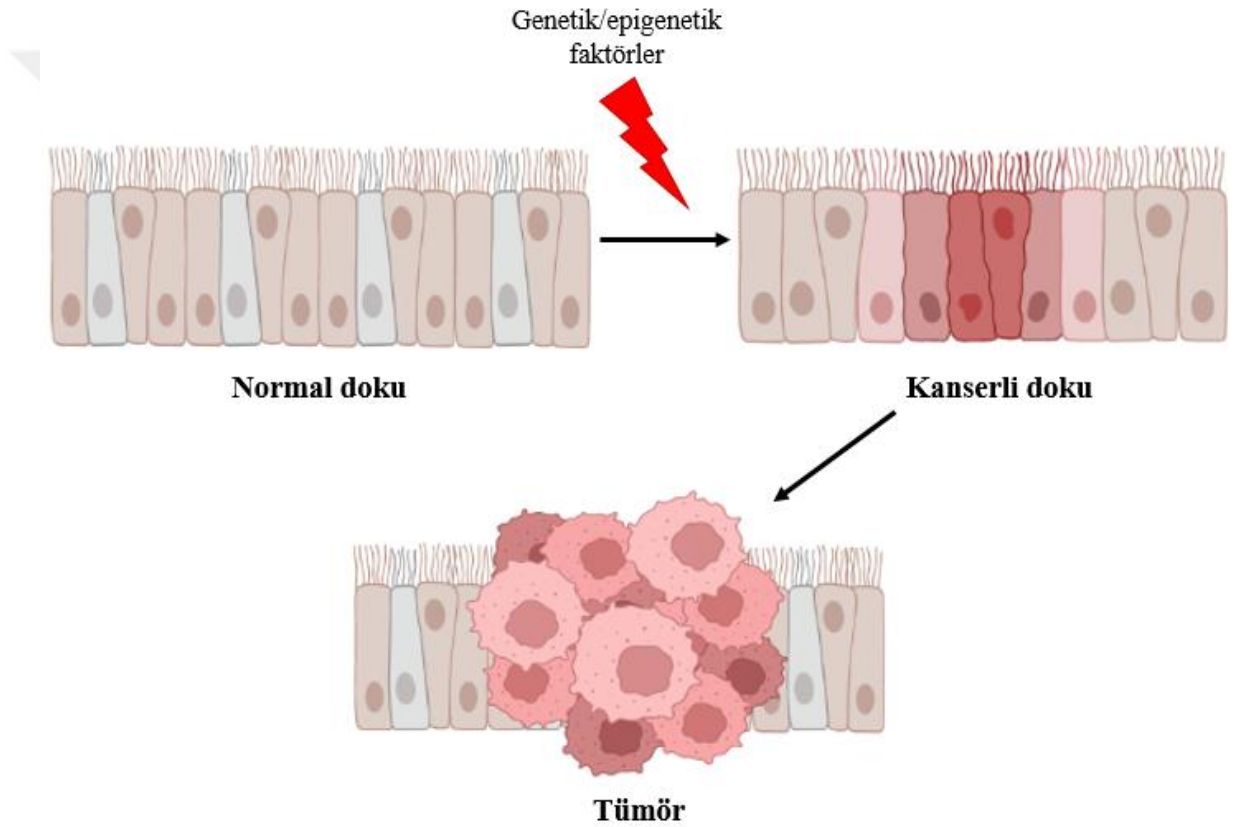
tepkisini incelemek için geliştirilen mimetik nişlere ek olarak, kanser hücre kümelerinin oluşumunun arkasındaki olası mekanizmaları tahmin etmek için kanser hücresi yapışmasını kontrol edilebilir kılan hibrit materyallerin geliştirilmesine odaklanan çalışmalar yürütülmektedir (Wang vd. 2018, Silvestre vd. 2021). Bu strateji sayesinde, hücreleştirilmiş bir doku ve selülozdan oluşan doğal bir hibrit sistemin, kansere karşı agresif ilişkili genleri yukarı regüle ettiği görülmüştür (Jisoo vd. 2021). Benzer şekilde, PEG ve Matrigel'den yapılmış doğal-sentetik türevli bir hibrit biyomateryal, kanser hücrelerinin istilacı davranışını kontrol etmek için başarıyla kullanılmıştır (Beck vd. 2013). Bu sebeple, doğal hidrojellerin çok yönlülüğünden yararlanarak, tümör oluşumu ve metastazı incelemek için spesifik senaryoları daha doğru bir şekilde yeniden oluşturabilen daha karmaşık ve iyi tanımlanmış matrisler tasarlamak mümkündür.

Bu çalışmada, kanser hücrelerinin hücre yapışma kapasitesini ayarlamak ve moleküler fenotipi kontrol etmek için çoklu hidrojelleri birleştiren bir konsept sunulmaktadır. Bu strateji sayesinde, ortogonal enzimatik çapraz bağlama reaksiyonu yoluyla stabilizeyi ve mekanik özellikleri kontrol etmek için hyaluronik asit ve jelatin, tirozin amino asidinden türetilen tiramin ile modifiye edilmiştir. Try(HTA-GTA) hibrit hidrojelleri, bileşen oranını değiştirerek hücre yapışmasını kontrol etmek için kullanılmıştır. Hyaluronik asit bazlı hidrojellerin küre oluşumunu ve jelatinin etkili bir hücre yapışmasını indüklemeye yeteneği daha önce yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Derkus vd. 2020, Puckert vd. 2020). Bu bulgulara dayanarak, yapılan tez çalışmasının hipotezi bileşen oranlarını değiştirerek kanser hücresi adezyonunun ve moleküler fenotipin ayarlanmasına dayanmaktadır. Hibrit sistemin tek tabakalı bir kültürü veya hücre kümelenmesini indüklemeye yeteneği, kolorektal adenokarsinom hücreleri (HT-29) ile test edilmiştir. Gen, protein ve metabolit fenotiplerindeki değişiklikler, omik teknolojilerini içeren geniş bir teknik yelpazesi ile değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser ve Oluşma Süreci

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin sürekli ve hızlı bir şekilde bölünmesiyle büyüyen tümörlerdir. Çoğalma süreçlerinin sınırsız olduğu bu hücreler, invazyon ve infiltratif büyüme yaparak çevresindeki doku ve damarların içerisine yerleşerek metastaz yaparlar (Marte 2004).



Şekil 2.1 Kanser, vücuttaki bir hücrede veya küçük bir hücre grubunda genetik veya epigenetik faktörlerden kaynaklanan normal hücre mutasyonu ile başlar ve mutasyona uğrayan hücrelerin sınırsız bir şekilde çoğalması ile tümörler oluşur.

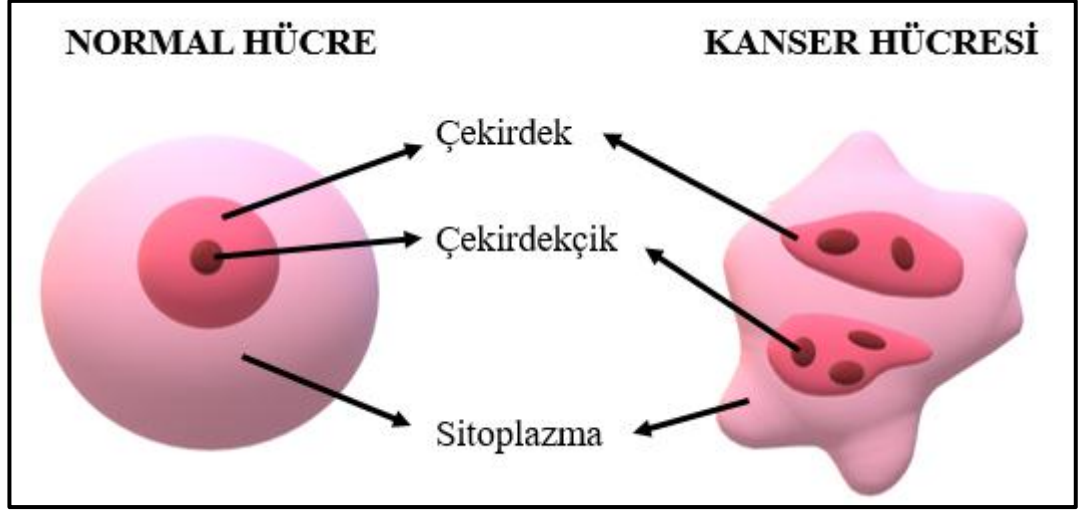
Bir hücrenin kanser hücresi olarak nitelendirilebilmesi için başta hücrenin sınırsız proliferasyon kapasitesine sahip olması olmak üzere, büyümesini engelleyen faktörlere karşı dirençli olması, hücre ölümü ve apoptozu görülmemesi ve yüksek invazyon

yeteneği ile dokuların içerisine yerleşip yeni koloniler oluşturarak metastaz yapabilmesi gerekmektedir (Hannahan ve Weinberg 2011). Kanserin oluşmasında u temel neden yer almaktadır. Çevreden kaynaklanan ekzojen kanserejenler, organizmanın genetiğinde bulunan endojen kanserojenler ve yaş, cinsiyet, beslenme gibi yardımcı faktörler bu nedenler arasında sıralanabilmektedir (Anand vd. 2008).

2.2 Kanserli ve Normal Hücreler Arasındaki Farklar

Kanser hücreleri ile normal hücreler arasında birçok önemli fark vardır. Aralarındaki çoğu farklılık iyi bilinirken, bazı farklılıklar yeni yeni keşfedildiğinden dolayı net bir şekilde anlaşılabilir değildir. Kanser hücrelerinin normal hücrelerden farklı çalıştığı noktaları anlamak, normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini vücuttan temizlemeyi hedefleyen tedavilerin geliştirilmesinin temelini oluşturur.

Kanser hücrelerinin normal hücrelerden ayırt edilmesinde rol alan en önemli farklılık, fenotiplerindeki değişikliklerle açıklanmaktadır. Normal hücreler dairesel, eliptik veya epitel bir görünüme ve sabit bir hücre boyutuna sahipken, kanser hücreleri düzensiz bir hücre şekline ve hücre boyutuna sahiptir. Buna ek olarak, normal hücreler küresel şekile sahip tek bir çekirdeğe sahiptir. Fakat kanser hücreleri çok çekirdekli olmakla birlikte, normal hücre çekirdeğine kıyasla büyük, küresel olmayan çekirdek yapılarına sahiptirler. Normal hücrelerde, çekirdeğin içinde tek bir çekirdekçik bulunurken, kanser hücrelerinde tek bir çekirdeğin içinde birden fazla çekirdekçik bulunabilmektedir. Bu sebeple, normal hücreler büyük bir sitoplazmik hacime sahipken, kanser hücreleri birden fazla büyük ve düzensiz şekilli çekirdeğe sahip olduğundan dolayı sitoplazmik hacimleri oldukça küçüktür (Markman 2021).



Şekil 2.2 Normal hücre ve kanser hücresi arasındaki fenotipik farklılıklar

Fenotipik farklılıkların dışında, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayırt edebilmek için hücresel süreçlerde ve metabolizmada rol alan farklılıkları anlamak çok önemlidir. Kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki en temel farklar büyüme, invaziflik, metastazik karakter ve ölümsüzlük olarak dört alt başlık altında sınıflandırılmaktadır (Markman 2021).

2.2.1 Büyüme

Büyüme ve gelişmenin bir parçası olan normal hücreler, çocukluk sürecinden itibaren gelişimin tamamlanması için bölünüp büyümeye devam ederler. Yaş ilerledikçe, normal hücrelerde büyüme yavaşlar. Ancak yara veya hasarlı dokunun onarılması gibi ihtiyaç duyulan durumlarda, normal hücreler hızla büyümeye devam etmektedirler (Rodrigues vd. 2019). Kanser hücreleri ise fazla hücreye ihtiyaç duyulmadığı durumlarda bile durmaksızın büyümeye devam eden hücre türleridir. Normal hücreler, yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde apoptoz yaparak hücre intiharını gerçekleştirirler ve ölen hücrelerin yerini sağlıklı yeni hücreler almaktadır. Fakat kanser hücreleri yaşlandığında veya hasar gördüğünde bile apoptoz sinyallerine duyarsız kalarak bölünmeye ve büyümeye devam ederler (Igney ve Krammer 2002).

2.2.2 Yakındaki dokuları istila etme yeteneği (invaziflik)

Normal hücreler, etraflarında bulunan diğer hücrelerden gelen ve normal hücrelerin büyüme sınırına ulaştıklarını belirten sinyallere yanıt verirler. Fakat kanser hücreleri, bu sinyallere yanıt vermezler ve bulundukları konumdan başka bir konuma (organ veya doku) göç etmek için çıkıntılar yaparak yakındaki doku veya organlara uzanırlar (Friedl ve Wolf 2003). Bu sebeple kanser hastası bir bireyden tümörü cerrahi olarak çıkartmanın zor olmasının temel nedeni, kanser hücrelerinin invazyon yaparak diğer dokulara yayılmasından kaynaklanmaktadır.

2.2.3 Vücudun diğer bölgelerine yayılma (metastaz yapma) yeteneği

Normal hücreler, çevrelerindeki hücelere yapışabilmek için adezyon molekülleri adı verilen maddeler üretebilmektedirler. Bu sebeple, bulundukları ortamda sabit kalırlar ve diğer hücrelerle etkileşimde olarak bulundukları doku veya organların fonksiyonlarını düzenli olarak yerine getirmesini sağlarlar (Armingol vd. 2021). Fakat çoğu kanser hücresi adezyon moleküllerine duyarsız kalarak serbest kalırlar ve bulunduğu konumdan vücudun sağlıklı olan uzak bölgelerine göç edebilirler. Kanser hücrelerinin bulunduğu doku veya organdan diğer bir ikincil bölgeye göç ederek o bölgede kanser oluşturmasına “metastaz” denir (Fares vd. 2020).

2.2.4 Ölümsüzlük

Vücudumuzdaki bütün normal hücrelerin de insanlar gibi sınırlı bir ömrü vardır. Hücreler belirli bir süreçten sonra ölürler ve yerine yeni hücreler üremeye başlar. Fakat kanser hücreleri sınırsız yaşama kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Kromozomların ucunda telomer olarak bilinen bir yapı bulunmaktadır. Hücreler bölündüğu zaman telomer adı verilen bu yapılar kısaltmaya başlar ve telomerler yeteri kadar kısaltıldığu zaman hücreler ölür (Maciejowski ve de Lange 2017). Kanser hücreleri bölündüğu zaman telomerler yine kısaltmaya devam eder fakat kanser hücreleri kısalan telomerleri tekrar eski haline döndürebilecek bir mekanizmaya sahiptir. Bu sebeple, kanser hücresi ölümü gerçekleşmeden sınırsız bir şekilde yaşayabilme özellikleri bulunur.

2.3 Metastaz

Normal bir süreçte vücudun sağlıklı ve organların düzgün bir şekilde fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için hücrelerin büyümesi ve bölünerek gerekli miktarda üremeleri gerekmektedir. Fakat bazen bu duruma rağmen süreç doğru yoldan sapar ve yeni hücrelere ihtiyaç olmaması durumunda dahi hücreler bölünmeye devam ederler. Bilincini kaybetmiş ve kontrolsüz bir şekilde bölünerek çoğalan bu hücreler “kanser hücreleri” olarak adlandırılır ve oluşan hücre kütesinin büyüklüğü ile ilgili olarak tümör oluşturabilme potansiyelli hücreler olarak bilinmektedirler (Collins vd. 1997). Kanser, lokal ve metastatik olmak üzere iki grup altında incelenebilmektedir. Kanser hücrelerinin belirli bir doku veya organda çoğalması lokal kanserin olduğunu göstermektedir (Tryfonidis vd. 2015). Henüz vücudun diğer bölgelerine yayılmamış bu kanser hücreleri, büyüklükleri veya diğer organlara yakınlıkları sebebi ile ilerlemiş olarak kabul edilir ve metastatik kanser hücrelerine dönüşebilme kapasitesindedirler (Riggio vd. 2021). Lokal bölgede çoğalmaya devam eden kanser hücreleri çeşitli tedavi yöntemleri ile yok edilebilirken, bu bölgede metastatik özellik kazanmış kanser hücreleri vücudun diğer bölgelerine metastaz yaparak yayılmaya başlarlar ve tedavi sürecini çok zorlu bir hale getirirler.

2.4 Kanserde Metastaz Mekanizması

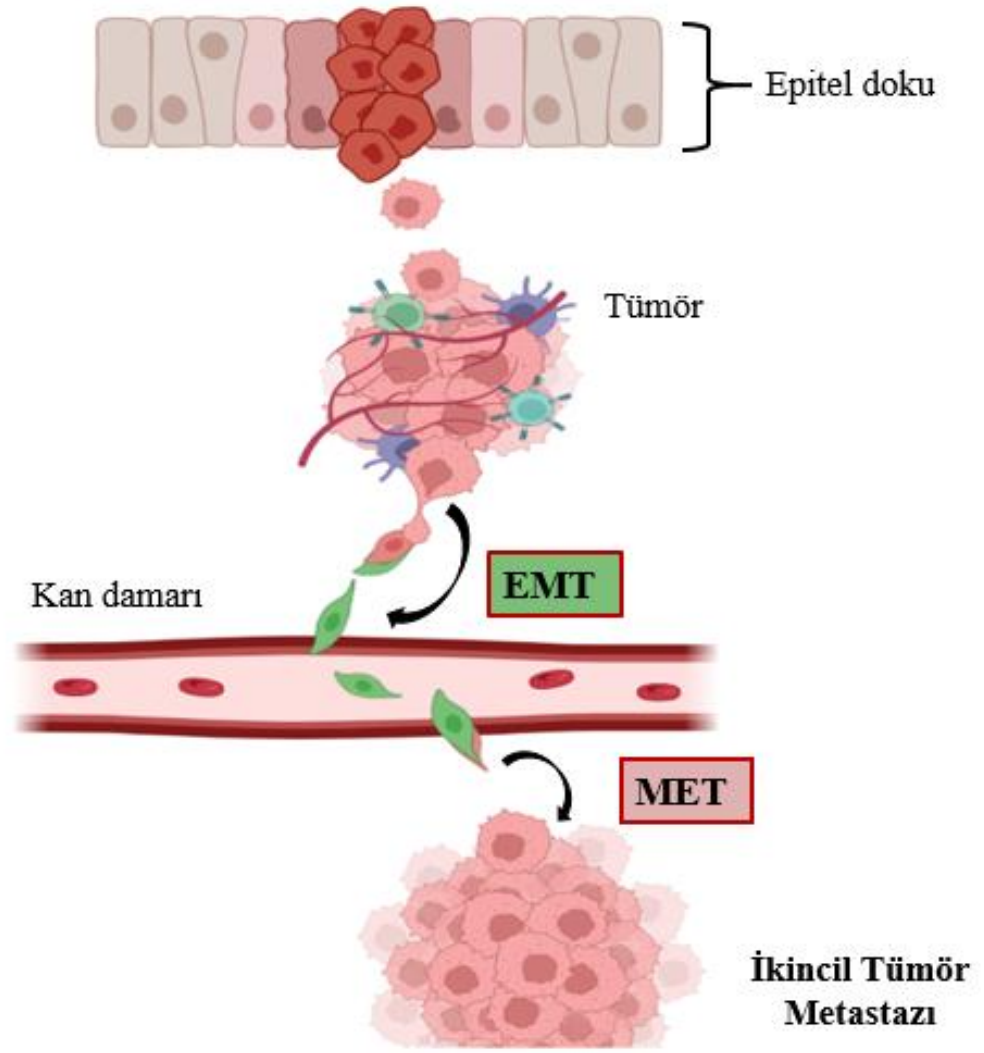
Metastaz süreci, kanser hücrelerinin vücudun orijinal birincil kanser bölgesinden ilerleyerek uzak bölgelere yayılması ile ikincil kanser bölgelerinin oluşmasına dayanır. Metastazın başlangıcı, kanser hücrelerinin birincil bölgeden ayrılması ile başlar ve gelişimi ise kan dolaşımına geçerek kan damarlarındaki basınca direnç gösterip kan dolaşımına katılması ile devam eder. Daha sonra yeni bir ikincil bölgeye yerleşerek oradaki yeni hücresel çevreye adapte olmasının ardından, oradaki bağışıklık hücrelerinden etkilenmeden bölünerek sınırsız bir şekilde çoğalmaya devam etmesi ile metastaz işlemi sonlanır (Klein 2009). Metastazın oluşum sürecinde beş temel aşama bulunmaktadır.

Kanser hücrelerinin ikincil bir bölgeye metastaz yapması sırasında kendi orijinal bölgesinde yer alan en önemli role sahip proteinler adezyon proteinleridir çünkü, metastaz sırasında adezyon azalır ve hücreler hareketli hale gelerek başka bir bölgeye göç edebilme yeteneğini kazanırlar. Bu yeteneği kazanan kanser hücrelerinin komşu doku ve organlara doğrudan göç ederek nüfuz etmesine “invazyon (istila)” denir (Cavallaro ve Christofori 2001). Kanser hücrelerinin kan ve lenf damarlarına nüfuz etmesi aşamasına “İntravazasyon” adı verilmektedir (Zavyalova vd. 2019). Bu aşamada, hücreler adezyon molekülleri yardımıyla etrafındaki endotel hücrelerle etkileşime girdikten sonra, proteolitik enzimler salgılayarak kan damarına sızmaya başlarlar tümör büyümesine katkıda bulunurlar (Reymond vd. 2013). Metastatik sürecin üçüncü aşaması olan dolaşım, kanser hücrelerinin lenfatik veya kan damarlarının lümeninden ikincil uzak bir doku bölgesine göç etmesine dayanmaktadır. Ardından kanser hücreleri kan damarlarını terk eder ve akciğer kılcal damarlarına nüfuz etmekle birlikte diğer doku ve organlara yayılarak ekstrasvazasyon yaparlar (Miles vd. 2007). Son aşama olan kolonizasyon ise, kanser hücrelerinin proliferasyonunun maksimum olduğu seviyeyi temsil eder ve bu aşamada tümör hücreleri bir araya gelerek anjiyogenezi indüklerler (Massagué vd. 2016). İnvazyon-metastaz sürecinin son adımı olan kolonizasyon sürecinde, metastatik karaktere direnç gösteren hücreler dahi metastatik özelliğe sahip olmaya başlarlar. Kanser hücrelerinin bir araya gelerek koloni oluşturması ile yeni bir kanser mikroçevresi oluşur (Witsch vd.2010).

2.5 Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

Bir kanser hücrelerinin gelişimi sırasında kötü huylu tümöre dönüşürken epitelden mezenkimal benzeri bir fenotipe dönüşüm süreci epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olarak tanımlanır (Kalluri ve Weinberg 2009). İnsan kanserlerinin %90’ı epitel dokulardan meydana gelir ve henüz gelişmemiş bu tür kanser başlangıcına karsinomlar denilmektedir (Thiery ve Chopin 1999). Epitel doku mekanik koruma sağlar, salgılama ve emilimde görev alır. Diğer bir önemli görevi ise eksojen toksinlere ve bulaşıcı organizmalara karşı koruma sağlamasıdır (Dow ve Davies 2003). Epitel dokudaki hücreler birbirleri ile çok sıkı bağlantılar yaparlar ve hücreler arası boşluk kalmayacak şekilde paketlenirler. Epitel hücreleri arasındaki bu sıkı bağlantılardan dolayı bu

hücreler aynı zamanda kadherin tarafından düzenlenen güçlü hücre-hücre etkileşimlerine de sahiptirler. Bu etkileşimler hücrelere sabitlik kazandırır ve bu sebeple epitel hücreler bulundukları ortamda hareketsizdirler (Gloushankova vd. 2017). Kanser oluşumunda ise aynı tip iki hücre arasında olan kadherine bağlı adezyonlar büyük bir rol oynamaktadır. Kadherin proteinlerinde meydana gelen herhangi bir fonksiyonel düzensizlik ve özellikle E-kadherin miktarındaki azalma invazif kanser hücrelerinin en belirgin karakteristik özelliklerindendir (Kaszak vd. 2020). Kadherin-1 veya E-kadherin genindeki kayıp ve genin az eksprese olması, ölümsüzleştirilmiş ve invazif fenotipteki hücrelerin meydana gelmesini indüklediğinden dolayı metastaz baskılayıcı gen olduğu literatürde yapılan çalışma ile kanıtlanmıştır (Onder vd. 2008). E-kadherin geninde azalma meydana gelmesi, epitel dokudaki hücrelerin bağlantılarının zayıflaması ile doku gevşemesine yol açarak epitel hücrelerin mezenkimal bir karaktere dönüşmesini ifade etmektedir. Bu sebeple, EMT sürecinin başlaması, henüz metastazik özellikte olmayan kanser hücrelerinin invazif (istilacı) karakter kazanarak metastazik fenotip sürecine girmeye başladığını göstermektedir (Brabletz vd. 2018).



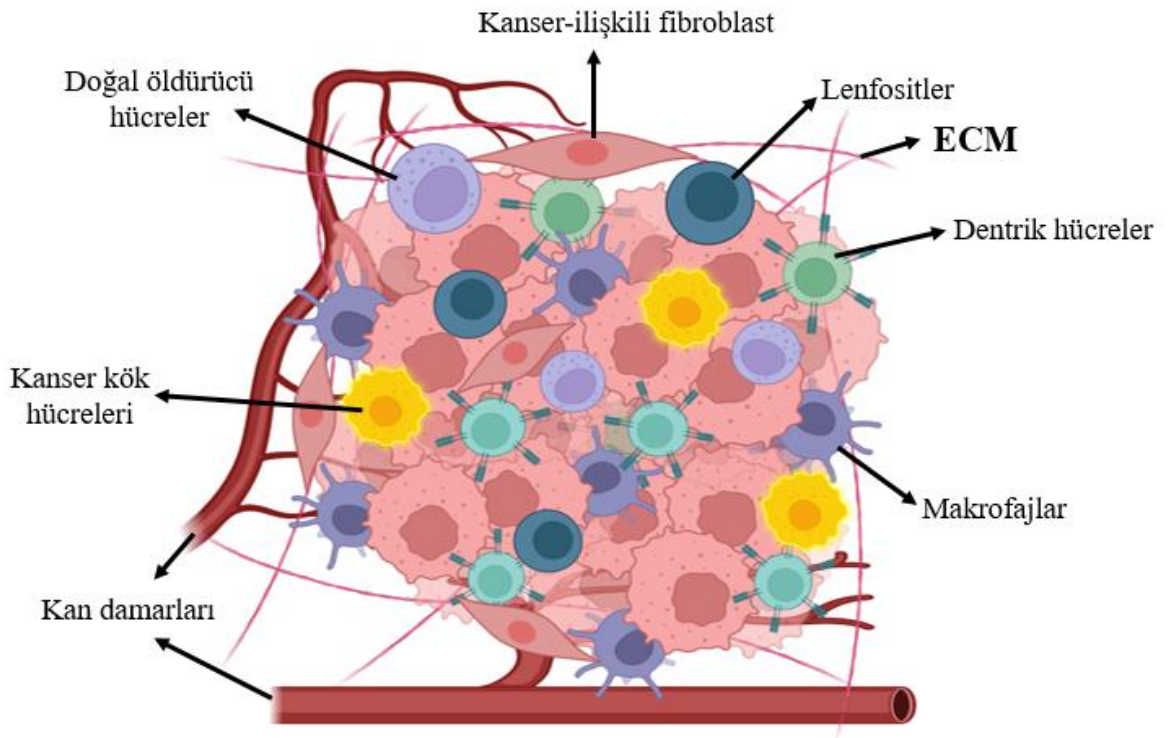
Şekil 2.3 İlk aşama olan EMT geçişinde, dönüştürülmüş epitel hücreleri çoğalır ve birincil tümörü oluşturur. Ardından kanserin ilerlemesi sırasında MET geçişi meydana gelerek ikincil tümör oluşur.

EMT sürecinde, birincil tümör bölgesinde bulunan kanser hücreleri invazif özellik kazanarak diğer bir ikincil doku veya organlara göç etmeye başlarlar (Nieto 2017). Bu durumun tam tersi olan MET sürecinde ise, kanser hücreleri ikincil bölgeye ulaşmış ve bu bölgede kolonileşerek metastaz yapmış durumda bulunmaktadır (Comoglio vd. 2018). Böylece, metastaz sürecinin başlangıcında EMT sürecine giren kanser hücreleri, ikincil bölgeye tamamen göç edip kümelenmeye başladıklarında MET sürecine girmektedirler. Metastaz başlangıcında, EMT'ye maruz kalan kanser hücreleri ilk önce hücre-hücre etkileşimlerine duyarsız kalarak adezyon özelliklerini kaybederler ve göç edebilme yeteneğini kazanırlar (Le Bras vd. 2012). Daha sonra invazif özellik kazanan

kanser hücreleri, dolaşımdaki kan damarlarına girerler. Böylece EMT sürecinden MET sürecine geçen hücreler tamamen metastazik karakter kazanarak uzak doku veya organlara ulaşırlar ve yeni bir ikincil tümörü oluştururlar.

2.6 Kanser Mikroçevresi

Kanser mikroçevresi, kanser hücrelerinin yanısıra kanser kök hücrelerini, bağışıklık hücrelerini, fibroblastları, sinyal moleküllerini ve hücre dışı matrisi (ECM) içeren ortam olarak tanımlanmaktadır. Kanser hücreleri hücre dışı sinyaller salarak, tümör anjiyogenezini teşvik eder ve periferik immün toleransı indükleyerek mikroçevredeki bağışıklık hücrelerinin kanserli hücrelerin büyümesine katkıda bulunmasını sağlayabilirler.



Şekil 2.4 Kanser mikroçevresi, kanser hücreleri başta olmak üzere kanser kök hücreleri, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri ve tüm hücrelerin birbiri ile etkileşimini sağlayan ECM'den oluşur.

Tümör mikroçevresinin en önemli bileşeni olan ECM, hücreye yapısal ve biyokimyasal destek sağlar. Bunun yanı sıra, kanser metastazı için söz konusu olan hücre-hücre etkileşimlerinin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynayan ECM’de gerçekleşen bu etkileşimler sayesinde, kanser hücreleri metastazın başlaması için ilk aşama olan invaziflik özelliklerini kazanmaya başlarlar. ECM’in kanser hücrelerine kazandırdığı diğer bir önemli özellik ise tümör mikroçevresinde meydana gelen hücre-ECM ve hücre-hücre etkileşimlerinin düzenlenmesi ile kanser hücrelerinin EMT mekanizması aktive olarak, kanserin orjinal doku veya organdan komşu bölgelere migrasyonunu sağlamasıdır (Winkler vd. 2020). Günümüzde kanser mikroçevresini taklit edebilmek amacı ile ECM-mimetik biyomalzemelerin tasarlanması büyük bir önem kazanmaya başlamıştır. Kanser hücrelerinin biyomalzemeler üzerindeki hücresel davranışları hakkında bilgi edinmek ve mekanik/biyolojik etkilerini inceleyerek metastaz süreçlerini aydınlatmak, güncel çalışma konuları arasında yer almaktadır (Berl vd. 2018, Kim vd. 2021).

2.7 Hidrojeller

Hidrojeller biyomalzemelerden türetilen, çeşitli polimer zincirlerinin kimyasal veya fiziksel yollarla çapraz bağlanması sonucunda oluşan üç boyutlu bir homo veya kopolimerik sistem ağıdır. Hidrojellerin en önemli özellikleri, su ile etkileşime girdiklerinde çözünmemeleri ve çözücüyü içersine alarak şişme özelliği göstermeleridir (Mahinroosta vd. 2018). Su, insan vücudunun en büyük bileşeni olduğundan dolayı, hidrojellerin su tutma özellikleri çok büyük bir önem arz etmektedir. Yapılarını koruyarak, kendi kütlelerinin en az %20 si kadar su alma yeteneğine sahip olduklarından dolayı hidrofilik polimerlerdir. Hidrojeller diğer biyomalzeme türleri ile karşılaştırıldığında (nanopartiküller, metaller, seramikler vb.), ayarlanabilir biyobozunurlukları ve gözenekli yapılarının mevcut olması gibi avantajlara sahiptir (Annabi vd. 2010). Aynı zamanda hidrojeller, yüksek doku benzeri su içeriğinden dolayı besinlerin girişi ve metabolitlerin atılımı için gerekli olan geçirgen bir biyolojik karaktere sahiptir. Hidrojel ortamında kültür edilen hücreler, birbirleri ile daha iyi etkileşim yaptıklarından ve potansiyel fenotiplerini kendi doğal ortamlarındaki gibi

yansıtılabildiklerinden dolayı, hidrojeller doku mühendisliği iskeleleri için en uygun biyomalzemelerdir (Lee vd. 2018).

Son zamanlarda hidrojeller yüksek su tutma kapasitesi, esneklik ve biyouyumluluk gibi benzersiz özelliklerinden dolayı çok popüler hale gelmiştir. Günümüzde kontakt lenslerde, doku mühendisliği iskelelerini tasarlamakta ve ilaç dağıtım sistemleri gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Shykla vd. 2021, Sharifi vd. 2021). Hidrofilik polimerlerin, çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler uygulanarak çapraz bağlanması ile meydana gelen hidrojeller, canlı dokuyu taklit edebilme yeteneklerinden dolayı rejeneratif tıp ve biyomedikal alanlarda büyük bir umut olmuştur.

2.8 Hidrojellerin Çapraz Bağlanması

Çapraz bağlama işlemi iki polimer zincirinin birbirine bağlanılmasını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Bu bağlar doğal veya sentetik polimerler arasında olan kovalent ve iyonik bağlar olarak bilinmektedir (Lu vd. 2018). Hidrojeller, fiziksel ve kimyasal metodlar olmak üzere iki farklı şekilde çapraz bağlanabilmektedirler.

2.8.1 Hidrojellerin fiziksel yollar ile çapraz bağlaması

Fiziksel çapraz bağlama; koordinasyon bağı, hidrojen bağı, iyonik etkileşimler ve van der Waals etkileşimi gibi kovalent bağ dışındaki etkileşimleri kullanarak çapraz bağlama stratejisi ile açıklanmaktadır. Fiziksel metodlarla çapraz bağlanan hidrojeller, tersinir sistemlerdir ve sıvı formdan hidrojel formuna sürekli bir dönüşüm söz konusudur (Cao vd. 2018).

2.8.2 Hidrojellerin kimyasal yollar ile çapraz bağlanması

Kimyasal metodlarla çapraz bağlama ise, çapraz bağlayıcı kimyasal maddeler kullanılarak iki polimer zinciri arasındaki kovalent bağ oluşumunu sağlayan metodlardır. Çapraz bağlayıcı malzeme, polimerin hidroksil (-OH), karboksil (-COOH) ve amin (-NH₂) gibi fonksiyonel grupları ile reaksiyona girerek hidrojel oluşumunu sağlamaktadır (Nezhad-

Mokhtari vd. 2019). Kiyasal apraz bağlama metodları yüksek enerjili ışma ile çapraz bağlama ve enzimatik çapraz bağlama olarak iki alt başlık altında sınıflandırılmaktadır.

2.8.2.1 Foto-apraz bağlama

Foto-apraz bağlama, radikal oluşturma özelliğine sahip fotobaşlatıcı kimyasalların çözeltiye eklenmesi ve yüksek enerjili ışmaya (Ultraviyole-UV, Gamma vb.) maruz bırakılması ile gerçekleştirilir. Çapraz bağlayıcı (fotobaşlatıcı) ve polimerin yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplar arasında foto kaynaklı radikalik reaksiyonlar meydana gelerek sıvı formda olan çözelti hidrojel haline dönüşür (Wang vd. 2021). Günümüzde, hidrojel oluşturmak için hangi çapraz bağlama metodunun kullanılması gerektiği henüz kesin bir şekilde cevaplanamamıştır. Fiziksel metodlarla çapraz bağlanan hidrojellerde düşük mekanik dayanım gözlemlenirken, yüksek enerjili ışma ile çapraz bağlanan jellerde ise radyasyona bağlı sitotoksisite gözlemlenmiştir (Rebers vd. 2021). Bu sınırlamalar, doğal olarak oluşan enzimler yolu ile çapraz bağlama yapılarak aşılabilir hale gelmiştir.

2.8.2.2 Enzimatik apraz bağlama

Hidrojellerin gerekli substrat varlığında tirozinazlar, transferazlar ve peroksidazlar gibi enzim sistemleri kullanılarak çapraz bağlanmasına dayanır. Katalizör olarak görev yapan enzim, ortama gerekli substrat eklendiğinde enzim-substrat kompleksi olan ara ürünü oluşturur ve daha sonra bu ara ürün polimer zincirinin yan dallarındaki fonksiyonel gruplar ile reaksiyona girerek çapraz bağlama işlemini gerçekleştirir (Teixeira vd. 2012).

2.9 Hidrojellerin Kaynağına Göre Sınıflandırılması

Hidrojeller genel olarak kaynaklarına göre doğal, sentetik ve hibrit hidrojeller olarak üç grupta sınıflandırılmaktadır.

2.9.1 Doğal hidrojjeller

Doğal hidrojjeller, doğal kaynaklardan elde edilen biyomalzemelerden hazırlanan jellerdir. Doğal olarak elde edilen hidrojjeller; protein-bazlı hidrojjeller, polisakkarit bazlı hidrojjeller ve dokuların hücresizleştirilmesi ile türetilen hidrojjeller olarak üç alt başlık altında sınıflandırılabilir. Doğal jeller vücudumuzda bulunan proteinlerden ve ECM bileşenlerinden oluştuklarından dolayı doğal biyoyumluluk ve biyoaktiflik gibi avantajlı özelliklere sahiptirler (Dutta vd. 2021). Diğer bir en önemli özellikleri ise gelişmiş hücre yapışması ve çoğalması gibi birçok hücresel fonksiyonu desteklediğinden dolayı kök hücre, kanser ve doku-rejenerasyonu alanlarında büyük bir kullanım platformu sunar (Chaicharoenaudomrung vd. 2019). Doğal hidrojjeller yapıları ve özelliklerinden dolayı, elde edildikleri doğal yumuşak dokuyu kolaylıkla taklit edebilmektedirler. Ancak mekanik dayanımları düşüktür ve sert dokuları taklit etmekte yetersizdirler (Gomez-Florit vd. 2020). Buna ek olarak tekrarlanabilirlikleri düşük olduğundan dolayı kontrol edilebilirlikleri zordur. Bu sebeple, her bir izolasyon ve sentez sırasında yüksek varyasyona neden olabildiklerinden dolayı kullanımları hala daha sınırlı kalmaktadır.

2.9.1.1 Jelatin ve hidrojel yapısı

Jelatin hayvanların deri, kıkırdak, kemik ve tendonlarında bulunan kollajenden izole edilen doğal bir biyopolimerdir. Kollajen proteininin üçlü sarmal yapısı çeşitli asit veya bazlarla denature edildiğinde iki çeşit jelatin türeği oluşmaktadır. Kısmi asidik hidroliz işlemi uygulanarak Jelatin Tip-A veya alkali hidroliz uygulanarak Jelatin Tip-B elde edilebilmektedir. Jelatin Tip-A asit ile hidroliz edildiğinden yapıdaki glutamin ve asparajin aminoasitleri karboksil grubuna dönüşmektedir. Bu sebeple, doku mühendisliğinde çeşitli iskelelerin yapım aşamasında Jelatin Tip-A daha çok tercih edilmektedir (Bello vd. 2020). Jelatin, biyoyumluluk, çözünürlük, düşük immünojenisite ve hücre yapışmasını destekleyen bir çok önemli özelliğe sahiptir. 18 amino asit türevinden oluşan Jelatin polimerindeki Glisin, hücre yapışmasını modüle eden en baskın amino asittir (Wu vd. 2011).

Jelatin-bazlı hidrojel oluşturabilmek için kullanılan en yaygın metod, Jelatin'in metakrilik anhidrit ile modifiye edilmesi sonucunda çok kolay bir şekilde foto çapraz bağlanabilen jelatin-metakriloil (GelMA) sentezidir. Diğer bir metod ise enzimatik yollarla çapraz bağlanabilen Jelatin-Tiramin (GTA) sentezine dayanmaktadır. Jelatin, amino asit türevi olan tiramin ile modifiye edilir ve ortama gerekli enzim ile substratı eklendiğinde hidrojelleşme anında başlamaktadır. GTA hidrojel GelMA ile kıyaslandığında, GelMA sentezi sırasında sentetik bir anhidrit olan metakrilik anhidrik kullanılır, fakat GTA sentezi sırasında herhangi bir sentetik bileşen kullanılmamaktadır. Bu sebeple GelMA yarı-sentetik hidrojel sınıfında gruplandırılırken, GTA tamamen doğal bir hidrojel yapısına sahip olduğundan dolayı biyoaktifliği ve biyouyumluluğu daha üstündür. Aynı zamanda GelMA foto çapraz bağlanabilir olduğundan dolayı radyasyona bağlı sitotoksikite gözlemlenebilirken GTA için herhangi bir sitotoksik özellik söz konusu olmadığından GTA, GelMA'ya göre daha çok tercih edilen bir hidrojeldir.

2.9.1.2 Hyaluronik asit ve hidrojel yapısı

Hyaluronik asit (HA), β -1 $\rightarrow$ 4-D-glukuronik asit ve β -1 $\rightarrow$ 3-N-asetilglukozamin birimlerinin tekrar etmesi ile vücudun doğal olarak ürettiği bir glikozaminoglikandır (GAG) ve cilt, bağ dokular ve gözlerde yüksek oranda bulunur. Doğal ECM'in temel bileşeni olan HA, çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar. Biyolojik uyumluluğuna ek olarak, biyolojik olarak parçalanabilir olması ve immünojenik etkisinin az olması sebebi ile HA, istenilen morfoloji, sertlik ve biyoaktiviteye sahip hidrojellerin yapımında kullanılan en ideal biyopolimerlerden biridir (Dicker vd. 2014). Çeşitli kanser hastalıklarında yüksek HA seviyeleri, HA'nın kanser çalışmalarında bir belirteç olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. HA, kanser fenotipine sahip hücrelerin spesifik reseptörlerine bağlanır ve hücre içi sinyalleri ileterek tümör mikroçevresini düzenler (Peng vd. 2016). Belirtilen bu özellikler sebebi ile, kanser çalışmalarında tümör mikroçevresini taklit edebilmek amacı ile HA-bazlı hidrojeller yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.9.2 Sentetik hidroojeller

Çeşitli biyomimetik yapı iskeleleri arasında diğer bir grup olan sentetik hidroojeller, laboratuvar koşullarında çeşitli kimyasallar kullanılarak sentezlenen malzemelerdir. Çoğu zaman sentetik hidroojeller doğal hidroojellere kıyasla daha kullanışlıdır çünkü laboratuvar ortamında sentezlendiklerinden dolayı yüksek mekanik dayanım gibi özellikler malzemeye kolaylıkla kazandırılabilir. Fakat sentetik hidroojeller doğal hidroojeller gibi biyoaktif ve biyouyumlu değildirler. Çoğu sentetik hidroojeller, kimyasal yapılarından dolayı hücre yapışmasını desteklememektedirler ve bu sebeple çalışmalarda kullanılmadan önce hücre yapışmasını destekleyecek şekilde modifiye edilmeleri gerekmektedir. Ayrıca tamamen kimyasallardan üretildiklerinden dolayı sitotoksikiteye neden olabilirler ve biyobozunma karakterleri zayıftır (Madduma-Bandarage ve Madihally 2021). Lizin amino asidi ile modifiye edilen polietilen glikol bazlı hidroojeller, in-vitro çalışmada lizin-kaynaklı hücre yapışmasını desteklemesi ve in-vivo çalışmalarda herhangi bir toksik etki yaratmamasına ek olarak düşük immünojenik etki göstermesi nedeni ile biyomedikal uygulamalardan yaygın olarak kullanılmaktadır (Carranca vd. 2021).

2.9.3 Hibrit hidroojeller

Yeni yaklaşımlar, ayarlanabilir salım kinetiği ve hücre davranışlarını incelemek adına hem sentetik hem de doğal polimerleri birleştiren karmaşık hidroojellerin tasarlanması ile klinik ve araştırma uygulamalarının gelişmesine yol açmıştır. Hibrit hidroojeller genellikle doğal ve sentetik hidroojellerin özelliklerini birleştirerek, birbirinin dezavantajını kapatmayı hedeflemek adına tasarlanan sistemlerdir. Günümüzde, hem sentetik hemde doğal hidroojellerin avantajlarını birleştirmek için hyaluronik asit, kitosan gibi doğal kaynaklardan elde edilen polimerler, poli(N-izopropilakrilamid) ve polivinil alkol gibi sentetik polimerlerle birleştirilmiştir (Zhu vd. 2018, Sánchez-Aguinagalde vd. 2021). Hibrit jellerin kullanımı sadece sentetik ve doğal biyomalzemelerin birleştirilmesi ile sınırlı kalmayıp, daha doğal, biyoaktifliği yüksek ve multi-fonksiyonel bir sistem geliştirebilmek için iki doğal polimerin birleştirilmesi önem kazanmaya başlamıştır.

2.10 Biyomimetik Hidrojellerin Kanser Modellemesindeki Önemi

Biyomalzemelerin geliştirilmesi, kanser mikroçevresini taklit edebilmek ve hücrelerin malzeme üzerindeki davranışları ile metastazik karakterleri arasındaki ilişkiyi aydınlatmak adına kanser biyolojisi alanında önem kazanmaya başlamıştır. Bu biyomimetik modeller, kanser hücrelerine hücre dışı matris sağlayarak spesifik kanser türü ve mikro ortamı için uyarlanmış biyolojik, kimyasal ve mekanik koşullar dahil olmak üzere in vivo tümör mikro ortamını anlaşılır kılmak üzere tasarlanmaktadır (Caballero vd. 2022). Hücreler geleneksel olarak bir kültür ortamının mevcudiyetinde hücre kültürü kaplarının yüzeylerine bağlanmayı gerektirir. Hücre kültürü modelleri kolaylık ve kontrol edilebilirlik sağlamasına rağmen sadece hücre-hücre etkileşimlerini sağladıklarından dolayı kanser mikro ortamını temsil etmek açısından yetersizdir (Baghban vd. 2020). Kanser hücrelerinin davranışını ve metastazını anlayabilmek, hücre-hücre etkileşimine ek olarak hücre-matris etkileşimlerinde sağlandığı ve tümör-sferlerinin oluşmasına imkan sağlayan ECM-mimetik hidrojellerin geliştirilmesi ile sağlanabilmektedir (DePalma vd. 2022).

2.11 Hidrojellerin Kanser Mekanotransdüksiyonu ve Metastazına Etkisi

Mekanik transdüksiyon, hücrelerin mekanik bir uyarıyı spesifik biyokimyasal tepkilere çevirdiği süreçtir (Iskratsch vd. 2014). Bu mekanik uyaranlar arasında kesme gerilmeleri, hücre dışı matris sertliği, komşu hücrelerle temas ve dokunun genel geometrisi yer alabilir (Romani vd. 2021). Her mekanik özellik, bir dokunun homeostazını sürdürmek için biyokimyasal yolların yukarı ve aşağı regüle edilmesi gerektiği konusunda hücrelere bilgi verir. Bu uyaranlar, hücrenin polarite ve şekil gibi yapısal özelliklerini değiştirmektedir (Sun vd. 2022).

Tümör hücrelerinin agresif ve göçmen bir fenotipe dönüşmesi, vücutta kanser hücrelerinin yayılmasına yol açan önemli bir adımdır. Tümör mikroçevresi hem mekanik hem de biyolojik olarak değişken bir ortama sahiptir (Li vd. 2020). Kanser hücreleri mekanik olarak duyarlı olduklarından dolayı içerisinde bulunduğu ECM'nin biyolojik ve mekanik ipuçlarına yanıt vermektedir. Aynı zamanda kanser hücrelerinde

EMT ve toplu göç sırasında gözlemlenen morfolojik değişimler, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi ve hücre yapışmasındaki sapmalar tarafından yönlendirilir (Burgos-Panadero vd. 2019). Bu sebeple tümör hücrelerinin malign transformasyonu sırasında mekanik ve mekanik sinyalleme rolü kritiktir. Dolayısıyla kanser hücre ECM'sini taklit etmek üzere tasarlanmış hidrojel iskelelerin mekanik ve reolojik özellikleri; hücre morfogenez, migrasyon ve metastaz sürecini anlaşılabilir kılan belirleyici faktörlerdir (Jia vd. 2022).

Kanserin oluşma aşamasında öncelikle hücreleri çevreleyen matris yumuşamaya başlar ve yumuşayan matris kanser hücrelerinin hareketliliğini artırarak invazif karakterlerini kazanmasını sağlar (Wisdom vd. 2018). Böylece hücreler metastaz yapacakları doku veya organlara kolaylıkla göç etmeye başlarlar. İnvazyon ve migrasyon sürecinin ardından ikincil doku veya organa metastaz yapan hücreler, burada kolonize olarak büyük katı tümörleri oluştururlar (Gkretsi vd. 2018). Tümörün oluşum sırasında hücreleri çevreleyen matris sertliğinin artması ise biyomalzeme-kanser çalışmalarında biyomalzemenin mekanik özelliğinin ayarlanmasının önemini vurgulamaktadır. Kanser hücrelerinin mikroçevreleriyle olan etkileşimleri, özellikle hücrelerin karşılaştığı mekanik kuvvetler, kanser hücrelerinin yapışmasını ve davranışlarını etkilemektedir (Selig vd. 2020). Bu sebeple, biyomimetik-ECM olarak kullanılacak olan hidrojellerin mekanik özellikleri, kanser hücrelerinin yapışma davranışındaki değişikliklere bağlı olarak metastatik süreçteki rollerini anlamak açısından önem arz etmektedir.

2.12 Kanser Hücrelerinin Hidrojeller Üzerinde Yapışma ve Kümelenme Davranışının Ayarlanması

Kanser araştırmalarında, kanser hücrelerinin farklı fenotiplerinden ve işlevlerinden sorumlu olan sinyal yollarını ve mekanizmalarını incelemek amacıyla in vitro hücre tabanlı modeller yaygın olarak kullanılmaktadır (Katt vd. 2016). Kanser hücrelerinin göçünü ve invazifliğini düzenleyebilmek ve böylece metastatik karakterini kontrol edebilmek açısından ECM olarak kullanılacak yapı iskelesinin fiziksel özellikleri büyük önem arz etmektedir (Kai vd. 2019). Hidrojellerin değişen sertlikleri, aynı zamanda jelin mikro yapısında değişiklikler meydana getirir ve hücre yapışmasının düzenlenmesini

sağlar (Fernando vd. 2021). Böylece hidrojellerin mekanik sertliğini ayarlayarak kanser hücrelerinin ve tümör sferoidlerinin agresif davranışlarını düzenlemek mümkündür.

Tümör ECM'sini taklit etmek için kullanılan yumuşak veya sert yapıya sahip hidrojeller, doğrudan kanser hücrelerinin göç etme ve invazif karakterlerini kazanmasını etkilemektedirler. Sert yapıda ve mekanik dayanımı yüksek hidrojeller hücrelerin hareketliliğini kısıtlar. Böylece, sert matrislerde hücre-ECM etkileşimleri minimum düzeye inerken, hücre-hücre etkileşimleri artarak kanser hücrelerinin matris içerisinde kümelenmesine neden olur. Düşük konsantrasyondaki ECM-mimetik hidrojeller ise, kanser hücrelerin hareketlilik kazanmasını sağlayarak hücrelerin invazifliğini aktive eder ve matrise yayılmasını sağlar (Pradhan ve Slater 2019). Bu sebeple, kanser hücrelerinin ECM ile etkileşimini kontrol edilebilir kılan bir hidrojel sistemini tasarlamak, kanser hücrelerinin morfogenezle bağlı metastazik karakterlerinin anlaşılabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

3. KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser mekanizmasını ve metastazını anlamak için doğal kaynaklı ECM-biyomimetik hidrojellerin kullanılması, kanser hücrelerinin doğal ortamlarındaki davranışını taklit edebilmek için çok önemlidir. Kanser hücresi davranışını, kümelenmesini ve metastaz mekanizmasını incelemeye yönelik, Jelatin ve Hyaluronik Asit türevli biyomalzemelerin kullanımını içeren çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Tang vd. (2017) tarafından yapılan ve ilaç geliştirmeyi hedefleyen bir çalışmada tiramin ile modifiye edilmiş hyaluronik asit (HTA) sentezlendi. Prostat kanseri hücreleri (PCa), HTA içerisine üç boyutlu (3B) kültür şeklinde enkapsüle edildi ve kontrol grubu olarak hücre kültür kabının zemine ekilen PCa hücreleri ile karşılaştırıldı. Yapılan incelemeler sonucunda plastik yüzeyinde iki boyutlu (2B) kültür edilen kanser hücrelerinin tek-katmanlı hücre morfolojilerine karşı, HTA içerisine enkapsüle edilen PCa hücrelerinin tümör sferoidleri oluşturdukları gözlemlendi. Gen ekspresyon analizinde HTA-PCa sistemi için anlamlı bir şekilde yüksek EMT ekspresyonu elde edilmesi, HTA hidrojelinin kanser hücrelerinin invazif ve metastazik potansiyellerini arttırdığını kanıtladı. Yapılan bu çalışma ile HTA hidrojelinin kanser hücresi kümelenmesi ve sferoidleri oluşturması için uygun bir sistem olduğu karakterize edildi ve HTA hidrojelinin, antikanser ilaç geliştirmek için ideal bir hidrojel sistemi olduğu belirtildi.

Kanser hücreleri metastaz sürecine girdiklerinde ECM'leri ile olan etkileşimleri zayıflar ve adeziv özelliklerini kaybederek kan dolaşımına göç etmeye yönelirler. Bu sebeple, kanser hücrelerinin davranışını ve yapışma özelliğini geliştirmek üzere yapılan biyomalzeme geliştirme çalışmaları önem kazanmaya başlamıştır. Sun vd. (2019) tarafından Jelatin-türevli hidrojellerin kanser hücre davranışına etkisini incelemeye yönelik yapılan bir çalışmada Jelatin, metakrilik anhidrit ile modifiye edilerek sentezlendi ve Jelatin ile GelMA'nın gözeneklilik yapısı Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) analizi ile karakterize edildi. Daha sonra fotoçapraz bağlayıcı kullanılarak GelMA çözeltilerinden hidrojel elde edildi ve GelMA hidrojelleri üzerinde meme kanseri hücreleri (MCF-7) kültür edildi. Kontrol grubu olarak MCF-7 hücreleri hücre kültür kabında iki boyutlu kültür edildi ve Canlı/Ölü testi yapılarak kanser hücresi

davranışı analiz edildi. SEM görüntülerinden, Jelatinin katmanlı ve üst üste birikmiş kapalı gözenek yapısına kıyasla, sentezlenen GelMA'nın daha homojen fiberlere sahip olduğu belirlendi. GelMA hidrojelinin ise hücre yapışmasını destekleyecek açık ve homojen olarak dağılmış gözeneklere sahip olduğu SEM görüntüleri ile desteklendi. Canlı/Ölü testi sonucunda ise GelMA üzerindeki hücrelerin canlılığı ile kontrol olan hücre kültür kabındaki hücrelerin canlılığı arasında belirgin bir fark gözlemlenmedi. Ayrıca GelMA konsantrasyonu artırıldığında, hücre morfolojilerinin düşük konsantrasyondaki hidrojellere göre daha belirgin olduğu yapılan immünofloresan boyaması ile gözlemlendi. Böylece, GelMA'nın mekanotrasduksiyon ile ilişkili genetik yolları aktive ederek MCF-7 hücrelerinin yapışabilirliğini ve morfolojilerini düzenlediği kanıtlandı. Sonuç olarak, GelMA'nın hücresel ECM'i taklit edebilen ve hücresel davranışları destekleyen bir hücre kültür matriksi olduğu kanıtlanmış oldu.

Son zamanlarda kanser hücresi davranışını incelemeye yönelik multi-fonksiyonel hibrit jellerin geliştirilmesine olan ilgi artmıştır. Diğer bir yandan, geliştirilen hidrojel platformlarında bileşen konsantrasyonlarına bağlı olarak kanser hücrelerinin yumuşak ve sert matrislerdeki davranışını ve metastazik özelliklerindeki değişimi incelemeyi hedefleyen çalışmalar da önem kazanmaya başlamıştır. Lee vd. (2019) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, doğal kanser mikroçevresini taklit etmek ve hücre davranışını gözlemlemeye yönelik enzimatik çapraz bağlanabilir tiyolatlanmış Jelatin (GtnSH) ve tiramin ile modifiye edilmiş poli(etilen glikol) (PEG-TA) sentezlendi. Burada GtnSH ve PEG-TA çözeltileri karıştırılarak bir hibrit karışım formülasyonu elde edildi. Çapraz bağlama işlemi uygulandığında, çift çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleşerek Gtn-SH ve PEG-TA'nın iç içe geçen polimerik ağ hidrojellerini (IPN) oluşturdıkları gözlemlendi. Daha sonra insan fibrosarkom hücrelerinin antikanser ilaç olan 5-florourasil'e (5-FU) karşı yaşayabilirliklerini ve dirençlerini gözlemlemek için hücreler, jel üzerinde ve içerisinde 2B ve 3B olacak şekilde kültür edildi. Elde edilen sonuçlar, ilacın 3B kültür edilen hücrelerde daha az sitotoksik etki yarattığını gösterdi. Daha sonra farklı matriks sertliklerinde kanser hücrelerinin ilaca karşı davranışını gözlemlemek için, düşük ve yüksek konsantrasyonlarda GtnSH/PEG-TA jelleri hazırlandı ve kanser hücreleri jeller içerisinde kültür edildi. Her bir jele aynı konsantrasyonda 5-FU ile muamele edildi. Analiz sonuçlarına göre, ilginç bir şekilde

yumuşak matrislerde hücre çoğalmasının sert matrislere kıyasla daha yüksek olduğu ve ilacın sitotoksik etki göstermediği gözlemlendi. Yapılan bu çalışma ile, geliştirilen hidrojel platformunda bileşen konsantrasyonunun değişmesi ile değişen matris sertliğinin hücresel canlılığa etkisi kanıtlandı. Buna ek olarak, IPN hidrojellerinin kanser biyolojisini incelemek ve antikanser ilaç geliştirmek için ideal bir platform olduğu kanıtlandı.

Pal vd. (2019) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, kanser hücrelerinin EMT ve metastatik özelliklerini biyomalzemeler üzerinde incelemek için GelMA-Poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) bileşimi olan biyomimetik bir hibrit hidrojel sistemi tasarlandı. Bu çalışmada GelMA kanser hücrelerinin doğal mikroortamını taklit etmek için kullanılırken, elektro-eğirme yöntemi ile sentezlenen PLGA ise doğal kanser ECM'sinin lifli yapısını taklit etmek amacı ile kullanıldı. Hazırlanan GelMA çözeltisinin içerisine insan meme kanseri hücreleri ve mide kanseri hücreleri eklendi. Ardından elektrospun PLGA iskeleleri GelMA-hücre karışımını içeren çözeltiye daldırıldı ve UV ile GelMA'nın çapraz bağlanması sağlandı. Kontrol grubu olarak yalnızca GelMA hidrojeli ve PLGA iskelelerinin olduğu gruplar göze alındı. EMT geçişini ve metastatik davranışı gözlemlemek için EMT ile ilişkili transkripsiyonel faktörler gerçek zamanlı PCR analizi ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, hibrit yapı iskelesinde EMT ile ilişkili Snail1, Zeb1 ve Twist2 genlerinin kontrol gruplarına göre önemli ölçüde bir fark ile yüksek regüle edildiği gözlemlendi. Aynı zamanda, epitel hücre belirteci olan E-kaderin aşağı regüle olurken, mezenkimal belirteç olan N-kaderin'de ise yüksek ekspresyon seviyeleri saptandı ve bu bulgular, hibrit hidrojel iskelesinde kültür edilen kanser hücrelerinin EMT sürecinin aktif olduğunu kanıtladı. Yapılan bu çalışma ile GelMA-PLGA hibrit yapı iskelesinin EMT sürecini tetiklediğinden dolayı metastaza karşı antikanser davranışları incelemek için uygun bir sistem olduğunu gösterdiler.

Yapılan bu çalışmalarla, hyaluronik asit türevli hidrojellerin, kanser hücrelerinin kümelenme ve sferoid oluşturma davranışını geliştirdiğini ve jelatin türevli hidrojellerin ise hücre adezyonuna ve morfolojisine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Fakat, yapılan çalışmalar daha çok GelMA üzerinden incelenmiş ve GTA hidrojelinin kanser hücre

davranışı ve metastazını araştıran çalışmalar araştırılmamıştır. Diğer bir önemli nokta ise hibrit jellerde kanser davranışları incelenmesine rağmen, çalışmalar doğal-sentetik biyomalzeme bileşimini içermekte ve literatürde, iki doğal biyomalzemenin kullanıldığı yüksek biyoaktifliğe sahip sistemlerin kullanıldığı çalışmalar az sayıdadır. Kanser hücre davranışını ve kümelenmesini incelemek için multi-fonksiyonel ve tamamen doğal hibrit jellerin geliştirilmesi ile kümelenme ve adezyonun kontrol edilebilmesi tezin önemini oluşturmaktadır. Diğer bir yandan, bu güne kadar yapılan çalışmalar 3B sistemlerde çalışılmış ve kanser hücrelerinin metastatik karakterlerinin matriks yüzey etkileşimleri ile nasıl değiştiği ve yüzey etkileşimlerinde rol alan proteinlerin/metabolitlerin hangi yolla metastaz sürecini tetiklediği araştırılmamıştır. Bu sebeple, hücrelerin 2B sistemde kümelenmesini kontrol ederek metastazik karakterlerinin değişimini incelemek bu tez çalışmasının önemini vurgulamaktadır.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

GTA sentezi boyunca kullanılan jelatin, morfolinoetansülfonik asit (MES), N-hidroksisülfosüksinimit (NHS), 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC), tiramin hidroklorür ve Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini (DPBS), Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edildi. Sentezlenen GTA, Biobase cihazı ile liyoflize edildi.

HTA, Matteo D'Este tarafından sentezlendi ve laboratuvara ulaştırıldı.

GTA ve HTA'nın hidrojelleşmesini sağlamak için kullanılan yaban turpu peroksidaz enzimi (HRP) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edildi.

Sentezlenen GTA'nın, GTA ve hibrit HTA-GTA hidrojellerinin karakterizasyon çalışmalarında Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) spektrumları, Shimadzu IRAffinity-1 model spektrometre ile ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrumları, Bruker Biospin spektrometresi ile elde edildi. Reolojik ölçümlerde MCR 301 reometre (Reometer Physica, Almanya) cihazı kullanıldı. Mekanik analiz testi ölçümleri CellScale (Kanada) ve SEM görüntüleri FEI 430 Nova NanoSEM (ABD) cihazı ile elde edildi.

Hazırlanan hidrojellerin sterilizasyonu, UV lambalı (254 nm) laminar akış kabini (Heal Force,) gerçekleştirildi.

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin çoğaltıldığı ve deneylerin yapıldığı steril doku kültür kapları (Sarstedt, Almanya), besiyeri olarak kullanılan DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose), besiyeri katkısı olarak kullanılan L-glutamin, penisilin/streptomisin (P/S), fetal sıgır serumu (FBS) ve hücrelerin pasajlanması işleminde kullanılan DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ve tripsin/EDTA

Apoptoz ve nekroza uğrayan hücreleri görselleştirmek için Apoptoz-Nekroz kiti (ab176749, abcam) kullanıldı. Görüntüler Leica DMIL floresan mikroskopunda incelendi.

4.2 Yöntem

4.2.1 GTA sentezi

Enzimatik olarak çapraz bağlanabilir GTA, jelatin ve tiramin hidroklorür arasında NHS / EDC kimyası yoluyla gerçekleşen bir yoğunlaştırma reaksiyonu ile sentezlendi (Sakai vd. 2009). Jelatin %2 g/mL olacak şekilde tartıldı ve 50 mM MES tamponu içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile 60°C'de sürekli karıştırılarak çözündürüldü. Çözünen jelatinin sıcaklığı 25°C'ye düşürüldükten sonra EDC 20 mM, NHS 10 mM ve tiramin hidroklorür 58 mM olacak şekilde tartıldı ve çözeltiye eklenerek kondenzasyon reaksiyonu başlatıldı. Elde edilen çözeltinin pH'sı 0.1 M sodyum bikarbonat (NaHCO_3) kullanılarak 6 ya ayarlandı ve reaksiyonun tamamlanması için 25°C'de 12 saat manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli karıştırma işlemi yapıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen jelatin-tiramin çözeltisi, DPBS kullanılarak çözeltinin hacminin dört katı kadar seyreltildi. Reaksiyon sırasında meydana gelen yan ürünlerin ve reaksiyona girmemiş reaktiflerin çözeltiden uzaklaştırılması için 12-14 kDa kesmeli bir diyaliz membranı kullanılarak 4 gün boyunca diyaliz işlemi yapıldı ve diyaliz membranındaki çözeltilerin içerisinde bulunduğu saf su dört gün boyunca yenisi ile değiştirildi. Diyaliz işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen GTA çözeltisi liyoflize edildi ve kullanıma kadar +4°C'de stoklandı.

4.2.2 GTA'nın kimyasal karakterizasyonu: FTIR ve NMR spektroskopisi

Saf jelatin tozu ve liyoflize edilen toz formundaki GTA'nın FTIR spektrumları 450-4000 cm^{-1} spektral dalga boyu arasında elde edildi. H^1 -NMR analizi için 10-20 mg saf jelatin tozu ve liyoflize edilen GTA, 1 mL döteryum-oksit içerisinde çözüldü ve NMR spektrumları 0-10 ppm arasında elde edildi.

4.2.3 GTA'nın hidrojelleşmesi

GTA, ağırlıkça %5 ve %10 olacak şekilde tartıldı ve homojenlik gözlemlenene kadar DPBS içerisinde çözündürüldü. GTA çözeltilerine 2U/mL olacak şekilde HRP enzimi ilave edildi ve ditiramin köprüsü oluşumu ile meydana gelen ortogonal enzimatik çapraz bağlamayı başlatmak için 2 mM H₂O₂, 1:10 (v/v) olacak şekilde ilave edilerek hidrojelleşme sağlandı.

4.2.4 GTA hidrojelinin karakterizasyonu

Bu bölümde GTA hidrojelinin jelleşme kapasitesini belirleyen reolojik analiz, morfolojik özelliğini belirleyen SEM analizi, bozunma testi, su tutma ve UV geçirgenlik özellikleri gibi malzeme karakterizasyonuna yönelik çalışmalar verilmiştir.

4.2.4.1 Reolojik karakterizasyon: GTA'nın hidrojelleşme kapasitesi

GTA'nın hidrojel oluşturma kapasitesini ölçmek için ağırlıkça %5 ve %10 GTA hidrojelleri hazırlandı. Reometre cihazının parametreleri 25°C ve 0-650 Hz frekans aralığında olacak şekilde ayarlanarak ölçümler alındı.

4.2.4.2 GTA'nın mekanik analiz (sıkıştırma) testi

GTA (ağırlıkça %5 ve %10) hidrojelleri 6 mm çapında ve 1cm yüksekliğinde olan silindir kalıplarda hazırlandı. Ardından 10 kN kapasiteli test cihazının alt plakasına yerleştirilen hidrojeller oda sıcaklığında (25 °C) ve 0.1 mm/dakika hızda sıkıştırıldı. GTA hidrojelleri üst plaka tarafından deforme olana kadar sıkıştırma kuvveti kaydedildi. Ölçüm sırasında gerilim-gerinim eğrisi çizildi. Her numunenin sıkıştırma modülü, gerilim-gerinim eğrisinin lineer alanındaki stres ve gerinimin bir oranı olarak değerlendirildi.

4.2.4.3 Morfolojik karakterizasyon: SEM

%5 ve %10 GTA hidrojenlerinin morfolojik özellikleri SEM çalışması ile analiz edildi. GTA hidrojenleri ağırlıkça %5 ve %10 olacak şekilde hazırlandı ve hazırlanan hidrojenler, %50-100 arasında değişen sulu etanol serilerinden 10 dakika boyunca geçirilerek dehidrate edildi. Ardından, örnekler ince bir altın-paladyum (15 nM) tabakasıyla kaplandı ve elektron mikroskobu altında gözlemlendi.

4.2.4.4 GTA hidrojenlerinin bozunma testi

GTA hidrojenlerinin fiziksel bozunabilirliği degradasyon testi ile araştırmak için ağırlıkça %5 ve %10 GTA hidrojenleri hazırlandı. Hazırlanan hidrojenler -80°C’de dondurulduktan sonra gece boyunca liyoflize edilerek dehidre edildi ve tartıldı (w_0). Ardından dehidre edilen hidrojenler DPBS içerisinde 1,2,5 ve 7 gün süreyle 37 °C’de inkübe edildi ve -80 °C’de dondurulduktan sonra dehidrasyon işlemi tekrarlanarak son ağırlıkları tartıldı (w_f). Hidrojenlerin yüzde bozunma kapasiteleri (% BK) eşitlik 4.1’ye göre hesaplandı.

$$\% BK = (w_0 - w_f) / w_0 \times 100 \quad (4.1)$$

4.2.4.5 GTA hidrojenlerinin su tutma kapasitesinin belirlenmesi

Şişme testi için ağırlıkça %5 ve %10 GTA hidrojenleri hazırlandı ve -80°C’de dondurulduktan sonra liyoflize edilerek kuru ağırlıkları tartıldı (w_1). Tam su alımını sağlamak için hidrojenler deiyonize suda 3 saat inkübe edildi ve ardından yüzeylerindeki fazla su dikkatlice alındıktan sonra su tutmuş hidrojenlerin son ağırlıkları tartıldı (w_2). Hidrojenlerin yüzde su tutma kapasiteleri (% STK) eşitlik 4.2’ye göre hesaplandı.

$$\% STK = (w_2 - w_1) / w_1 \times 100 \quad (4.2)$$

4.2.4.6 GTA hidrojjellerinin UV geçirgenlik özelliğinin test edilmesi

GTA hidrojjellerinin Őeffaflıęını belirlemek için ağırlıkça %5 ve %10 GTA hidrojjelleri hazırlandı ve deiyonize su içeren küvete yerleőtirildi. Ardından 200-700 nm dalga boyunda UV-spektrofotometre cihazı ile UV absorbansı ölçüldü.

4.2.5 Hibrit HTA-GTA hidrojjellerinin hazırlanması

HTA daha önceden sentezlenmiőt ve karakterize edilmiştir (Frayssinet vd. 2020). Saf HTA ve sentezlenen GTA tozları izelge 4.1’de verilen konsantrasyonlarda tartıldı ve DPBS içinde çözündürüldü. Ardından hazırlanan jel çözeltilerine 2U/mL HRP enzimi eklendi. Farklı matris sertliği ve hidrofilikliğe sahip jellerin üzerinde hücre yapışmasının kontrolünü sağlamak için farklı konsantrasyonlarda HTA (ağırlıkça %1 ve %3) ve GTA (ağırlıkça %5 ve %10) zeltileri farklı oranlarda (1:1, 1:2 ve 2:1 v/v HTA-GTA) karıŐtırıldı. Hazırlanan hibrit çözeltilere toplam hacmin 1/10’u kadar 2 mM H₂O₂ ilave edilerek jellerin hidrojelasyonu oda sıcaklığında yaklaşık 1 dakika inkübasyon ile sağlandı.

Çizelge 4.1 Hazırlanan hidrojjellerin konsantrasyonları ve bileşimleri

Hidrojel	BileŐim Oranları (v/v)
A. %1 HTA	
B. %3 HTA	
C. %5 GTA	
D. %10 GTA	
E. %1HTA-%5GTA	1:1, 1:2, 2:1
F. %1HTA-%10GTA	1:1, 1:2, 2:1
G. %3HTA-%5GTA	1:1, 1:2, 2:1
H. %3HTA-%10GTA	1:1, 1:2, 2:1

4.2.6 Hibrit HTA-GTA hidrojenlerinin karakterizasyonu

Bu bölümde %1 HTA-%10 GTA hidrojeninin FTIR spektroskopisi analizi, reolojik analizi ve morfolojik özelliklerini belirlemek amacı ile gerçekleştirilen SEM analizi gibi hibrit jelin karakterizasyonuna yönelik çalışmalar verilmiştir.

4.2.6.1 HTA-GTA hidrojeninin FTIR spektroskopisi analizleri

HTA-GTA hidrojeninin yapısal karakterizasyonunu incelemek için, öncelikle HTA ve GTA hidrojenlerinin FTIR analizi yapıldı. Ardından HTA-GTA hibrit hidrojeninin analizi yapılarak elde edilen FTIR spektrumu, HTA ve GTA hidrojenlerine ait spektrumlar ile karşılaştırıldı. FTIR spektrumları $450-4000\text{ cm}^{-1}$ spektral dalga boyu arasında elde edildi.

4.2.6.2 HTA-GTA hidrojeninin reolojik karakterizasyonu

İlk olarak %1 HTA'nın kovalent çapraz bağlama reaksiyonu ile katı hale dönüşme kapasitesini ölçmek için HRP enzimi içeren HTA çözeltisi reoloji plakası üzerine aktarıldıktan sonra 2 mM H_2O_2 ile çapraz bağlandı ve frekans-tarama (0-600 Hz) reolojisi kullanılarak ölçümü yapıldı. Ardından, %1 HTA-%10 GTA hibrit hidrojeninde moleküller arası etkileşimleri incelemek ve HTA ile GTA arasındaki ön jel oluşumunu ortaya çıkartmak için zaman-tarama modunda reolojik ölçüm yapıldı. HRP enzimi içermeyen ve H_2O_2 ile çapraz bağlama işlemi uygulanmayan %1 HTA ve %10 GTA çözeltileri reoloji plakası üzerinde eşit hacimde karıştırıldıktan sonra depolama (G') ve kayıp modülleri (G'') 1 Hz sabit frekansta, 25°C 'de ve %0.5 gerilmede 30 dakika boyunca MCR 301 reometre marka cihaz ile gözlemlendi. Buna ek olarak, hidrojelasyon sürecini daha iyi gözlemlemek için HRP enzimi içeren %1 HTA ve %10 GTA çözeltileri reoloji plakası üzerinde eşit hacimlerle karıştırıldıktan sonra 2 mM H_2O_2 ile çapraz bağlama işlemi yapıldı ve 0-600 Hz arasında frekans-tarama modunda reolojik ölçüm yapıldı.

4.2.6.3 HTA-GTA hidrojenlerinin mekanik analiz (sıkıştırma) testi

%1-%10 HTA-GTA hidrojenleri 2:1, 1:1 ve 1:2 (v/v) olacak şekilde 6 mm çapında ve 1 cm yüksekliğinde olan silindir kalıplarda hazırlandı. Basma testi bölüm 4.2.4.2’de kullanılan metod ile gerçekleştirildi.

4.2.6.4 HTA-GTA hidrojenlerinin SEM analizi

HTA-GTA hibrit hidrojeninin morfolojik yapısını ve gözenekliliğini incelemek için, öncelikle hibrit jel komponentleri olan HTA ve GTA’nın yüzey morfolojileri, HTA-GTA hibrit jel ile kıyaslandı. Ayrıca, optimal hibrit hidrojen olan 1% HTA-10%GTA’nın değişen oranlarının yüzey morfolojisine etkisini incelemek amacı ile hacimce 2:1, 1:1 ve 1:2 olacak şekilde hibrit hidrojenler hazırlandı. Hazırlanan hibrit hidrojenler, %50-100 arasında değişen sulu etanol serilerinden 10’ar dakika boyunca geçirilerek dehidrate edildi. Ardından, örnekler ince bir altın-paladyum (15 nM) tabakasıyla kaplandı ve elektron mikroskobu altında gözlemlendi.

4.2.7 *In vitro* hücre kültürü çalışmaları

Bu bölümde HT-29 hücrelerinin çoğaltılması, pasajlanması, GTA ve HTA-GTA hibrit hidrojenleri üzerinde hücrelerin çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi, sitotoksite çalışması ve gen ekspresyonu ve proteomiks/metabolomiks çalışmaları verilmiştir.

4.2.7.1 Hücre kültürü

HT-29 hücreleri hacimce %1 L-glutamin, %1 P/S ve %10 FBS içeren DMEM-HG içerisinde 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında inkübe edildi. Hücreler bağıl bolluğa gelinceye kadar 2-3 günde bir taze besiyeri değişimi yapılarak kültüre devam edildi.

4.2.7.2 Hücrelerin HTA, GTA ve HTA-GTA hibrit jelleri üzerine tohumlanması

GTA ve HTA çözeltileri kullanılacak konsantrasyonlarda hazırlandı ve enzim ilavesinden önce 1 saat boyunca laminar kabin içerisinde UV ışık ile sterilize edildi. Daha sonra sterilize edilen çözeltilere 2U/mL HRP enzimi eklendi ve çözeltinin hacimce 1/10'u kadar 2 mM H₂O₂ eklenerek hidrojelasyon sağlandı. Oluşan hidrojeller 1 saat boyunca laminar kabin içerisinde UV ışıkta bekletildikten sonra DPBS ile yıkama yapılarak hücre ekimi aşamasına hazır hale getirildi.

%80-85 bağıl bolluğa ulaştığı gözlemlenen hücreler tripsinize edildi. Bu amaçla doku kültür kaplarında kültür olan hücrelerin atık vasatı alındı ve hücreler tripsini inhibe eden serumu ortamdan uzaklaştırmak için 2-3 kez 10 mL DPBS ile yıkandı. Ardından kültür kabına %0,25 Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılması için 37°C'de 4-5 dakika inkübe edildi. Mikroskop ile hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra hücreler üzerine 4 mL serum içeren besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi inhibe edildi. Süspansiyon halindeki hücreler pipetleme yapıldıktan sonra santürlüj tüpüne alınarak 1200 devir/dakika hızda 5 dakika süreyle santürlüj edildi. Santürlüj işleminden sonra süpernatant atıldı. Oluşan hücre pelleti üzerine 1 mL tam besiyeri eklendi ve hemositometre ile hücre sayımı yapıldıktan sonra hidrojeller üzerine istenilen hücre yoğunluğunda hücre ekimi yapıldı. Ardından besiyeri ilavesi yapılarak analiz süresine kadar hidrojeller üzerinde tohumlanan hücreler, 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında inkübe edildi ve besiyeri 2 günde bir taze besiyeri ile değiştirildi.

4.2.7.3 XTT testi: HTA ve GTA hidrojelleri üzerinde hücre proliferasyonu

HT-29 hücrelerinin, HTA ve GTA hidrojelleri üzerinde çoğalma kapasiteleri ve çoğalmalarının zamana bağlı (2. gün ve 7. gün) değişimi yapılan XTT testi ile gözlemlendi.

Bu amaçla, 2. ve 7. gün olarak belirlenen zaman noktalarına ulaşıldığında sadece metabolik olarak aktif bulunan hücrelerde Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat'a

(NADPH) bağılı dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile XTT tetrazolyum bileşiğinin hücre kültür ortamında çözünür turuncu renkli formazan kristallerine indirgenmesi prensibine dayanan kolorimetrik hücre canlılığı ve proliferasyonu tespit yöntemi kullanıldı.

Ağırlıkça %1, %3 HTA ve %5, %10 GTA hidrojelleri bölüm 4.2.7.2'deki yöntem kullanılarak 3 tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plaka içerisine hazırlandı ve jel başına 40 bin hücre/hidrojel olacak şekilde HT-29 hücreleri ekildi. Örnekler 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında inkübe edildi. Belirlenen zaman nokalarında, örneklerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve DPBS ile yıkama yapıldıktan sonra örneklerle 100 µl taze besiyeri ilavesi yapıldı. Reaksiyon çözeltisi, 5 mL XTT reaktifine 0,1 mL aktivasyon çözeltisi olacak şekilde hazırlandı ve herbir örneğin bulunduğu kuyucuklara, 50 µl hazırlanan çözeltiden ilave edilerek 37°C'da %5'lik CO₂ içeren inkübatörde 2 saat inkübasyon sağlandı. Ardından, renk değişiminin tamamlandığı gözlemlenen örnekler üzerinden besiyeri-XTT reaksiyon çözeltisini içeren süpernatant toplandı ve yeni bir 96-kuyucuklu plakaya aktararak spektrofotometre cihazı ile 490 nm dalga boyunda ölçümler kaydedildi.

4.2.7.4 Canlı/ölü testi

Önceden belirlenen zaman aralıklarında (2. gün ve 7. gün) HT-29 hücrelerinin hibrit jel komponentlerini oluşturan GTA ve HTA hidrojelleri üzerindeki canlılığı ve malzemelerin hücrelerde oluşturabileceği sitotoksik etki yapılan Canlı/Ölü testi ile incelendi.

Bu amaçla, 2. ve 7. gün olarak belirlenen zaman noktalarına ulaşıldığında canlı/ölü kit protokolü uygulanarak canlı hücreler için Kalsein-AM ve ölü hücreler ethtd-1 boyaması yapıldı. Canlı hücreler, Kalsein-AM üzerindeki asetoksimetil ester grubu yağda çözünür karakterde olduğundan dolayı floresan olmayan kalseinin, canlı hücrelerde bulunan esterazlar tarafından asetoksimetil ester grubunun hidroliz olması ile yağda çözünemeyen bir karakter kazanması ve yeşil floresan kalseine dönüştürülmesi prensibine dayanan yöntem ile gözlemlendi. Ölü hücreler ise, canlı hücreler tarafından

geçirgen olmayan nükleik asit boyası ethd-1'in, ölü hücrelerin membranlarından geçerek DNA'larına bağlanması ile çekirdeklerinde lokalize olarak kırmızı floresan renk yayması prensibine dayanan mekanizma ile gözlemlendi.

Ağırlıkça %5, %10 GTA ve %1, %3 HTA hidrojel bölüm 4.2.7.2'deki yöntem kullanılarak 2 tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plaka içerisine hazırlandı ve jel başına 40 bin hücre/hidrojel olacak şekilde HT-29 hücreleri ekilerek örnekler 37 C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında inkübe edildi. Belirlenen zaman nokalarında, örneklerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve DPBS ile yıkama yapıldı. Canlı hücreleri boyamak için 4  M Kalsein-AM ve  l  hücreleri boyamak için 10  M Ethd-1 reaktifleri DPBS içerisinde hazırlanarak örneklerin olduğu kuyucuklara eklendi. Örnekler 37 C'da %5'lik CO₂ içeren inkübatörde 5 dakika inkübe edildikten sonra floresan mikroskobu kullanılarak canlı hücreler 488 nm dalga boyunda (yeşil floresan) ve  l  hücreler 527 nm dalga boyunda (kırmızı floresan) gözlemlendi.

4.2.7.5 Kalsein-AM boyaması: Hibrit hidrojellerde hücre adezyonunun incelenmesi

HTA-GTA hibrit hidrojellerinin kanser hücre adezyonu üzerindeki etkilerini görselleştirmek için farklı konsantrasyon ve oranlarda ( izelge 1; E-H) HTA-GTA hidrojel bölüm 4.2.7.2'deki yöntem kullanılarak hazırlandı ve HT-29 hücrelerinin bu kombinasyonlar üzerindeki adezyonu Kalsein-AM boyaması yapılarak incelendi.

Bu amaçla, hidrojel konsantrasyonları %1 HTA-%5 GTA, 1%HTA- %10 GTA, %3 HTA-%5 GTA ve %3 HTA- %10 HTA olacak şekilde hacimce 1:1, 1:2 ve 2:1 oranlarında kombine edilerek 96-kuyucuklu plaka içerisinde hazırlandı (Bölüm 4.2.5'de yer alan hibrit hidrojellerin hazırlanma protokolü uygulanmıştır). Jel başına 40 bin hücre/hidrojel olacak şekilde HT-29 hücreleri ekilerek örnekler 37 C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında 5 gün boyunca inkübe edildi. 5. günün sonunda bölüm 4.2.7.4'deki Kalsein-AM boyaması protokolü uygulanarak kalsein boyaması yapıldı ve hücrelerin tek katmanlı bir kültür veya tümör benzeri hücre k melleri oluşturma kapasiteleri floresan mikroskonu altında 488 nm dalga boyunda (yeşil floresan) gözlemlendi.

4.2.7.6 İmmünofloresan boyaması: Hücreye özgü YAP ekspresyonunun görselleştirilmesi

Hücre adezyonunun Kalsein-AM boyaması ile kontrol edilebilir olduğu gözlemlenen optimal hibrit HTA-GTA hidrojeline, antijen-antikor aracılı immünofloresan boyama (YAP ve β -aktin) yöntemi kullanılarak hücre adezyonu floresan mikroskop altında incelendi.

Bu amaçla, %1 HTA-%10 GTA hidrojelleri hacimce 1:1, 1:2 ve 2:1 olacak şekilde 48-kuyucuklu plaka içerisine hazırlandı. UV ışık altında 1 saat sterilizasyondan sonra DPBS ile yıkama yapıldı ve jel başına 40 bin hücre/hidrojel olacak şekilde HT-29 hücreleri ekilerek 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında 5 gün boyunca inkübe edildi. 5 günlük kültür sürecinin ardından örnekler üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve DPBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Daha sonra %4 PFA ilave edildi ve 15 dakika boyunca örnekler oda sıcaklığında inkübe edilerek hücrelerin jellere sabitlenmesi sağlandı. 15 dakika sonunda PFA ortamdan uzaklaştırıldı ve 3 kez DPBS ile yıkama yapıldı. Ardından geçirgenliği sağlamak için %0,1 Triton X-100 eklenerek örnekler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar DPBS ile 3 kez yıkam yapıldı. Antikor ilavesinden önce son olarak spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla örnekler %0,1 BSA çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyondan sonra yıkama işlem yapıldı ve birincil antikorlar (YAP ve β -aktin) hacimce 1:200 olacak şekilde DPBS içerisinde hazırlanarak belirlenen kuyucuklara eklendi. Örnekler 4°C'de bir gün boyunca inkübe edildi. Ardından birincil antikorlar ortamdan uzaklaştırılarak yıkama işlemi tekrarlandı ve ikincil antikor (anti-fare Alexa Fluor 488) hacimce 1:1000 oranında olacak şekilde DPBS içerisinde seyreltilerek örneklerin olduğu kuyucuklara ilave edildi. Örnekler 45 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortam şartlarında inkübe edildikten sonra çekirdek boyaması DAPI ilavesi ile sağlandı ve örnekler floresan mikroskop altında incelendi.

4.2.7.7 RT-qPCR: Gen ekspresyon analizi

RT-qPCR, farklı matriks sertliklerinin hücre-matris ve hücre-hücre etkileşiminde rol alan mekanotransdüksiyon ile ilişkili genlerde yarattığı etkiyi ve hücrelerin metastaz ve

EMT süreçleri ile ilgili genleri incelemek için yapıldı. Ardından, metastazik sürece bağlı hücre-ölüm mekanizmalarını aydınlatmak için apoptoz, nekroz ve otofaji gen ekspresyonları incelendi.

Bu amaçla, %1 HTA-%10 GTA hidrojelleri hacimce 1:1, 1:2 ve 2:1 olacak şekilde 48-kuyucuklu plaka içerisine hazırlandı. UV ile sterilize edilip DPBS ile yıkama aşamalarından sonra jel başına 400 bin hücre/hidrojel olacak şekilde HT-29 hücreleri ekildi ve 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam koşullarında 5 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun ardından RNA izolasyon kitindeki talimatlar takip edilerek iki tekrarlı olacak şekilde hazırlanan örneklerden toplam RNA izole edildi. Bu amaçla, jel üzerindeki hücre lizisi sağlamak için örnek başına 1 mL RiboEx reaktifi eklenerek homojenizasyon sağlanıncaya kadar pipetleme yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon sağlanarak nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasına izin verildi. Ardından homojenize edilen örnekler ependorflara aktararak istenmeyen hücre dışı materyallerin ve yüksek moleküler ağırlıklı DNA'ların çökmesini sağlamak amacı ile 12,000 x g'de 10 dakika santüfjüj işlemi yapıldı. RNA'ları içeren süpernatantlar yeni ependorflara aktararak hacimce 1 mL RiboEx başına 0,2 mL olacak şekilde kloroform ilavesi yapıldı ve pipetleme işleminin ardından örnekler 12,000 x g'de 15 dakika santüfjüjlendi. Şeffaf süpernatant yeni bir ependorfa aktararak hacimce 1:1 olacak şekilde RBI reaktifi eklendi ve pipetlemenin ardından örnekler mini spin kolonlara aktarıldı. 10,000 x g'de 30 saniye santüfjüjleme yapılarak RNA'ların silika membranlara bağlanması sağlandı. Daha sonra sırasıyla SVI ve RNW tamponu ile yıkama yapılarak membrandaki RNA'larda bulunabilecek kontaminantlar uzaklaştırıldı. Son aşamada, nükleaz içermeyen su ilavesi ile RNA'ların silika membranlardan elüsyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü.

Elde edilen RNA konsantrasyonlarından cDNA sentezi için baz alınacak konsantrasyon miktarı hesaplandı ve cDNA sentez kitinin talimatları uygulanarak izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlendi. Kısaca, her örnek için total hacim 10 µL olacak şekilde 5 µL 5x iScript Reaction Mix eklendi. Ardından izole edilen RNA'lar en fazla 1 µg konsantrasyonda olacak şekilde ilave edilerek nükleaz içermeyen su ile gerekli olan

seyreltmeler yapıldı ve termal ısıl döngüleyici kullanılarak cDNA'ların sentezi tamamlandı.

cDNA sentezinin ardından RT-qPCR tekniğine dayanan gen ekspresyonu analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, metastaz belirteçleri olarak MMP2 ve MMP9, EMT belirteçleri olarak E-kaderin ve N-kaderin, matris sertliğinin hücre adezyonuna etkisi incelemek için ise mekanotransdüksiyon belirteçleri olarak YAP ve FAK genleri analiz edildi. Hücre-ölüm mekanizmalarını aydınlatmak için apoptoz belirteçleri olarak caspase-3 ve p53, nekroz belirteçleri olarak RIPK-1 ve RIPK-3, otofaji belirteçleri olarak ATG-5 ve Beclin-1 genleri analiz edildi.

4.2.7.8 Apoptoz-nekroz testi

%1 HTA-%10 GTA hidrojelleri hacimce 1:1, 1:2 ve 2:1 olacak şekilde 48-kuyucuklu plaka içerisine hazırlandı ve jel başına 100.000 HT-29 hücresi ekilerek 5 gün kültür edildi. Apoptoz-nekroz testi için hidrojel üzerinde kültürlenmiş hücreler 2 kez tampon ile yıkandı. Ardından apoptotik ve nekrotik hücreleri görüntülemek için kuyucuk başına tampon içerisinde hacimce 1:100 ve 1:200 olacak şekilde Apopxin Yeşil İndikatörü (Ex/Em = 490/525 nm) ve 7-AAD (7-aminoaktinomisin-D, Ex/Em = 550/650 nm) ilave edildi. Örnekler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildikten sonra hücreler floresan mikroskobu altında görüntülendi.

4.2.7.9 Metabolomiks çalışmaları

Optimal hibrit jel göz önünde bulundurularak, hücre adezyonu ve metastaza yanıt olarak değişen metabolitleri belirlemek için metabolomik analizler yapıldı.

Bu amaçla, %1 HTA-%10 GTA hidrojelleri 1:1, 1:2 ve 2:1 oranlarında 48-kuyucuklu plaka içerisine 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. Yumuşak ve daha sert matriks üzerinde kültürlenmiş kanser hücrelerinin protein ve metabolit profillerini ayırt etmek için ise kontrol grubu olarak %1 HTA ve %10 GTA hidrojelleri hazırlandı. Hidrojel başına 500.000 HT-29 hücresi ekildi ve 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam koşullarında 5

gün boyunca inkübe edildi. Kültür sürecinin sonunda, hidrojel-hücre yapıları üzerine metabolizmayı durdurmak amacı ile 1 ppm miristik asit içeren hacimce 1:9 metanol/su solüsyonu eklenerek numuneler homojenize edildi. Metabolitlerin ve proteinlerin tamamen parçalanması için ise numunelerin bulunduğu plaka 15 saniye boyunca sıvı azota daldırıldı. Ardından pipetleme yapılarak tamamen homojenize hale getirilen numuneler ependorflara aktararak etiketlendi ve analiz sürecine kadar -80°C’de muhafaza edildi.

Metabolomik analiz daha önce literatürde tarif edilene benzer şekilde yapıldı (Dunn vd. 2011). -80 °C’de metabolomik analiz için muhafaza edilen örneklerden üst fazda yer alan polar metabolitler yeni ependorf tüplerine aktarıldı ve metabolit bozunmasını önlemek amacıyla vakum yoğunlaştırıcı ile tamamen kurutuldu. Kurutulan numuneler metoksiamin hidroklorürün piridindeki çözeltisi kullanılarak metoksilatlandı ve 37°C’de 30 dakika boyunca N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid (MSTFA) ve %1 trimetilklorosilan (TMCS) reaktifleri kullanılarak türevlendirildi. Türevlendirilmiş numuneler, analiz için silanize şişelere aktarıldı ve DB5-MS kolon kullanılarak Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Sıvı Kromatografisi-Kuadrapor Uçuş Zamanlı (LC-qTOF) cihazları ile analizler yapıldı. Elde edilen kompleks kromatogramlar ayrıştırıldıktan sonra piklerin alıkonma zamanları SpectConnect yazılımı kullanılarak düzeltildi ve veri matrisleri oluşturuldu. Elde edilen metabolit pikler alıkonma indeksli kütüphaneler kullanılarak (Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri) aydınlatıldı.

4.2.7.10 Biyoistatistiksel ve biyoinformatik çalışma

Metabolomik veri dekonvolüsyonu, AMDIS (Otomatik Kütle Spektral Dekonvolüsyon ve Tanımlama Sistemi) kullanılarak gerçekleştirildi ve ardından metabolit tepe noktalarının veri matrislerini oluşturmak için SpectConnect kullanıldı. Metabolomik veri matrisleri MetaboAnalyst4.0’e yüklendi ve toplam alan-ortalama merkezleme ile normalleştirildi. Eksik değerlerin %50’sinden fazlasına sahip herhangi bir metabolit özelliği veri matrisinin dışında tutuldu. Nihai veri matrisi, çok değişkenli analiz için SIMCA-P+ (v13.0, Umetrics, İsveç) yazılımına aktarıldı. Grup ayrımını ortaya

ıkarmak için temel bileşenler analizi (PCA) ve Kısmi En Küçük Kareler-Ayrımcılık Analizi (PLS-DA) yapıldı. İstenilen metabolitleri ayırt etmek için projeksiyondaki değişken önem (VIP) grafikleri kullanıldı. Son olarak online araçlar kullanılarak elde edilen metabolitler ile yolak analizleri yapıldı ve farklı matriks sertlikleri ile değişen kanser hücresi davranışında metabolitsel olarak hangi yolakların etkin olduğu belirlendi.



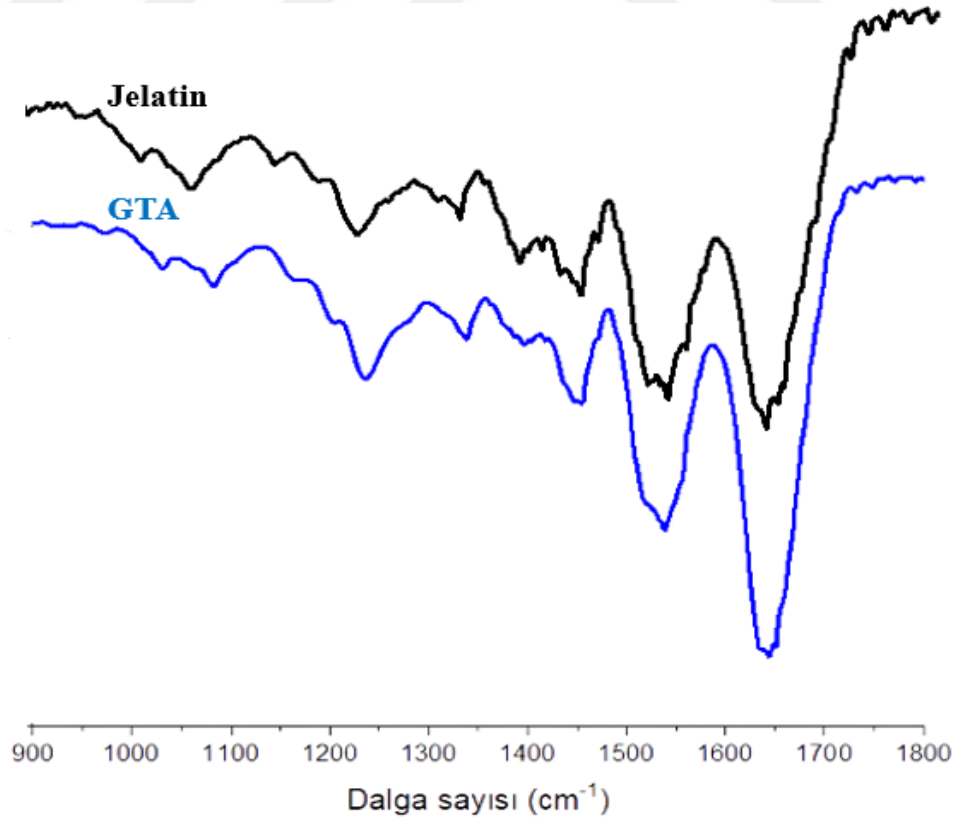
5. BULGULAR

5.1 GTA Sentezi ve Karakterizasyonu

Enzimatik olarak çapraz bağlanabilir jelatin türevli biyopolimer (GTA), jelatin ve tiramin hidroklorürün karbodiimid aracılı kondenzasyon polimerizasyonuna bağlı reaksiyon ile sentezlenmiştir. GTA sentezinin verimini ve modifikasyon derecesini gözlemlemek için modifiye edilmemiş saf jelatin ve sentezlenen GTA'nın FTIR ve H^1 -NMR spektrumları karşılaştırılmıştır.

5.1.1 FTIR spektroskopi sonuçları

Jelatinin tiramin ile modifikasyonunu doğrulamak için tiramin molekülüne ait yapısal ve fonksiyonel stabilizasyondan sorumlu olası biyomolekülleri ve kimyasal bağları belirlemek amacı ile modifiye edilmemiş jelatin ve sentezlenen GTA'nın FTIR spektrumları karşılaştırılmıştır.

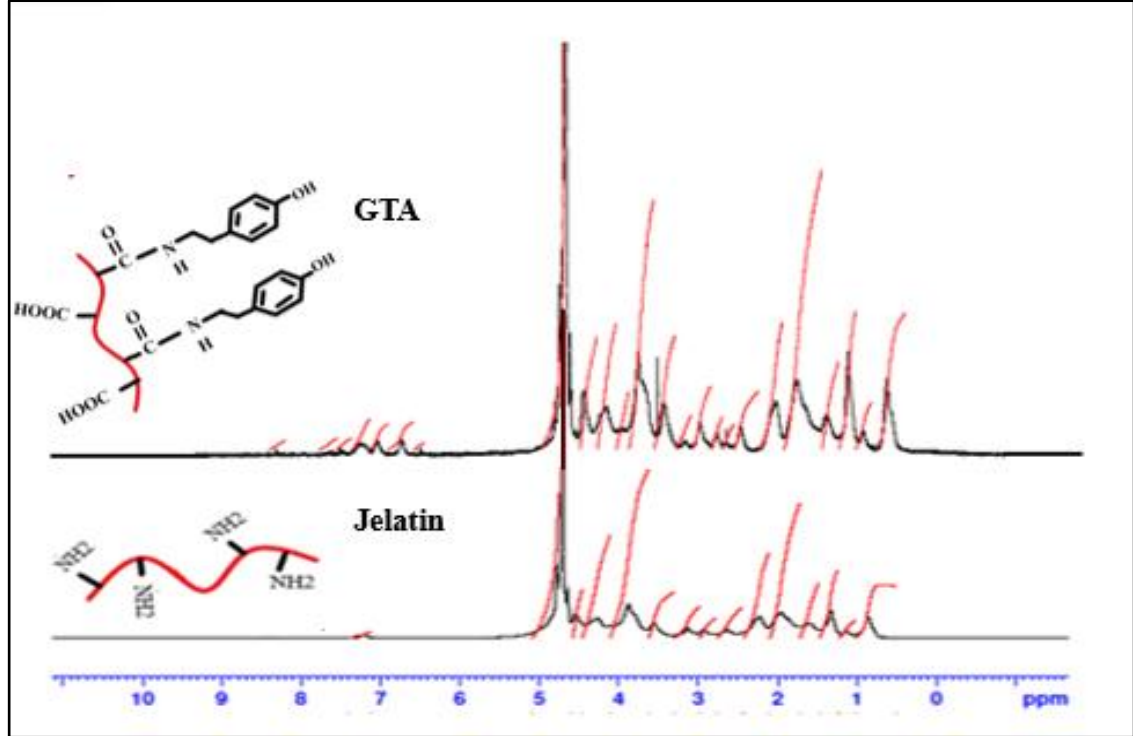


Şekil 5.1 Saf jelatin ve sentezlenen GTA'nın FTIR spektrumları

Jelatin spektrumu göz önünde bulundurulduğunda, 3000-3100 cm^{-1} bölge aralığındaki tepe noktası amid-A bağlarının N-H gerilmesini; 2920-2950 cm^{-1} bölgesi arasındaki frekans asimetrik alifatik C-H gerilme titreşimlerini; 2850 cm^{-1} bölgesindeki frekans simetrik alifatik C-H germe titreşimlerini; 1600-1630 cm^{-1} ve 1500-1535 cm^{-1} arasında gözlemlenen keskin tepeler, sırasıyla amid-I ve amid-II β -tabaka yapısını göstermektedir. Buna ek olarak, 1386 cm^{-1} ve 1469 cm^{-1} frekans bölgesinde bulunan tepe noktalarının, jelatinin temel zincirindeki metil gruplarının simetrik ve asimetrik bükülme titreşimlerini temsil ettiği doğrulanmıştır. Jelatin için gözlemlenen bantlar sentezlenen GTA'nın spektrumunda da gözlemlenmiştir. Böylece, modifiye edilen tiraminin jelatinin yapısını bozmadığı doğrulanmıştır.

5.1.2 NMR spektroskopi sonuçları

Tiramin gruplarının jelatin molekülüne konjugasyonu ve jelatinin tiraminlenme derecesi H^1 -NMR spektroskopi analizi ile doğrulanmıştır.



Şekil 5.2 Saf jelatin ve sentezlenen GTA'nın NMR spektrumlar

Sonuçlar, modifiye edilmemiş jelatin ile GTA spektrumlarında jelatin yapısını gösteren ortak tepe noktası çakışmaları gözlemlenmiştir. Ek olarak, GTA spektrumunda $\delta = 7.2$ ve $\delta = 6.9$ ppm'de gözlemlenen tiraminin fenil protonlarına ait spesifik sinyal artışı, jelatinin başarılı bir şekilde tiramin ile konjuge olduğunu doğrulanmıştır.

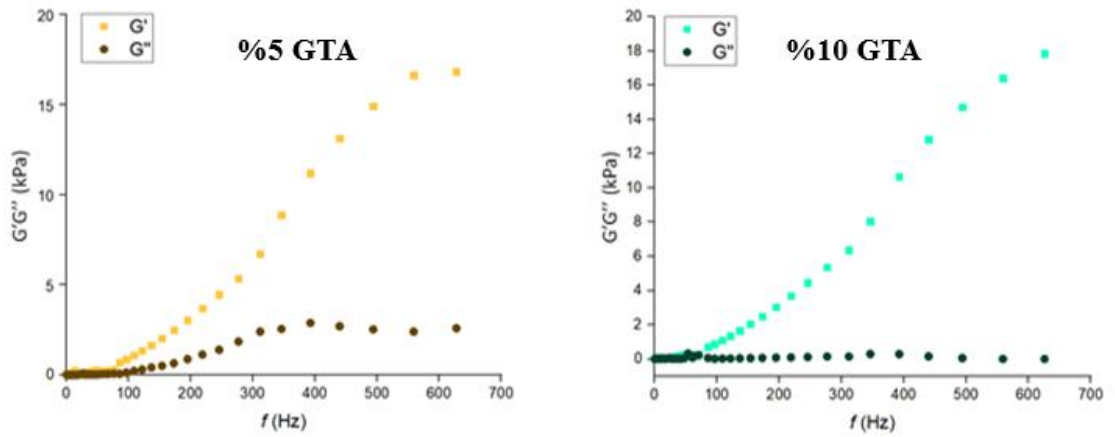
5.2 GTA'nın Hidrojelleşmesi ve Karakterizasyonu

GTA hidrojelleri, hazırlanan çözeltilere enzimatik çapraz bağlanmanın gerçekleşebilmesi amacıyla 2 U/mL HRP enzimi eklenerek ve ardından mM H_2O_2 ile çapraz bağlanarak hazırlanmıştır.

5.2.1 Reolojik karakterizasyon: GTA'nın hidrojelleşme kapasitesi

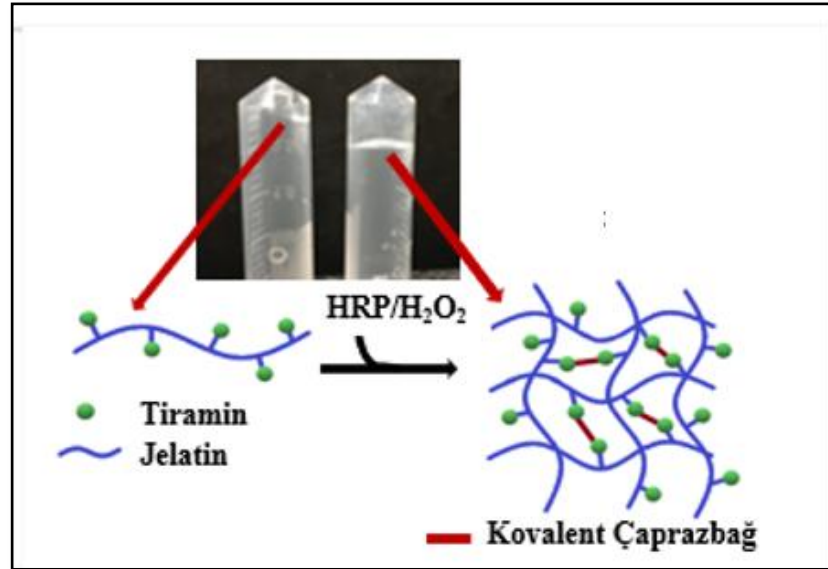
Reoloji, katı ve jel yapısındaki malzemelerin elastikliği, sıvı malzemelerin ise akışkanlık özelliğinden faydalanarak malzemenin uygulanan bir kuvvet altındaki deformasyon ve akışkanlık davranışlarını inceleyen bilim dalıdır (Zuidema vd. 2014). Reolojik ölçümler frekans-taramalı (frequency-sweep) ve zaman-taramalı (time-sweep) olmak üzere iki farklı ölçüm yöntemiyle uygulanabilmektedir. Frekans taraması, sabit sıcaklıkta uygulanan bir dizi frekans aralığında malzemenin viskoelastik özelliğinin ölçülmesine dayanır. Zaman taraması ise sabit frekans, genlik ve sıcaklıkta malzeme tepkisinin izlenmesidir. Reolojik ölçümlerde G' değeri malzemenin depolama modülünü, G'' değeri ise kayıp modülünü temsil etmektedir. Hidrojellerin reojik değerlendirmeleri ile hidrojel oluşturma kapasitesinin belirlenmesi, G' değerinin G'' değerinden yüksek olması ile doğrulanmaktadır (Ozudogru vd. 2021).

GTA hidrojellerinin hidrojel oluşturma potansiyellerini doğrulamak ve GTA konsantrasyonunu değiştirerek hidrojellerin mekanik özelliklerini ayarlamak için ağırlıkça %5 ve %10 GTA hidrojelleri hazırlanarak frekans-taramalı reolojik karakterizasyon analizleri yapılmıştır.



Şekil 5.3 %5 ve %10 GTA hidrojenlerinin frekans-tarama grafikleri

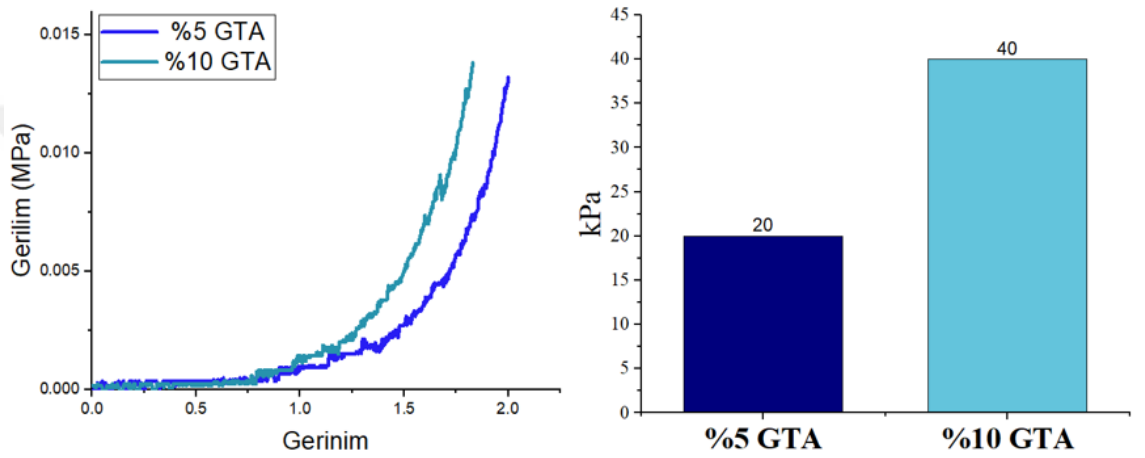
Reolojik ölçümler sonucunda beklenildiği gibi %5 ve %10 GTA hidrojenleri H_2O_2 ile çapraz bağlandığında, G' değerlerinin sırasıyla yaklaşık olarak 17 ve 19 kPa'a ulaştığı gözlemlenmiştir. Şekil 5.3'teki grafiklerde görüldüğü üzere her iki hidrojen için G' değerlerinin G'' değerlerinden yüksek olması hidrojenelasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Kendinden destekli hidrojenin reolojik/makroskopik görüntüsü şekil 5.4'de sunulmuştur.



Şekil 5.4 Çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan GTA hidrojenlerini gösteren makroskopik/reolojik görüntü

5.2.2 GTA'nın mekanik analiz (sıkıştırma) testi bulguları

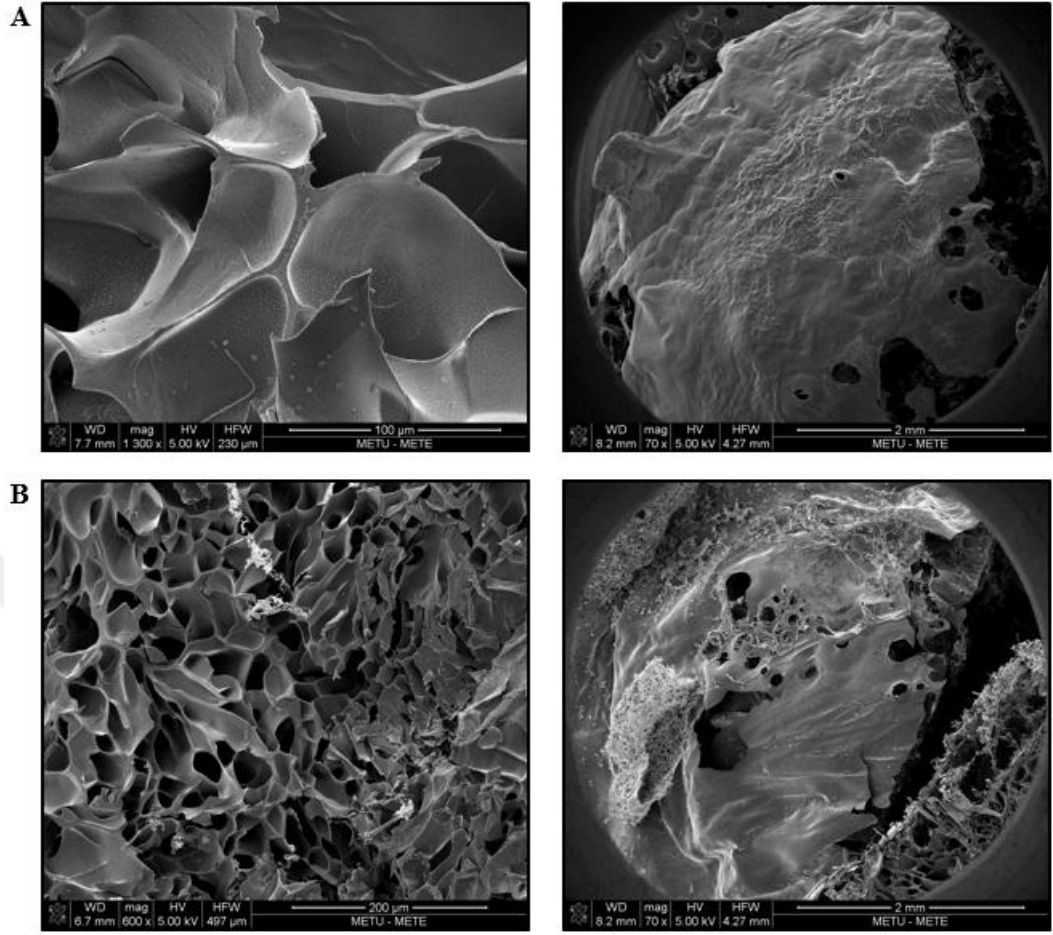
%5 ve %10 GTA hidrojellerinin sıkıştırma testi sonucunda gerilim-gerinim eğrisinin lineer alanı için yapılan hesaplamalarda, hidrojellerin sıkıştırma modülü sırasıyla 20 ve 40 kPa bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, %10 GTA'nın %5 GTA'ya göre sıkıştırma karşısında daha dayanıklı olduğunu ve %5 GTA'ya kıyasla daha sert yapıda olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 5.5 %5 ve %10 GTA hidrojellerinin sıkıştırma testi sonucunda elde edilen gerilim-gerinim eğrileri ve young modülleri

5.2.3 GTA hidrojellerinin SEM analizi bulguları

GTA hidrojellerinin farklı konsantrasyonlarda sahip olduğu morfolojik özellikleri ve gözeneklilik yapısını incelemek üzere %5 ve %10 GTA hidrojelleri hazırlanarak SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon arttıkça gözeneklilik boyutu azalmakta ve mekanik özellikler artmaktadır. Bu sebeple, matris yoğunluğunun değiştirilmesi ile matris sertliğinin ayarlanabilir olması hücre yapışması, göç ve invaziflik gibi hücre davranışlarını kontrol edilebilir kılmaktadır (Goncalves ve Garcia-Aznar, 2021). SEM analizleri sonucunda, %10 GTA hidrojelinin gözenek boyutunun yaklaşık olarak 33 μm ve %5 GTA hidrojelinin gözenek boyutunun ise 50 μm civarında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.5). %10 GTA'nın gözeneklilik boyutunun %5 GTA'nın gözeneklilik boyutundan düşük olması yoğun matris yapısından kaynaklanmaktadır.

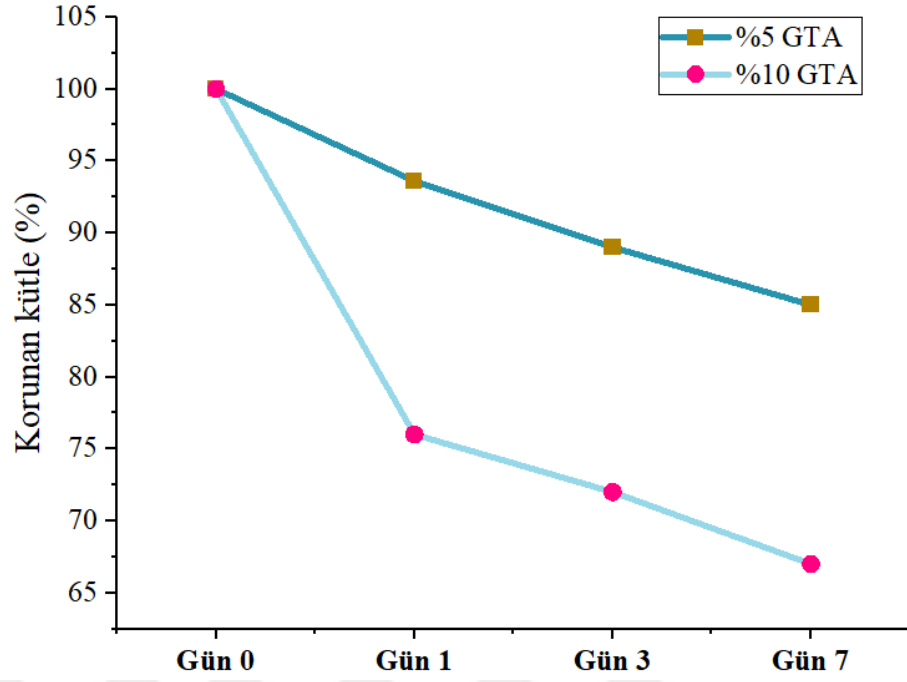


Şekil 5.6 (A) %5 GTA, (B) %10 GTA hidrojellerinin SEM görüntüleri

5.2.4 GTA hidrojellerinin bozunma testi bulguları

Hidrojellerin bozunabilirlik derecesine bağlı olarak hücrelerin göç etme, yayılma ve invazyon gibi davranışlarında değişiklikler meydana gelmektedir (Lawyer vd. 2012). Bu sebeple hidrojellerin bozunma davranışlarını incelemek önem arz etmektedir.

%5 ve %10 GTA hidrojellerinin fiziksel bozunma davranışları degradasyon testi ile değerlendirilmiştir. Şekil 5.7’de GTA hidrojellerinin degradasyon testine ait zamana bağlı kütle kaybını gösteren grafik sunulmuştur.



Şekil 5.7 Bozunma testi sonucunda %5 ve %10 GTA hidrojenlerinin zamana bağlı korunan kütle (%) değişimi

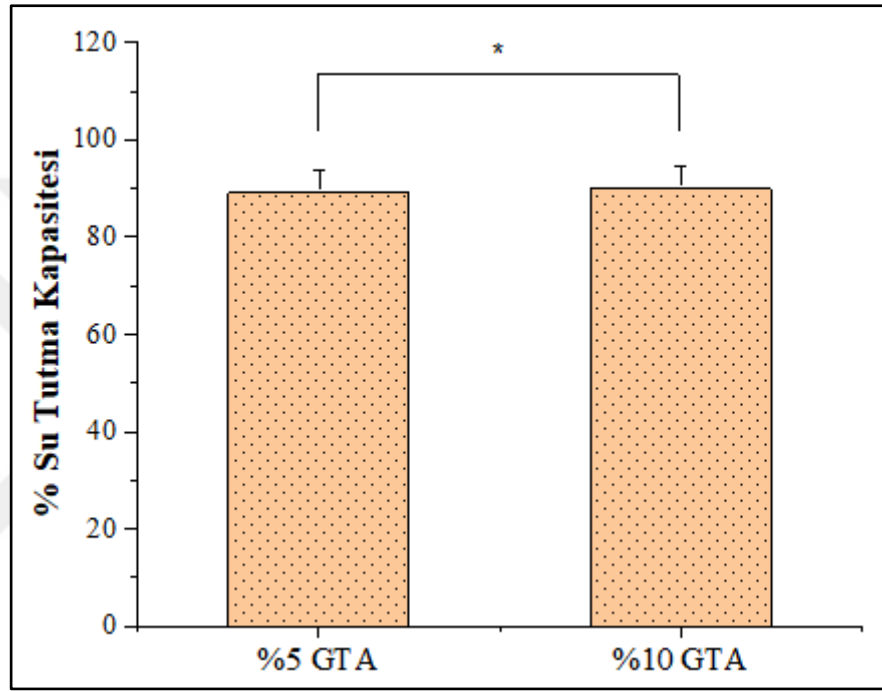
Degradasyon testi sonucunda GTA hidrojelinin korunan kütle yüzelik oranları 1, 3 ve 7. günler göz önünde bulundurulduğunda %5 GTA için sırasıyla %93,6, %89, %85 ve %10 GTA için sırasıyla %76, %72 ve %67 olarak bulunmuştur. Her iki hidrojin de bozunmaya karşı duyarlılığını ve bütünlüklerini, maksimum %30 kütle kaybı ile 7. güne kadar korudukları şekil 5.6’da sunulan grafikte doğrulanmıştır. Ayrıca, 1. günün ardından sabit kütle kaybı gözlemlenen %5 ve %10 GTA hidrojenlerinin sırasıyla günlük %2 ve %4.7 kütle kaybı ile tamamen bozulmadan 50 ve 21 gün bütünlüklerini korudukları sonucuna varılmıştır.

5.2.5 GTA hidrojenlerinin şişme testi sonuçları

Hidrojel ağı, hidrojenlerin hidrofilik yapısına bağlı olarak mikro yapısında kendi kütlelerinin en az %20’si kadar su tutmasına ve şişmesine olanak sağlayan üç boyutlu çapraz bağlanmış bir matristir (Kowalski vd. 2019). Hidrojenlerin şişme derecesi, hidrojenlerin uygulanması için önemli özellikler olan su afiniteleri, geçirgenlikleri, difüzyon kapasiteleri hakkında bilgi verdiği ve yapı iskelesi üzerinde yayılan

hücrelerin davranışları üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğundan şişme özelliklerinin karakterize edilmesi önemlidir.

Bu çalışmada %5 ve %10 GTA hidrojellerinin şişme özellikleri deiyonize su ortamında karakterize edilmiştir. Hidrojellerin şişme testi öncesinde kuru ağırlıkları ve şişme testi sonrası ıslak ağırlıkları kaydedilerek hesaplamalar yapılmıştır.

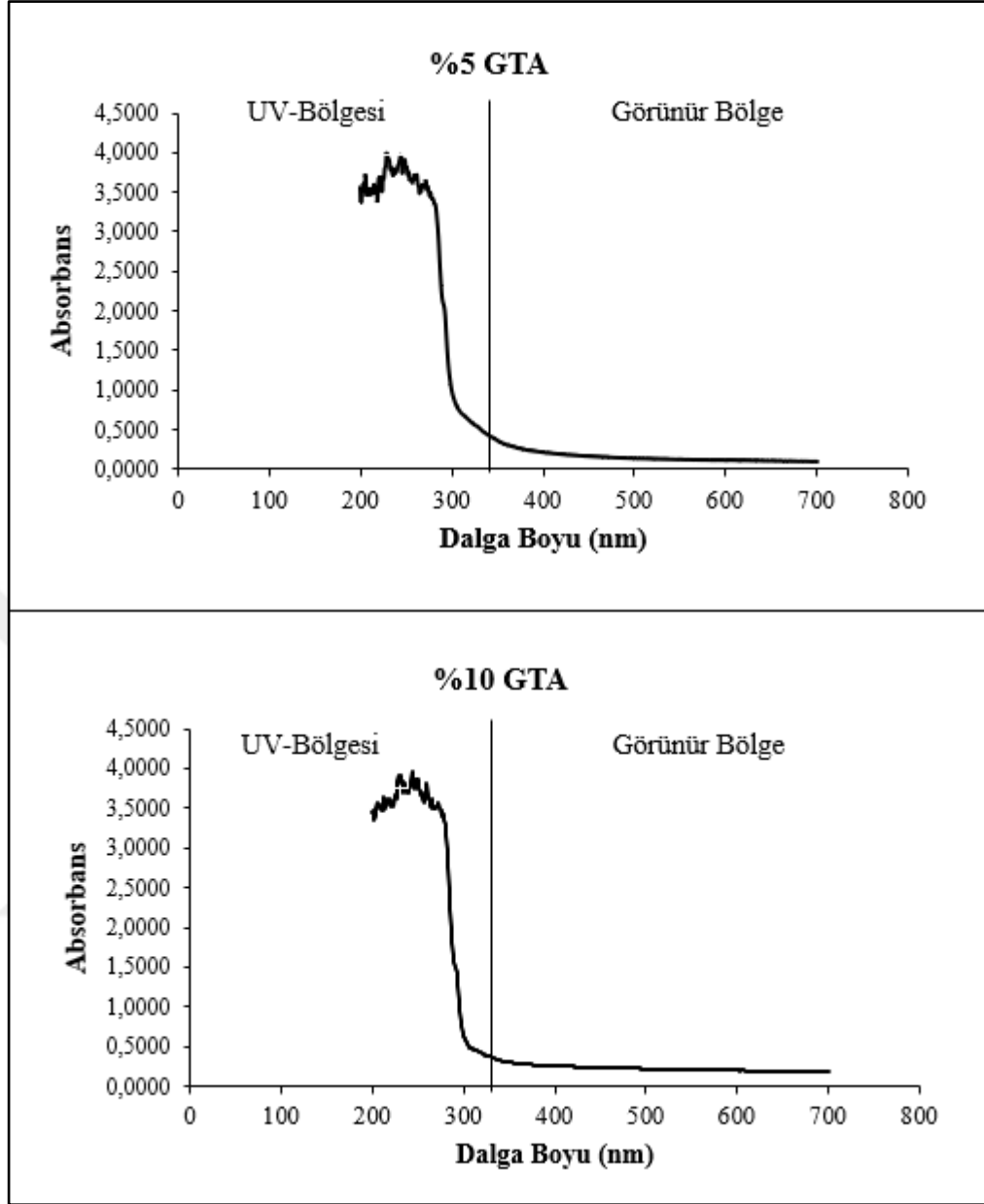


Şekil 5.8 %5 GTA ve %10 GTA hidrojellerinin yüzde su tutma kapasitesi (* $p > 0,05$)

Şişme testi sonucunda %5 ve %10 GTA hidrojellerinin şişme yüzdeleri sırasıyla %89,53 ve %90,23 olarak bulunmuştur (Şekil 5.8). 5% ve %10 GTA hidrojellerinin su tutma kapasiteleri arasında önemli bir fark gözlemlenmemiş ve her iki hidrojelinde su tutma kapasitelerinin tutarlı bir artış eğilimi gösterdiği yapılan ölçümlerle belirlenmiştir.

5.2.6 GTA hidrojellerinin UV geçirgenlik özelliği

%5 ve %10 GTA hidrojellerinin şeffaflığı UV-spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir.



Şekil 5.9 GTA hidrojenlerinin UV-geçirgenlik (şeffaflık) analizi

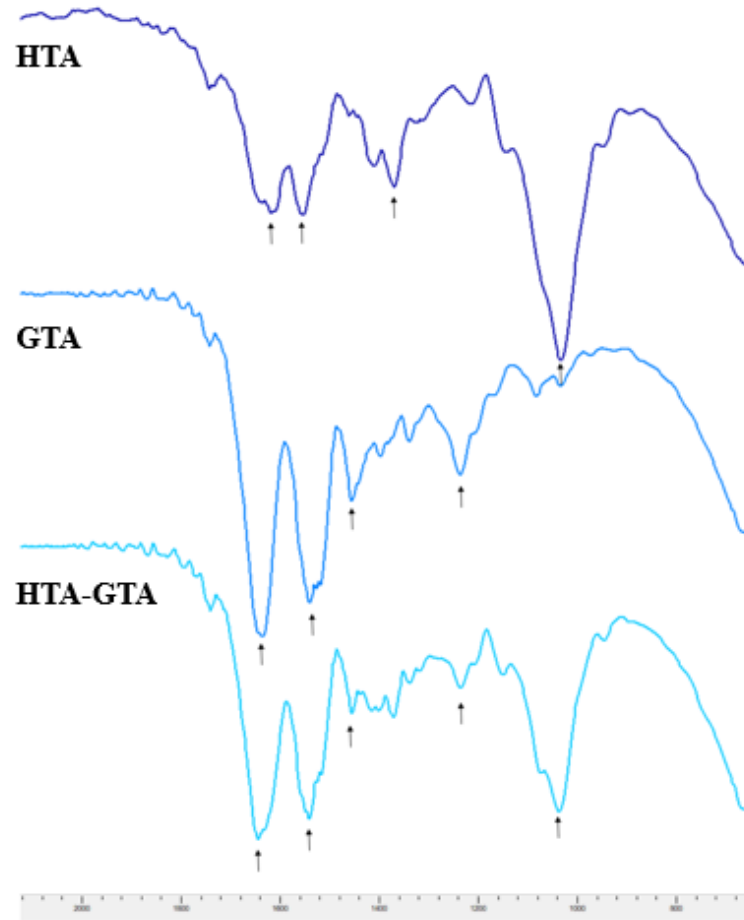
UV-geçirgenlik testi, her iki hidrojeninde 200-350 nm dalga boyları arasında UV ışığı absorbladığı ve 350 nm dalga boyundan itibaren görünür bölge aralığında ışığı yaydıkları gösterilmiştir (Şekil 5.9). Elde edilen sonuçlar ile görünür bölgedeki ışık absorbsiyonunun düşük olduğu ve ışığın hidrojenler tarafından neredeyse hiç absorblanmadığı tespit edilmiştir. Görünür bölgedeki ışık absorbsiyonunun düşük olması, hidrojenlerinin geçirgenliğinin yüksek olduğunu ve %5, %10 GTA hidrojenlerinin şeffaf bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

5.3 Hibrit HTA-GTA Hidrojellerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

HTA-GTA hibriti hidrojelleri, 2U/mL HRP enzimi içeren %1, %3 HTA ve %5, %10 GTA çözeltilerinin hacimce 1:1, 1:2 ve 2:1 oranlarında karıştırılması ve ardından 2 mM H₂O₂ ile çapraz bağlama işleminin gerçekleştirilmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan hibrit hidrojellerin bileşen konsantrasyonları ve oranları çizelge 4.1.E-H’de sunulmuştur. Hibrit hidrojellerin karakterizasyonu FTIR spektroskopisi, reolojik ölçümler ve SEM analizleri ile yapılmıştır.

5.3.1 HTA-GTA hidrojinin FTIR spektroskopisi bulguları

HTA-GTA hibrit hidrojinin yapısal karakterizasyonu için HTA ve GTA hidrojellerinin FTIR spektrumları HTA-GTA hidrojinin FTIR spektrumu ile karşılaştırılmıştır.

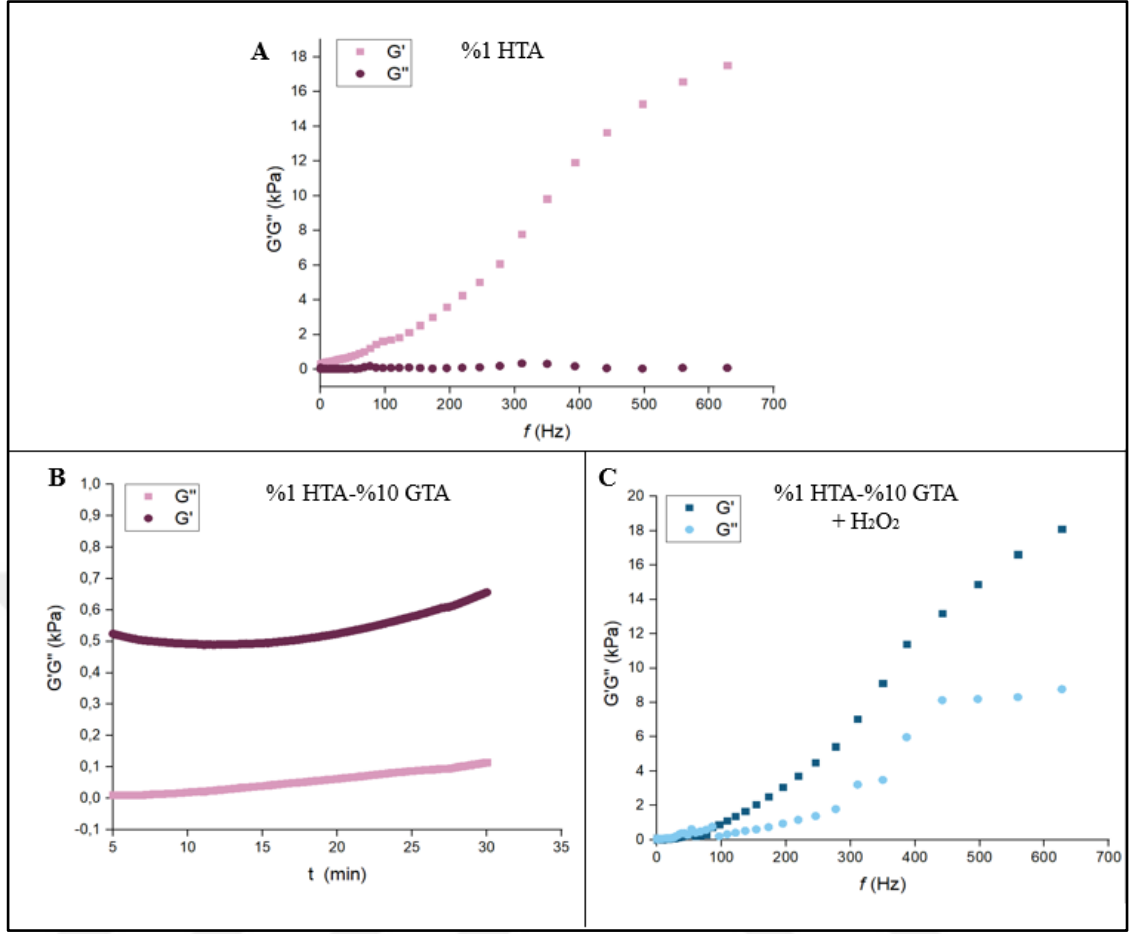


Şekil 5.10 HTA, GTA ve hibrit HTA-GTA hidrojelleri ile ilgili FTIR spektrumları

Saf HTA spektrumunda 1650 cm^{-1} 'de gözlemlenen tepe noktası HTA yapısında bulunan karboksilat anyonunun C-O gerilme titreşimini ve 1540 cm^{-1} 'de yer alan tepe noktası ise amid I bandına ait C-O ve N-H bükülme titreşimlerini göstermektedir (Şekil 5.10). Buna ek olarak, 1390 cm^{-1} dalga boyunda gözlemlenen tepe noktası, HTA'nın kimyasal yapısında fazla miktarda yer alan C-OH bağlarının bükülme titreşimini ve 1050 cm^{-1} 'de gözlemlenen tepe noktası ise HTA'nın polisakarit doğasını doğrulamaktadır. HTA ve GTA'nın tüm karakteristik tepe noktalarının HTA-GTA formülasyonunda gözlemlenmesi, hem HTA'nın hem de GTA'nın hibrit HTA-GTA hidrojelinin yapısına başarılı bir şekilde dahil olduğunu doğrulamaktadır.

5.3.2 HTA-GTA hidrojelinin reolojik karakterizasyonu

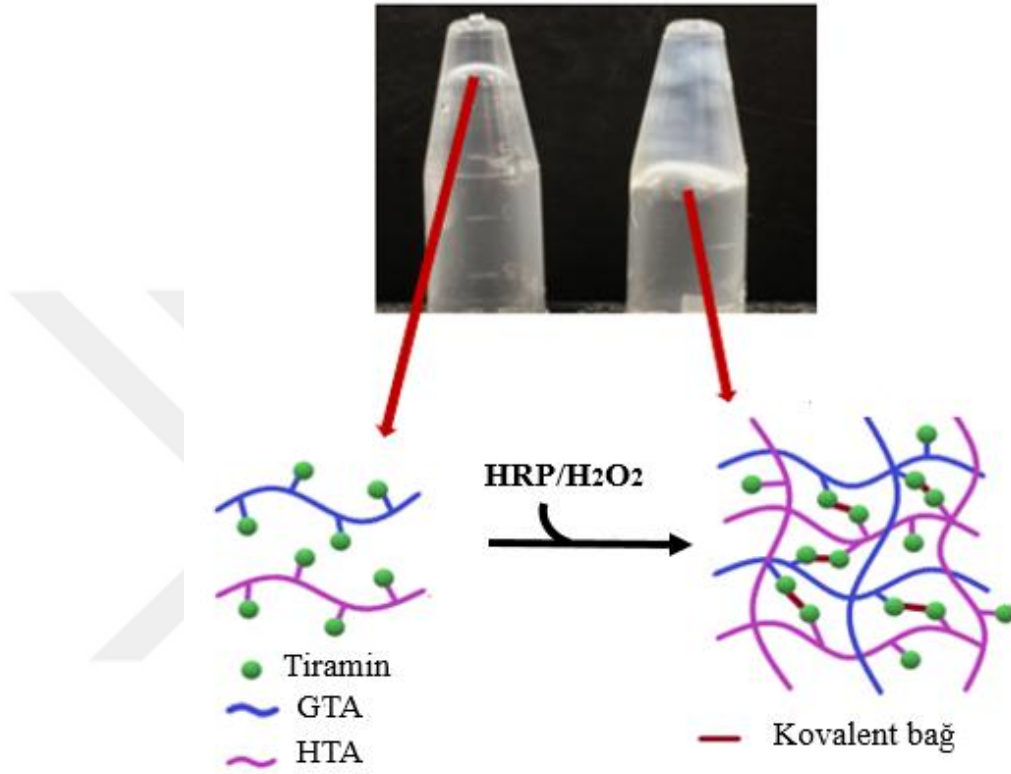
Hibrit HTA-GTA hidrojelinin hidrojelasyon kabiliyetini test etmeden önce, HTA'nın kovalent çapraz bağlama reaksiyonu ile katı hale dönüşme kapasitesi frekans-tarama reolojisi ile incelenmiştir (Şekil 5.11.A). HTA ve GTA arasındaki moleküller arası etkileşimi incelemek için 1 Hz frekansta çapraz bağlanmamış HTA-GTA çözeltisinin zaman-taramalı reoloji ölçümü incelenmiştir (Şekil 5.11.B). Son olarak, HTA-GTA hibrit sisteminin H_2O_2 ile çapraz bağlanmasından sonra katı benzeri hidrojel oluşturma kabiliyeti 0-1 kHz'de frekans-tarama reolojisi ile incelenmiştir (Şekil 5.11.C).



Şekil 5.11 (A) HTA'nın jel oluşturma yeteneğini gösteren frekans-tarama grafiği, (B) HTA ve GTA arasındaki zayıf moleküller arası etkileşimi kanıtlayan zaman-tarama grafiği, (C) Enzimatik çapraz bağlamadan sonra HTA-GTA hibrit hidrojelinin frekans-tarama grafiği

HTA hidrojeline ait reolojik verilerde, $G'/G'' > 10$ olduğu bulunmuştur (Şekil 5.11.A). Bu sonuç, katı benzeri bir hidrojel, enzim aracılı kovalent çapraz bağlama ile oluşturulduğunu göstermektedir. HTA ve GTA arasındaki moleküller arası etkileşimi incelemek için 1 Hz frekansta bir zaman tarama reoloji ölçümünde elde edilen verilerde $G'/G'' > 1$ olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.11.B). Bunun sebebi, HTA'nın negatif yüklü doğası (pH=7.4) ve GTA'daki zıt yüklü amino asit kalıntılarının HTA ve GTA arasında zayıf bir moleküller arası etkileşimi meydana getirmesinden kaynaklı olduğu (Selyanin vd. 2015), elde edilen $G'/G'' > 1$ değeri ile doğrulanmıştır. Son olarak HTA-GTA hibrit sisteminin H₂O₂ ilave edilerek çapraz bağlanmasından sonra katı benzeri hidrojel oluşturma kabiliyetinin incelendiği frekans-tarama reolojisinde, G' değerinin G'' değerinden yüksek olduğu gözlemlenmiş ve katı benzeri HTA-GTA hidrojel oluşumu

doğrulanmıştır (Şekil 5.11.C). HTA-GTA hibrit sisteminin enzimatik çapraz bağlanmasından sonra sağlam bir hidrojel oluşumunu doğrulayan makroskopik görüntü şekil 5.12’de sunulmuştur.

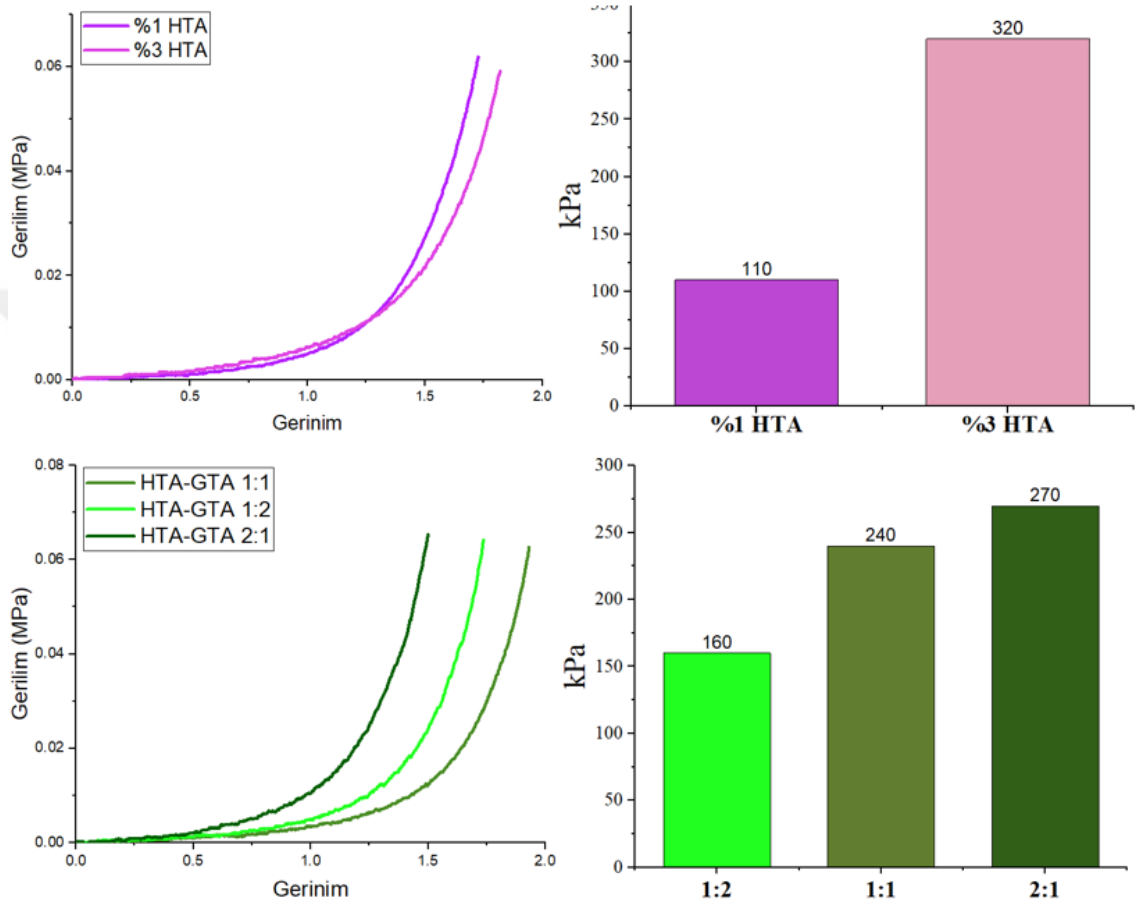


Şekil 5.12 Enzim aracılı ortogonal reaksiyon yoluyla kovalent çapraz bağlanmadan önce ve sonra HTA-GTA jel oluşumunu gösteren makroskopik görüntü

5.3.3 HTA-GTA hidrojellerinin mekanik analiz (sıkıştırma) testi bulguları

Hibrit HTA-GTA hidrojellerinin mekanik dayanımındaki değişimi anlaşılabilir kılmak için öncelikle %1 ve %3 HTA hidrojelleri için gerçekleştirilen sıkıştırma testi sonucunda HTA hidrojellerinin sıkıştırma modülleri sırasıyla 110 ve 320 kPa olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, bölüm 5.2.2’de GTA hidrojelleri için hesaplanan sıkıştırma modülleri ile karşılaştırıldığında, HTA’nın GTA hidrojeline kıyasla 8 katlık daha güçlü bir mekanik dayanıma sahip olduğunu doğrulamaktadır. HTA-GTA hidrojellerinin değişen oranlarında (2:1, 1:1 ve 1:2 v/v) HTA ve GTA’nın mekanik dayanıma etkisini doğrulamak için yapılan sıkıştırma testi sonucunda ise hidrojellerin sıkıştırma modülleri

sırasıyla 270, 240 ve 160 kPa bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarda, 2:1 (HTA-yüksek) oranından 1:2 (GTA-yüksek) oranına doğru gidildikçe mekanik dayanımın azaldığı gözlemlenmiş ve böylece, GTA'dan kaynaklı düşük mekanik dayanımın HTA oranının değiştirilmesi ile ayarlanabilir olduğu doğrulanmıştır.

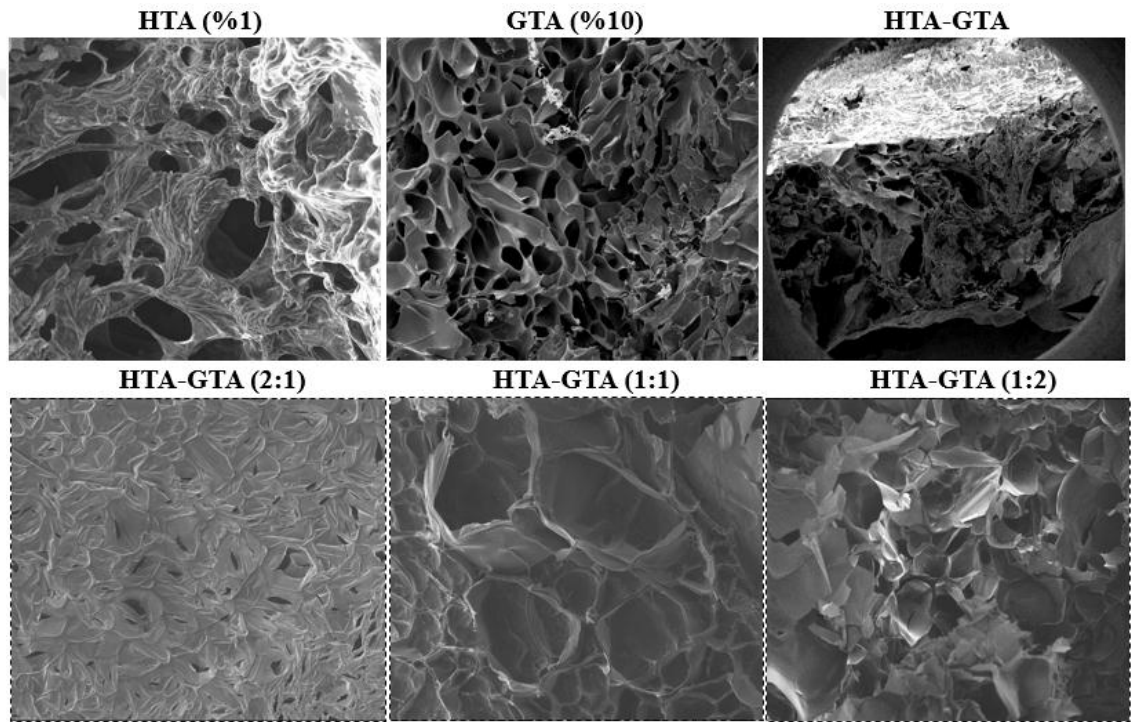


Şekil 5.13 HTA ve HTA-GTA hibrit hidrojenlerinin değişen oranları (2:1, 1:1 ve 1:2 v/v) için gerçekleştirilen sıkıştırma testi sonucunda elde edilen gerilim-gerinim eğrileri ve young modülleri

5.3.4 HTA-GTA hidrojenlerinin SEM bulguları

HTA, GTA ve HTA-GTA hidrojenleri için elde edilen SEM görüntülerinde, her üç koşulda da mikro gözenekli bir yapının olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, GTA hidrojeninin yoğun bir yapıya sahip HTA'ya göre, daha yoğun bir mikro gözenekli yapıya sahip olduğu gözlemlendi. Beklenildiği üzere, HTA-GTA hidrojeni, HTA ve GTA'nın özelliklerini birleştiren yoğun ve mikro gözenekli bir yapı sergiledi. Ayrıca,

HTA konsantrasyonunun azaltılıp GTA konsantrasyonunun arttırıldığı hibrit jel formülasyonunda (%1 HTA-%10 GTA), daha küçük gözenek boyutu ile beraber daha yoğun bir yapı gözlemlenmiştir. Optimal jel olan %1 HTA-%10 GTA'nın değişen oranlarına bakıldığında ise, HTA oranının yüksek olduğu 2:1 oranında gözlemlenen yoğun yapının, GTA oranının arttırıldığı 1:1 ve 1:2 oranlarında daha gözenekli bir yapıya dönüştüğü gözlemlenmiştir. Hibrit hidrojellerin ayarlanabilir gözeneklilik yapısı, HTA-GTA hidrojellerinin matris sertliğini ve hücrelerin mekanik davranışlarını kontrol edilebilir kılan bir sistem olduğunu göstermektedir.

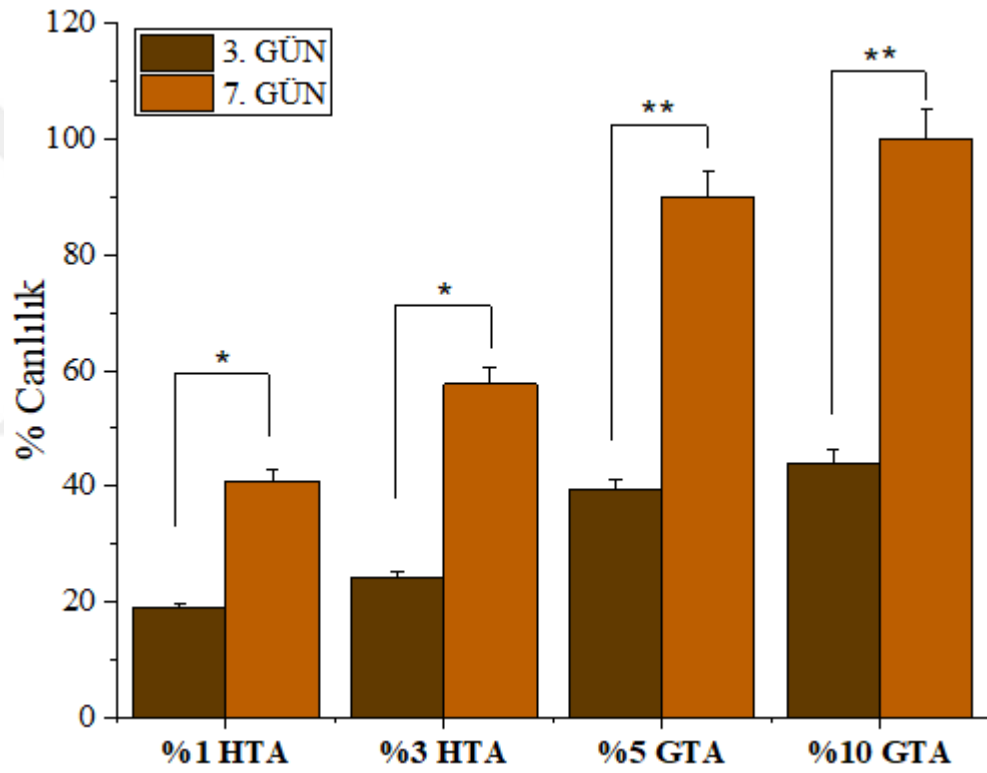


Şekil 5.14 HTA, GTA, HTA-GTA hibrit hidrojelinin ve değişen oranlarda hazırlanmış %1 HTA-%10 GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) hibrit hidrojellerinin mikro yapılarını gösteren SEM görüntüleri

5.4 *In vitro* Hücre Kültürü Bulguları

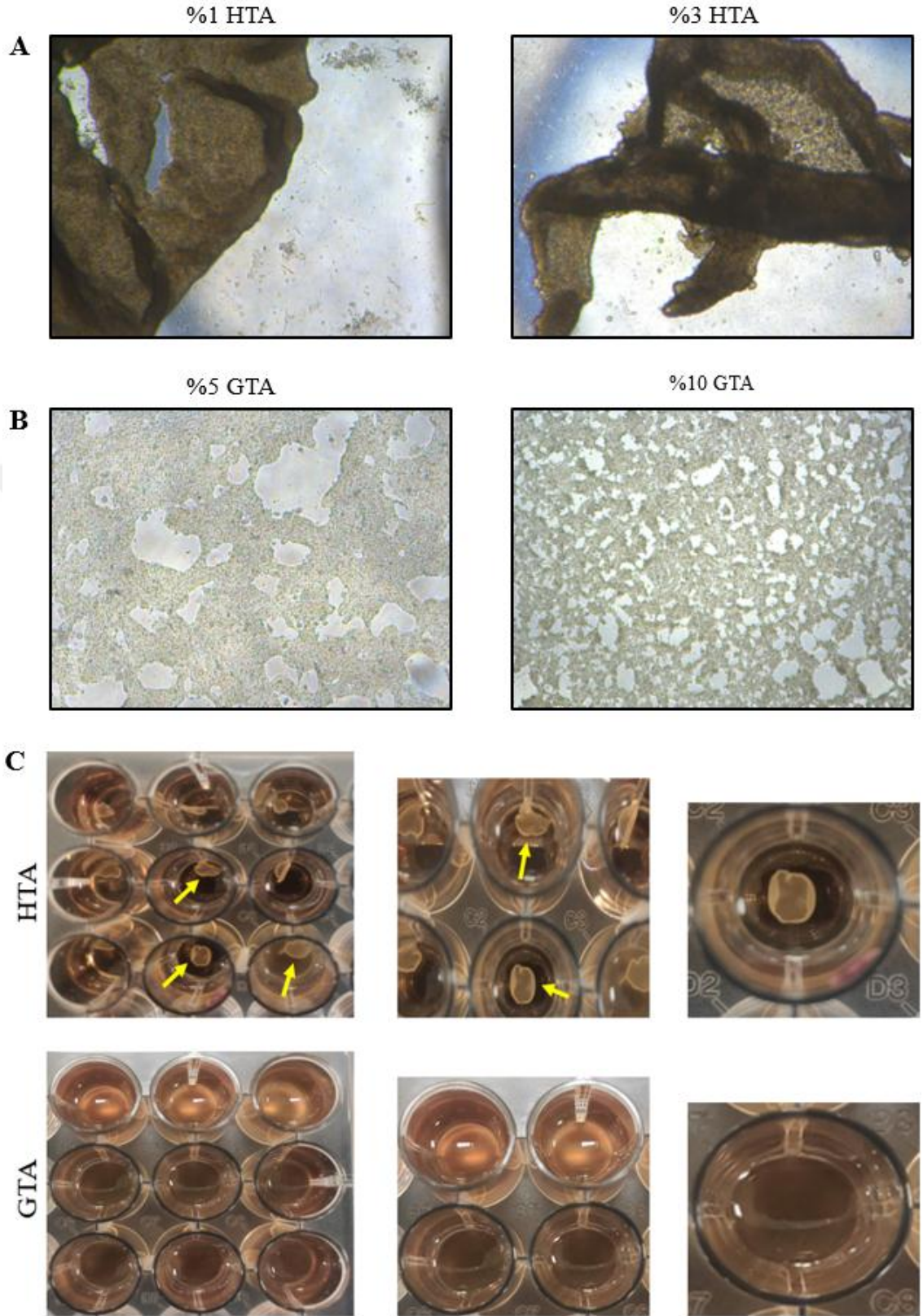
5.4.1 XTT bulguları

Belirli zaman noktalarında XTT reaktifi ile 4 saat boyunca inkübe edilen HT-29 hücrelerinin, HTA ve GTA hidrojelleri üzerinde çoğalma kapasiteleri ve çoğalmalarının zamana bağlı (2. gün ve 7. gün) değişimi yapılan XTT testi ile incelenmiştir.



Şekil 5.15 GTA ve HTA hidrojelleri üzerinde HT-29 kanser hücrelerinin belirli zaman noktalarında XTT yöntemi ile belirlenen hücre çoğalma oranları (* $p < 0,05$, ** $p < 0,05 \times 10^{-3}$)

Hücrelerin %1, %3 HTA ve %5, %10 GTA hidrojelleri yüzeyinde mitokondriyel aktivitelerini deneysel çalışma periyodu boyunca sürdürdüğü spektrofotometrik ölçümlerde açıkça görülmektedir (Şekil 5.15). Elde edilen sonuçlar ile 7. Günde dört hidrojelde de HT-29 kanser hücrelerinin 3. Güne kıyasla çoğaldığı tespit edilmiştir.

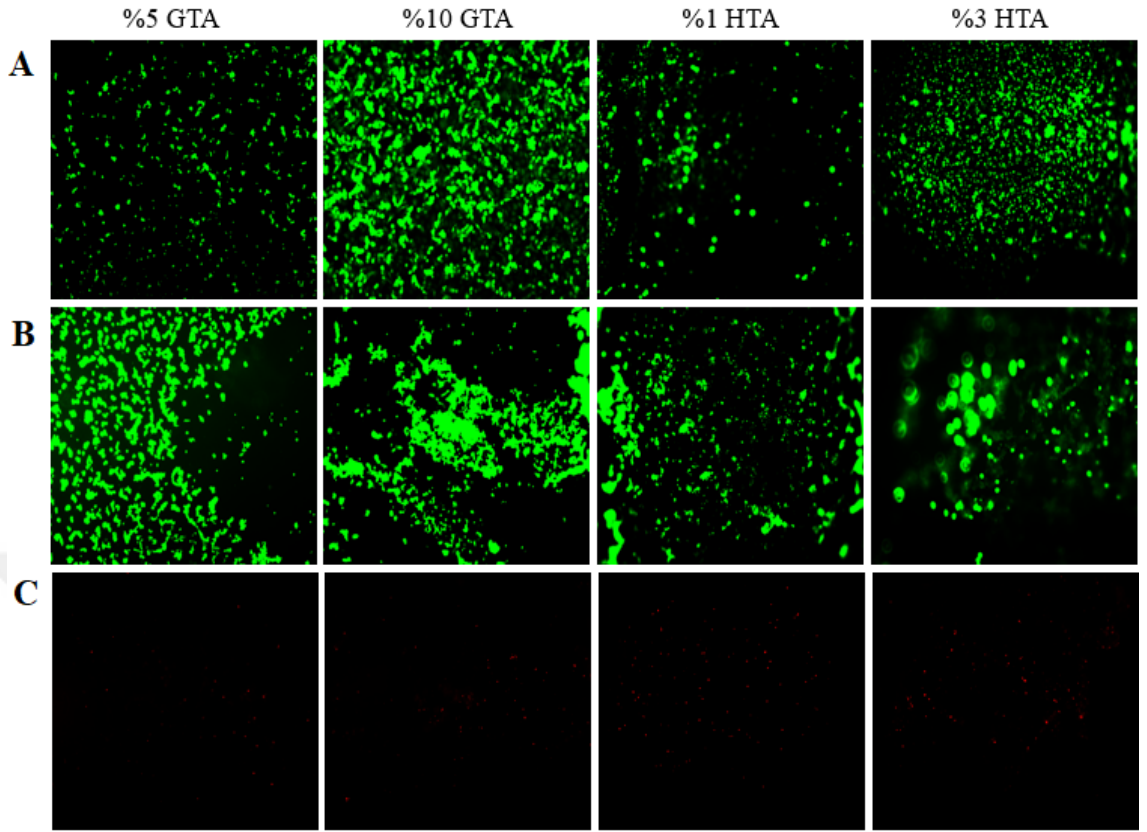


Şekil 5.16 HT-29 kanser hücrelerinin (A) HTA, (B) GTA hidrojelleri üzerinde kültür edildiği sürede elde edilen mikroskop görüntüleri, (C) HTA ve GTA üzerinde kültür edilen HT-29 hücrelerinin makroskopik görüntüleri

Kanser hücrelerinin HTA hidrojel­leri üzerinde büyük hücre kümelerini oluşturmaya yönelik davranışlarının yanı sıra GTA hidrojel­leri üzerinde tek tabakalı hücre yapışmasının baskın oldu­ğu şekil 5.16’de sunulan mikroskop görüntülerinde açıkça görülmektedir. Büyük sferoid benzeri hücre kümelenmelerinde en yüksek proliferasyon seviyeleri yüzeydeki hücrelerde görülürken, sferoid yapının merkezleri çok sayıda sessiz ya da nekrotik hücrelere sahiptir (Han vd. 2021). Bu sebeple, HT-29 hücrelerinin GTA hidrojel­leri üzerinde canlılıklarını HTA’ya göre daha iyi bir şekilde korudukları sonucuna varılmıştır. Buna ek olarak elde edilen görüntüler, tez çalışmasının ilk hedefleri arasında olan HTA-GTA hibrit hidrojel­leri üzerinde hücrelerin kümelenmesini veya tek tabakalı kültürünün sağlanabileceği hipotezini doğrulamaktadır.

5.4.2 Canlı/ölü testi bulguları

Hazırlanan hidrojel bileşenlerinin neden oldu­ğu potansiyel toksit etkileri değerlendirmek için HT-29 hücrelerinin sitotoksisite ve canlılığı, HTA (ağırlıkça %1 ve %3) ve sentezlenen GTA (ağırlıkça %5 ve %10) hidrojel­leri üzerinde 2. ve 7. gün analiz edilmek üzere incelenmiştir.



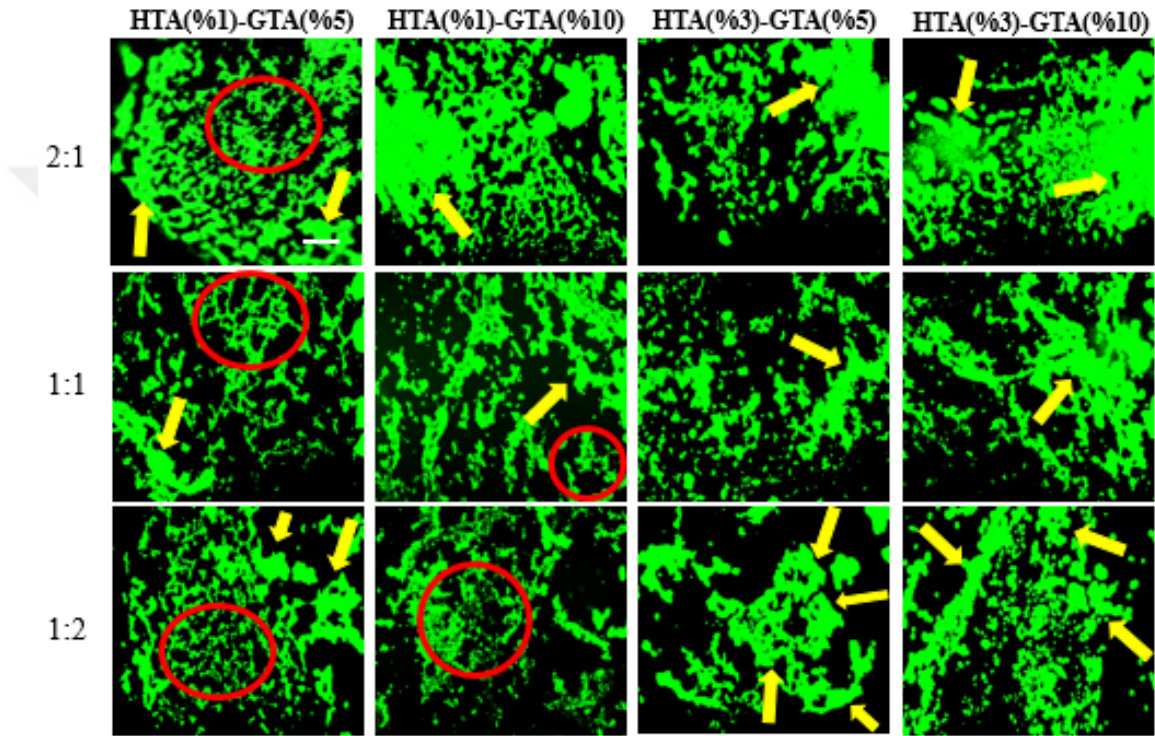
Şekil 5.17 Hibrit jel bileşenlerinin HT-29 hücreleri üzerinde in vitro sitotoksitesine ait floresan görüntüleri. (A) Kalsein-AM boyaması ile 2. gün hücre canlılığını temsil eden görüntüler, (B) Kalsein-AM boyaması ile 7. gün hücre canlılığını temsil eden görüntüler, (C) 7. gün yapılan Ethd-1 boyaması ile ölü hücrelerin elde edilen görüntüleri

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, 2. günde HTA ve GTA hidrojellerinin hücresel canlılık üzerinde olumsuz herhangi bir etki yaratmadığı gösterilmiştir (Şekil 5.17.A). 7. gün için analiz edilen görüntülerde, HT-29 hücrelerinin hücre canlılığının 7 gün boyunca sitotoksiste göstermeden devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 5.17.B,C).

5.4.3 Kalsein-AM boyaması ile hücresel adezyonun incelenmesi

HT-29 kanser hücrelerinin kümelenme veya tek tabaka oluşturarak invazif bir şekilde dağılmaya yönelik yapışma davranışlarını kontrol edilebilir sağlayan optimal hibrit jel formülasyonunu belirlemek için kalsein-AM boyaması yapılmıştır. Kanser hücrelerinin kümelenme veya invazif dağılma göstererek yüzeye tutunma karakterleri aynı zamanda

metastatik davranışları hakkında bilgi vermektedir (Chen vd. 2020). Bu sebeple, HT-29 kanser hücrelerinin yapışma karakterine yönelik metastatik davranışlarını da kontrol edilebilir kılan sistemin belirlenmesi, Kalsein-AM boyaması bulguları göz önünde bulundurularak incelenmiştir. Bu amaçla %1, %3 HTA ile kombine edilen %5, %10 GTA'dan oluşan HTA-GTA hidrojel sistemleri, yapışkan ve daha az yapışkan matrisler elde etmek için hacimce 1:1, 1:2 ve 2:1 oranlarında hazırlanmıştır (Çizelge 4.1.E-H).



Şekil 5.18 Kalsein boyama yoluyla HT-29 hücre yapışması ve kümelenmesinin, farklı konsantrasyon ve oran (2:1, 1:1, 1:2) kombinasyonlarında hazırlanan HTA-GTA hidrojelleri üzerinde değerlendirilmesine ait floresan mikroskobu görüntüleri, ölçek çubuğu: 200 μ m

%1 ve 3% HTA'nın %5 ve %10 GTA ile kombine edilmesiyle hazırlanan tüm hibrit kombinasyonlarında, HTA oranının arttırılması, beklenildiği gibi kanser hücre yapışmasının azalmasına neden olmuştur. Böylece, her dört hibrit jel kombinasyonunda da (%1 HTA-%5 GTA, %1 HTA-%10 GTA, %3 HTA-%5 GTA, %3 HTA-%10 GTA), en az hücre yapışmasının gözlemlendiği jel, HTA miktarının fazla olduğu 2:1 oranına sahip jeller olduğu görülmektedir (Şekil 5.18). Sonuç olarak, HTA miktarının fazla olduğu 2:1 oranlarında tek katmanlı küçük kümelenmelerin aksine gözlemlenen büyük

hücre kümelenmelerinin, tümör oluşumu sırasındaki morfogenezi andıran 3B hücre kümelenmelerinin yapısına sahip olduğu (Friedl vd. 2004), şekil 5.18’de bulunan sarı oklar ile gösterilmiştir.

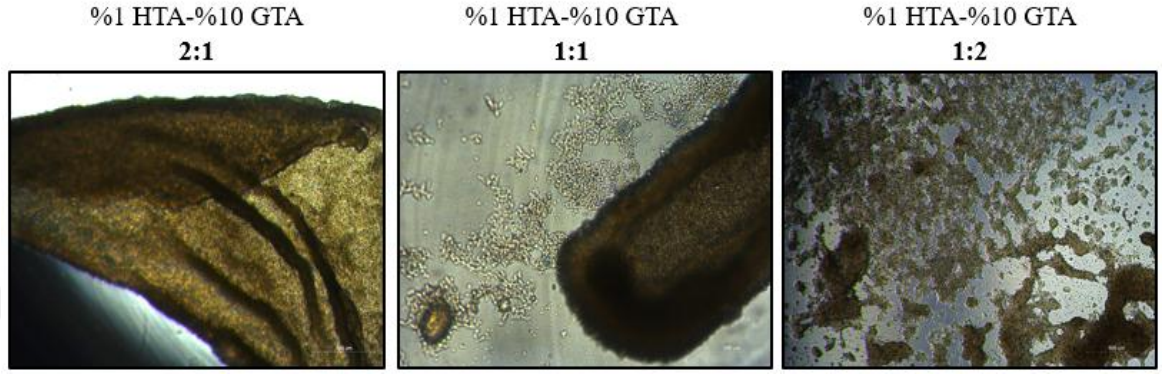
Hacimce 2:1 oranındaki HTA-GTA hidrojjellerinde gözlemlenen kümelenmeler, bileşen oranı 1:1 olarak değiştirildiğinde azaldığı gözlemlenmiştir. Diğer bir yandan, 1:1 oranında hazırlanan HTA-GTA hidrojjellerinde az miktarda oluşan kümelenmelerin yanı sıra jel yüzeyinde tek katmanlı hücre yapışmalarının baskın olduğu, şekil 5.18’deki görüntüler üzerinde kırmızı daireler ile gösterilmiştir.

HTA-GTA oranı hacimce GTA’nın fazla olduğu 1:2 oranında olacak şekilde düzenlendiğinde, HT-29 hücrelerinin jel üzerine yapışma yeteneğinde hacimce 1:1 ve 1:2 oranında olan hibrit jellere kıyasla artış gözlemlenmiştir.

HTA ve GTA konsantrasyonlarının hücresel yapışma üzerindeki etkisi incelendiğinde, özellikle HTA konsantrasyonunun düşük olduğu %1 HTA-%5 GTA ve %1 HTA-%10 GTA hidrojjellerinde, tek katmanlı ve invazif bir şekilde dağılma göstererek yayılan hücre kültürünün baskın olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bir yandan, HTA konsantrasyonun arttığı %3 HTA-%5 GTA hidrojjelinde, tek katmanlı hücre yapışması ile birlikte hücre kümelenmeleri de gözlemlenirken, GTA konsantrasyonunun da arttığı %3 HTA- %10 GTA hidrojjelinde hücre kümesi oluşumunun baskın olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar bir araya getirildiğinde, HTA konsantrasyonlarının düşük olduğu %1 HTA-%5 GTA ve %1 HTA-%10 GTA hidrojjellerinin kanser hücre yapışmasının ayarlanabilirliğini mümkün kılan jeller olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, her iki hidrojele (%1 HTA-%5 GTA ve %1 HTA-%10 GTA) ait görüntüler, GTA miktarının yüksek oranda kullanıldığı hidrojjellerin hücre yapışmasını ve özellikle tek tabakalı hücresel kümelenmeyi desteklediğine ait hipotezi de doğrulamaktadır. 2:1 oranından 1:2 oranına doğru düzenlenen sistemlerde, 3B hücre kümelenmesinden tek katmanlı hücre kümelenmesi ve invazif yayılma karakterine daha net geçiş göz önünde bulundurulduğunda, optimal hibrit sistem olarak uygun görülen %1 HTA- %10 GTA

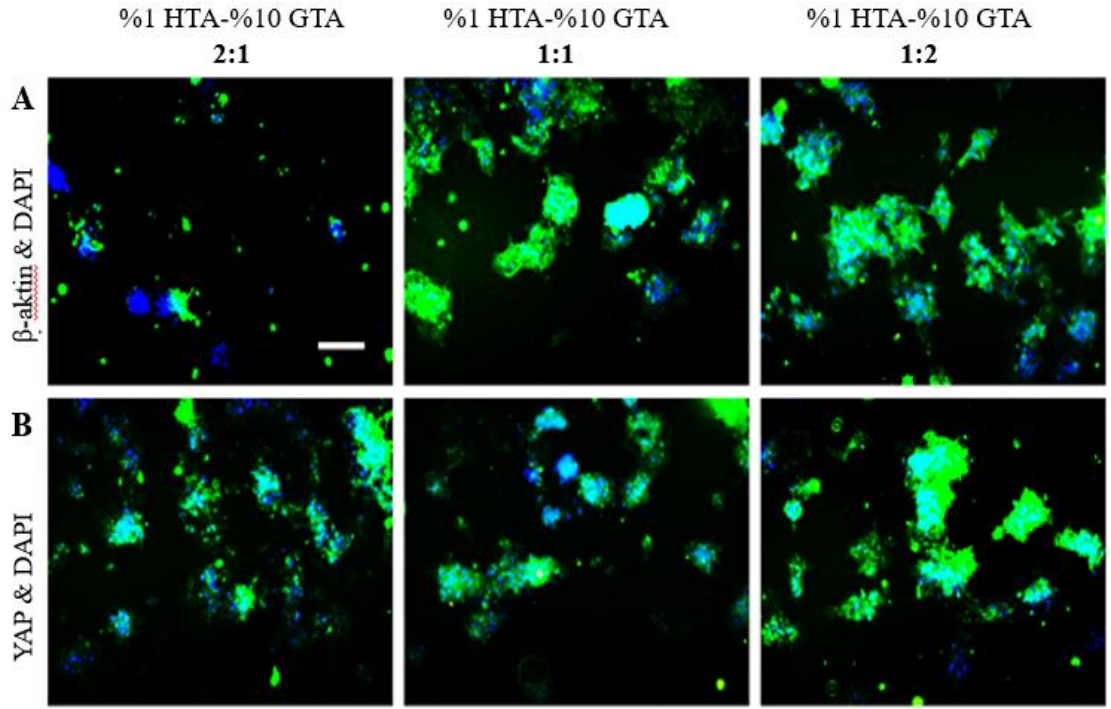
hidrojeli ile ileri aşamadaki deneylere devam edilmiştir. %1 HTA-%10 GTA hibrit hidrojelinde 2:1 oranından 1:2 oranına doğru geçişte, HT-29 kanser hücrelerinin 3B-yapı benzeri hücre kümelenmesinden tek katmanlı hücre tutunması ve invazif yayılma davranışına geçişi, şekil 5.19’da sunulan mikroskop görüntüleri ile desteklenmiştir.



Şekil 5.19 HT-29 kanser hücrelerinin %1 HTA-%10 GTA hibrit hidrojelinin 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarında 2B kültürü ve yapışma davranışlarını mikroskop görüntüleri

5.4.4 İmmüno Floresan boyaması bulguları

YAP, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin az olduğu ortamda hücre çekirdeğinde lokalize olan bir proteindir. Ancak bahsedilen etkileşimlerin arttığı durumlarda, YAP proteini fosforilasyona uğrayarak sitoplazmada lokalize olmaktadır. Kontrol olarak uygulanan β -aktin boyaması ise, hücre sitoplazmasında lokalize olan β -aktin’in eklenen antikor ile etkileşime girerek sitoplazmada floresan ışık yayması prensbine dayanır.



Şekil 5.20 %1 HTA-%10 GTA hidrojelileri üzerinde kültür edilen HT-29 hücrelerinin immünofloresan boyaması sonucu elde edilen floresan görüntüleri. (A) β -aktin boyanması, (B) YAP boyanması

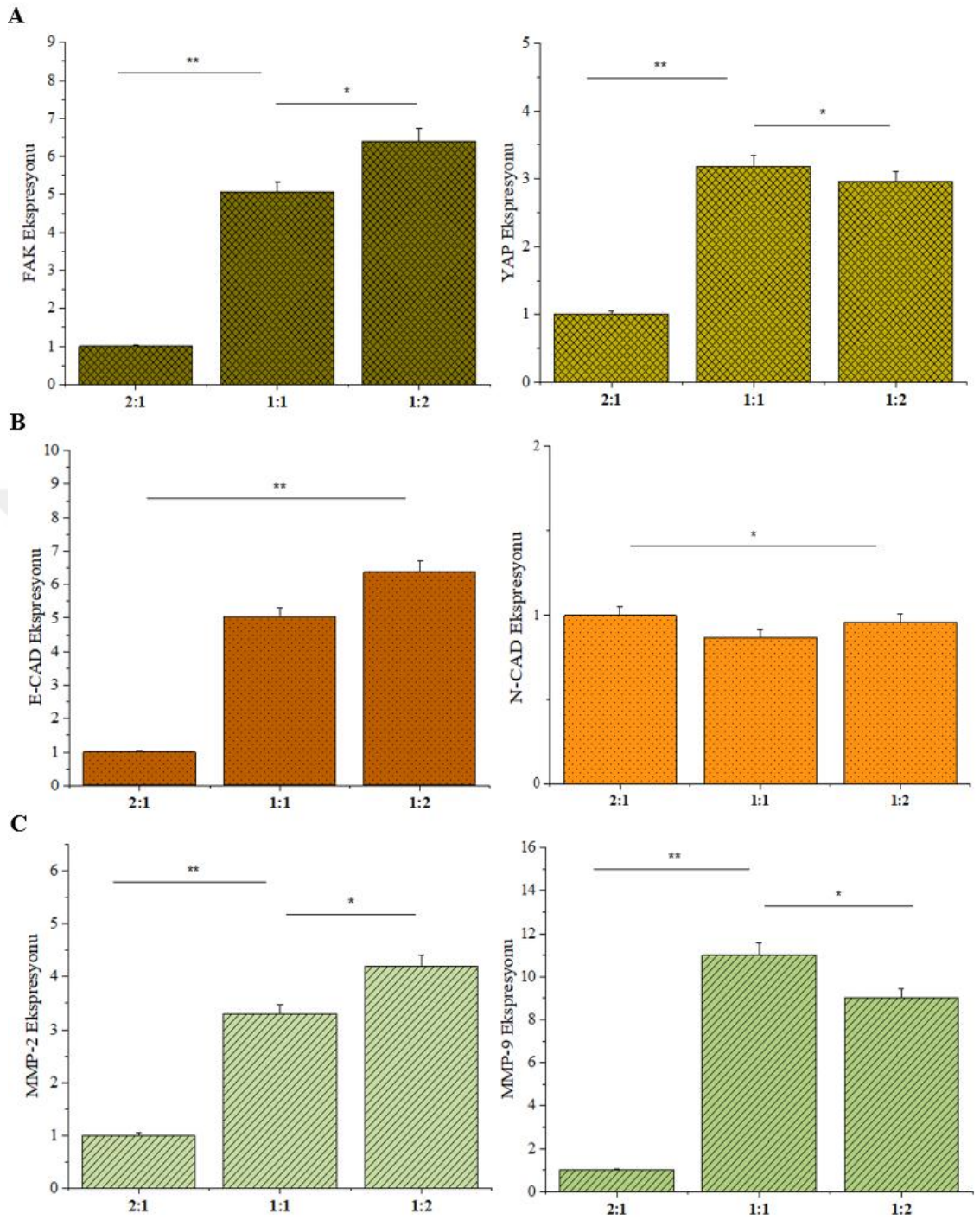
%1 HTA-%10 GTA hibrit hidrojellerinin 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarındaki hücre yapışmasının kontrol edilebilirliğini daha iyi karakterize etmek için hücre iskeletini proteini olarak β -aktin ve mekanik etkileşimlerdeki farklılıkları algılayan protein olarak YAP proteinini kullanılarak immünofloresan boyama yapılmıştır.

Elde edilen görüntüler, 2:1 oranında hazırlanan HTA-GTA üzerinde kültür edilen HT-29 hücrelerinde YAP'ın çekirdekte lokalize olduğunu ve 1:2'de ise YAP'ın hücre sitoplazmasında lokalize olduğunu göstermektedir. Bununla beraber, 1:2 oranında hazırlanan %1 HTA-%10 GTA hidrojelinin yapışkan karakterinden dolayı kanser hücrelerinin matris ile daha güçlü etkileşimler kurduğu, hücre-matris etkileşimlerinin 2:1'e göre baskın olduğu ve 1:2 oranının hücresel yapışmayı daha iyi desteklediği yapılan YAP boyaması ile doğrulanmıştır (Şekil 5.20.B).

%1 HTA-%10 GTA üzerinde kültür edilen HT-29 hücrelerinin hem β -aktin hem de YAP ekspresyonlarının beklendiği gibi 2:1'den 1:2'ye doğru artması, 2:1 oranında 3B hücre kümelenmelerinin yapısına sahip kümelenmelerin olduğunu ve 1:2 oranında hücrelerin invazif bir şekilde dağılma göstererek yayıldığını desteklemektedir (Şekil 5.20.A,B). Sonuç olarak, malzeme bileşenlerinin oranını ayarlayarak hücre yapışmasının ve morfogenezinin kontrol edilebileceği yapılan immünofloresan boyaması ile doğrulanmıştır.

5.4.5 RT-qPCR: HTA-GTA hidrojellerinde mekanotransdüksiyon ile EMT ve metastaz gen ekspresyonları arasındaki ilişkiler

Kolorektal adenokarsinom hücrelerinin farklı mekanik dayanıma sahip hibrit HTA-GTA hidrojelleri üzerindeki mekanotransdüksiyona bağlı EMT ve metastazik davranışları, gen ekspresyon analizleri ile incelenmiştir. Bu sebeple, 1:1, 1:2 (GTA-yüksek), 2:1 (HTA-yüksek) olmak üzere üç oranda hazırlanan %1 HTA-%10 GTA hibrit hidrojelleri üzerinde HT-29 hücreleri kültür edilmiştir ve analizler yapılmıştır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak 2:1 oranına sahip HTA-GTA hidrojelini baz alınmıştır.



Şekil 5.21 %1 HTA- %10 GTA hidrojenlerinin 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarında kültür edilen HT-29 hücrelerinin (A) mekanotransdüksiyon, (B) EMT ve (C) metastazik gen ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri

Hücre-matris etkileşiminde rol alan FAK ve YAP genleri incelendiğinde elde edilen sonuçlar, ifade edilen FAK ekspresyonunun artan GTA içeriği (yumuşak matris) ile

orantılı olarak arttığını gösterdi. FAK ekspresyonunun, 2:1 HTA-GTA hidrojeline kıyasla 1:1 ve 1:2 oranına sahip hidrojellerde kültür edilen kanser hücreleri için sırasıyla 5 ve 6.5 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı şekilde YAP ekspresyonlarında 2:1 (HTA-yüksek) oranından 1:1 ve 1:2 (GTA-yüksek) oranına doğru gözlemlenen 3 katlık artış ile, yumuşak matrislerde daha yüksek hücre-matris etkileşimlerinin baskın olduğu doğrulanmıştır.

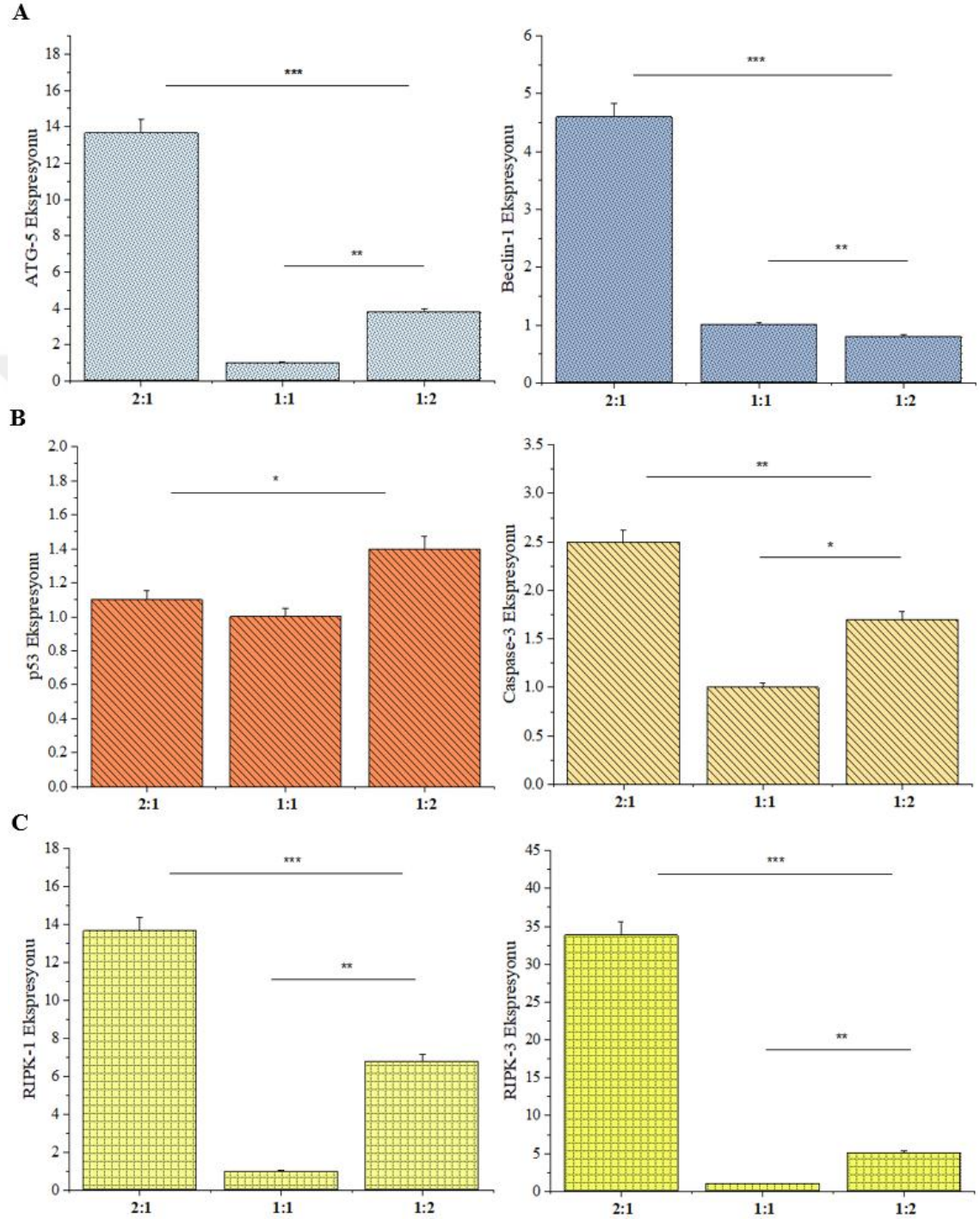
HT-29 hücrelerinin metastatik karakteri MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonları ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, 2:1 (HTA-yüksek) oranından 1:2 (GTA-yüksek) oranına doğru hücrelerde ifade edilen MMP2'nin 4 katlık bir artışa sahip olduğunu ve metastazik genotipin 1:2'de baskın olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuç, hücrelerin MMP9 ekspresyonlarının 2:1 oranına kıyasla 1:1, 1:2 oranında sırasıyla 11 ve 9,2 kat fazla ifade edilmesi ile desteklenmiştir. Buna ek olarak 1:2 oranında, sert ve hücrelerin sferoid oluşturmasını sağlayan matrise göre (2:1) metastazik karakterlerin oldukça fazla olduğu elde edilen MMP2 ekspresyonları ile desteklenmiştir.

Epitel hücrelerde yüksek miktarda bulunan E-kadherin, iyi bilinen bir tümör baskılayıcı proteindir. E-kaderin ekspresyonunun kaybı ile mezenkimal fenotip belirteci olan N-kaderin ekspresyonunun artması, tümör ilerlemesi ve metastaz sırasında sıklıkla meydana gelir (Jolly vd. 2017). Bu amaçla elde edilen metastazik gen ekspresyonlarını doğrulamak için epitelyal-mezenkimal genler incelendiğinde, E-kaderin ekspresyonlarının 2:1 oranından 1:2 oranına doğru 14 katlık bir artış göstermesi ve N-kaderin ekspresyonlarının üç oran içinde düşük ifade edilmesi, EMT ile ilgili genlerin metastaz süreci ile ilgili olmadığı ve matris sertliğine bağlı olarak değişiklik gösterdiğini göstermektedir.

5.4.6 RT-qPCR: Apoptoz, otofaji ve nekroz gen ekspresyonlarının metastaz ile ilişkilendirilmesi

HT-29 hücrelerinin üç farklı (2:1, 1:1 ve 1:2) HTA-GTA hibrit hidrojel oranında belirlenen metastatik davranışlarının ardından metastaz ile ilişkili hücre ölüm mekanizmalarının incelenmesi sebebiyle apoptoz (casp-3, p53), nekroz (RIPK3, RIPK1)

ve otofaji (ATG-5, Beclin-1) için belirlenen gen ekspresyonlarına bakılmıştır. Bu çalışmada kontrol olarak 1:1 oranı baz alınmıştır.

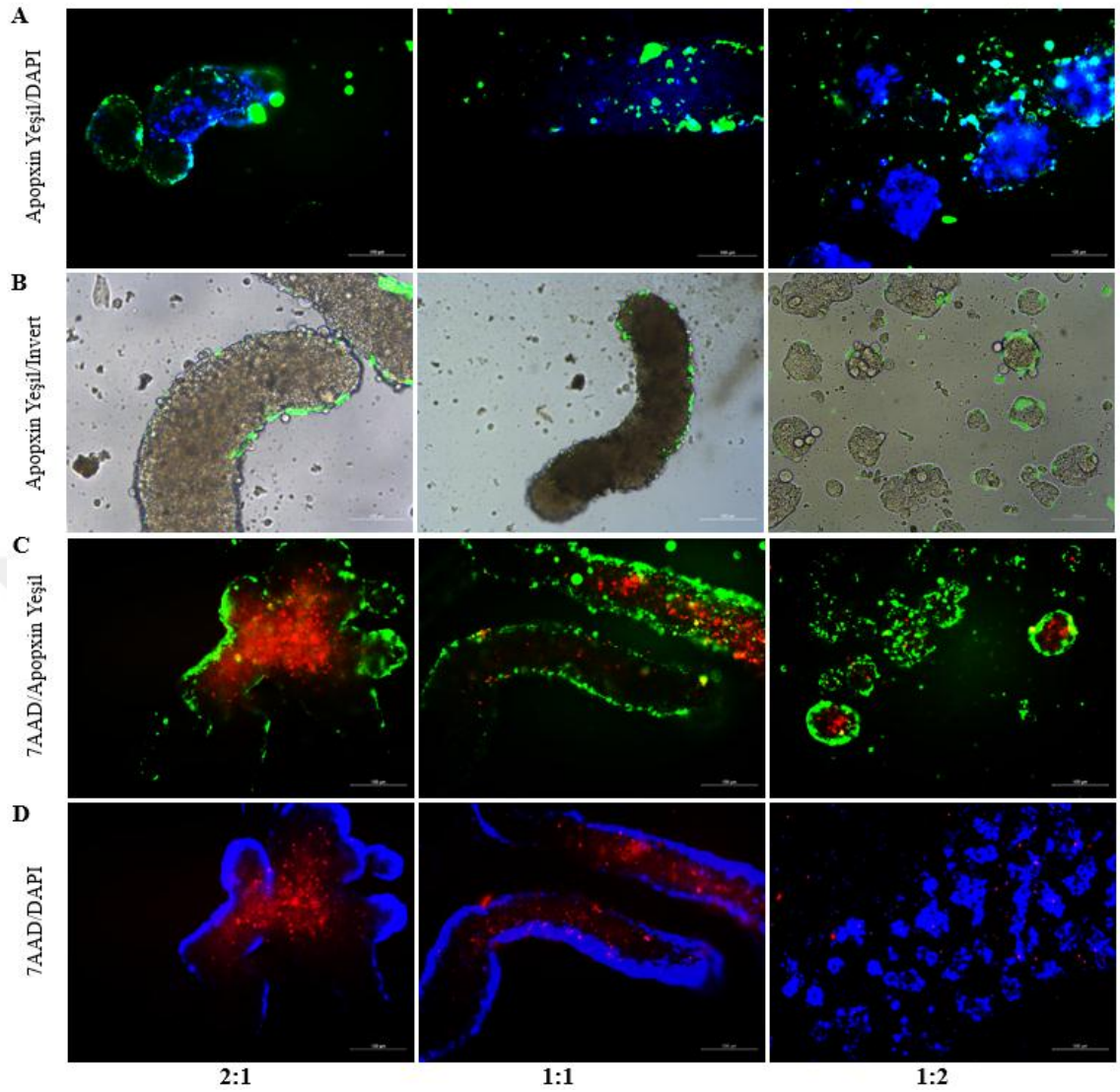


Şekil 5.22 %1 HTA- %10 GTA hidrojellerinin 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarında kültür edilen HT-29 hücrelerinin (A) otofaji , (B) apoptoz ve (C) nekroz ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri

Elde edilen sonuçlar her bir üç oran içinde apoptozun baskılandığını fakat oksidatif fosforilasyon sürecinde rol alan caspase-3 proteinine bağlı apoptozik yolağın, 1:1 ve 1:2 oranına kıyasla 2:1 oranında kültür edilen hücrelerde sırasıyla 2,5 ve 1,5 kat yüksek ifade edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 5.22.C,D). Diğer bir yandan, metastazik genlerin yüksek ifade edildiği 1:1 ve 1:2 oranında beklenildiği gibi otofajik gen ekspresyonlarının 2:1'e kıyasla ATG-5 için sırasıyla 14 ve 3,5 kat, Beclin-1 için ise 4,5 kat kadar düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.22.A,B). Üç farklı matris üzerinde kültür edilen kanser hücrelerinin 2:1 oranında hücre ölüm yolağı olarak kontrole kıyasla RIPK-1 için 14 kat ve RIPK-3 için 34 kat yüksek ekspresyon ile nekroza yöneldikleri görülmektedir (Şekil 5.22.E,F). Hücrelerin tamamen invazif bir şekilde yayılma sergilediği 1:2 oranında gözlemlenen nekroz ekspresyonlarının, hücrelerin sferoid ve invazif yayılma sergilediği 1:1 oranına kıyasla RIPK-1 için 7 kat ve RIPK-3 için 5 kat yüksek ifade edildiği şekil 5.22'de sunulan grafiklerde görülmektedir.

5.4.7 Apoptoz-nekroz testi bulguları

Apoptin, fosfatidilserin (PS) translokasyonunu ölçerek hücre apoptozunu izlemek için kullanılır. Apoptoz sırasında PS, plazma membranında oldukça yüksek seviyelerde bulunmaktadır. PS'nin hücre yüzeyindeki görünümü, hücre apoptozunun başlangıcının bir göstergesidir ve morfolojik değişiklikler gözlemlenmeden önce saptanabilir. Elde edilen görüntülerdeki yeşil floresan, PS sensörü olarak kullanılan apoptin'in hücre yüzeyindeki PS'ye bağlanması ile apoptozun görselleştirilmesine aittir. Elde edilen kırmızı floresan ise, 7-ADD'nin hasarlı hücrelerin çekirdeğinde lokalize olması ile nekrozun görselleştirilmesine aittir.



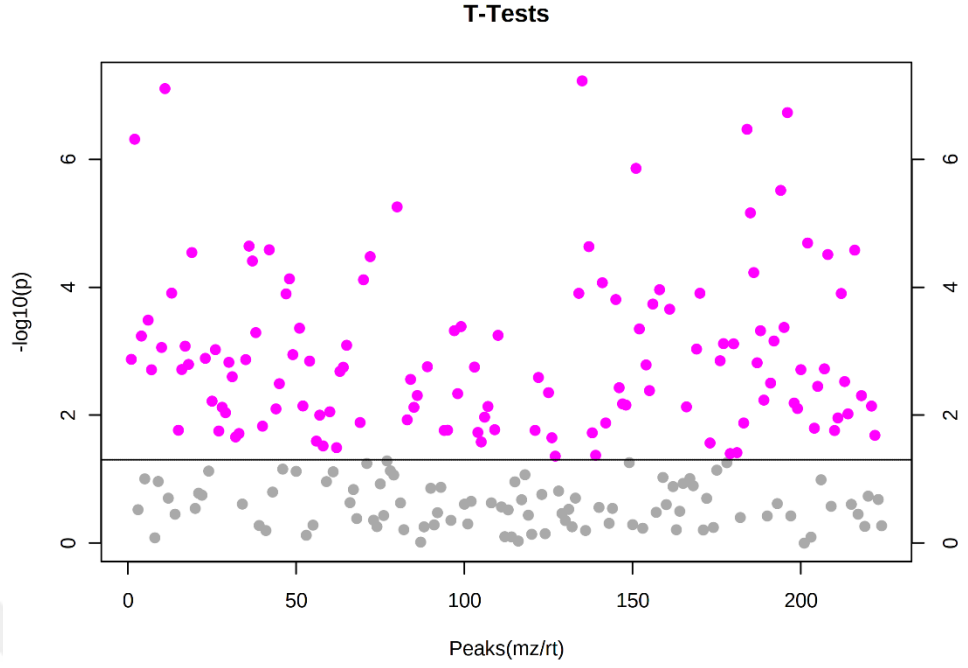
Şekil 5.23 %1 HTA-%10 GTA hidrojelinde kültür edilen HT-29 hücrelerine ait apoptoz-nekroz floresan görüntüleri

Apoptoz-nekroz immüno Floresan testinden elde edilen görüntüler, 2:1 hidrojel üzerinde kültürlen HT-29 hücrelerinin nekroz ekspresyonunun (kırmızı renkle gösterilen), qPCR analizinde de gözlemlendiği gibi 1:1 ve 1:2 hidrojel platformlarına kıyasla daha yüksek olduğunu görülmektedir. Şekil 5.23.C’de hücrelerin yetersiz hücre-matris etkileşimleri nedeniyle 2:1 hidrojel üzerinde büyük sferoid benzeri kümeler oluşturdukları açıkça görülmektedir. Bu bulgu, 2:1 hidrojelinde kültür edilen hücrelerin nekrotik ölümünün tümör-kaynaklı olmadığını ve hücrelerin matris üzerinde agregatlaşması ile yeterli oksijen ve glikoz alımı sağlanamamasından dolayı nekrotik ölümüne yöneldiklerini desteklemektedir. Buna ek olarak, apopxin yeşilin invert

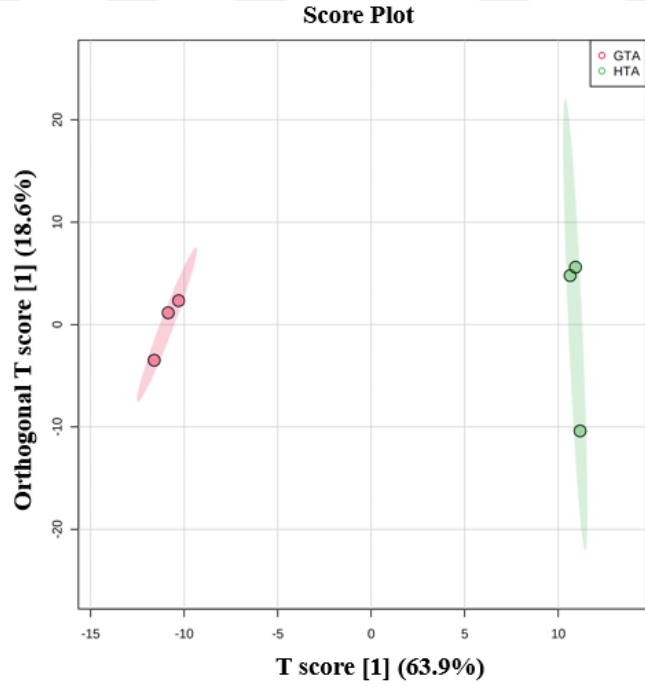
mikroskopik görüntülerle birleştirildiği şekil 5.23.B’de, apoptoza bağlı hücre ölümünün yalnızca büyük hücre kümeleri ve kolonilerin sınırında bulunan hücrelerde aktif olduğu görülmektedir ve bu da malzeme üzerinde kültürlenmiş kanser hücrelerinde apoptozun baskılandığını ifade etmektedir. Ayrıca apoptin yeşilin DAPI ile birleştirildiği görüntülerde (şekil 5.23.A) DAPI’nin çekirdekte lokalize olması, herhangi bir DNA hasarına uğramadan hidrojeller üzerinde kültür edilen aktif kanser hücrelerini göstermektedir. Şekilde görüldüğü üzere, DAPI 1:1 ve 2:1’de büyük hücre kümelerinin sınırında yer alan hücrelerde lokalize olurken, 1:2 (GTA-yüksek) oranında DAPI’nin hem koloni sınırlarda hem de kolonilerin içindeki hücrelerin çekirdeğinde lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Hücre aktivitesi ve hücrelerin DNA hasarına karşı direnci kanser hücrelerinin metastatik genotipini yansıttığından, 1:2-hidrojinin metastazı indüklemeye kapasitesi doğrulanmıştır.

5.4.8 Metabolomik analiz: HT29 hücrelerinin HTA ve GTA hidrojelleri üzerinde kültürlenmesi ile elde edilen metabolomik profillemesi

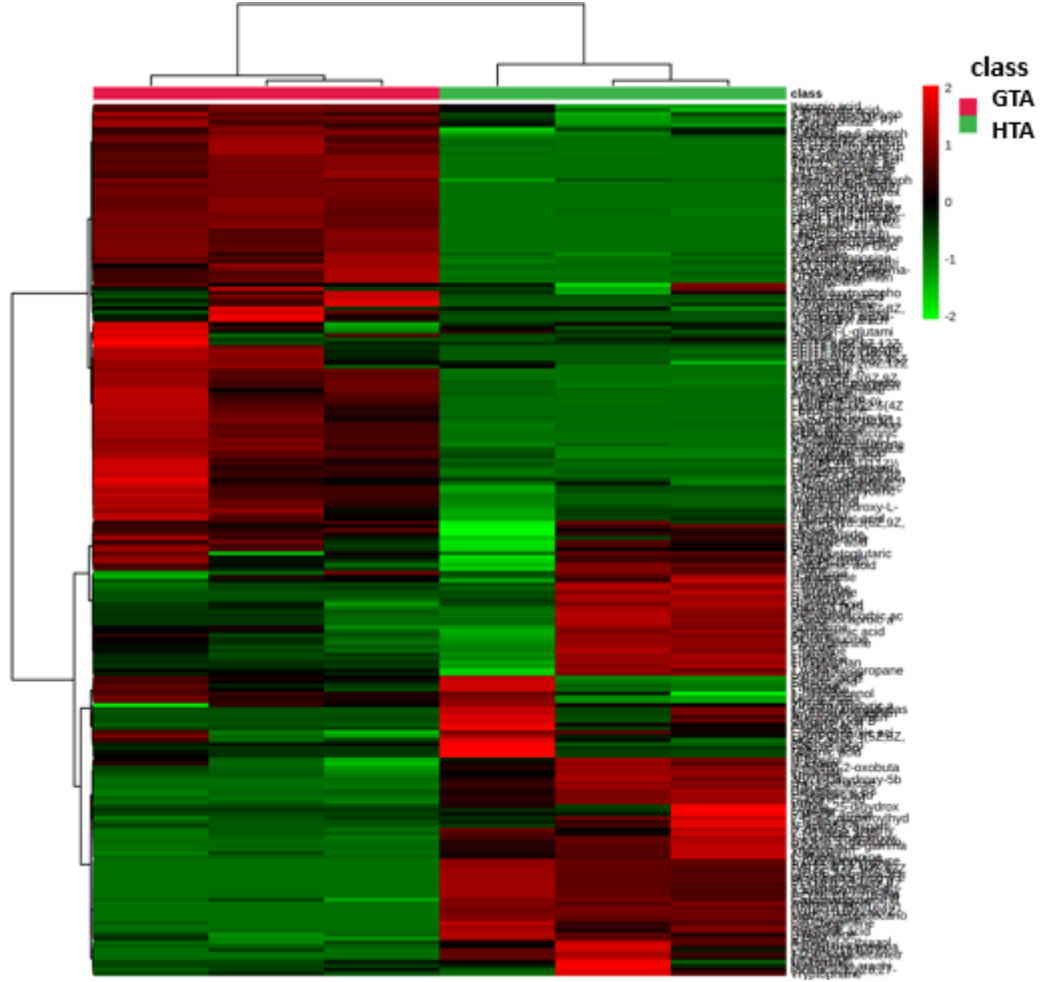
Öncelikle, HT29 hücrelerinin hibrit hidrojel komponentleri olan HTA ve GTA üzerinde kültürlendiklerinde meydana gelen farklı yapışma fenotiplerini metabolit düzeyde aydınlatmak amacı ile HT29 hücrelerinin HTA ve GTA hidrojelleri üzerindeki metabolomik profillerinde meydana gelen farklılıklar incelendi. Toplam 11422 (pozitif iyon modu) ve 8394 (negatif iyon modu) kütle özelliği tespit edildi. Yapılan analizlerde, LC-qTOF-MS ile 113 metabolit; GC-MS ile 763 metabolit tespit edildi.



Şekil 5.24 HTA ve GTA hidrojelileri üzerinde kültürlen HT-29 hücrelerinin metabolomik profillerindeki farklılığı ayırt etmek için uygulanan T-testi

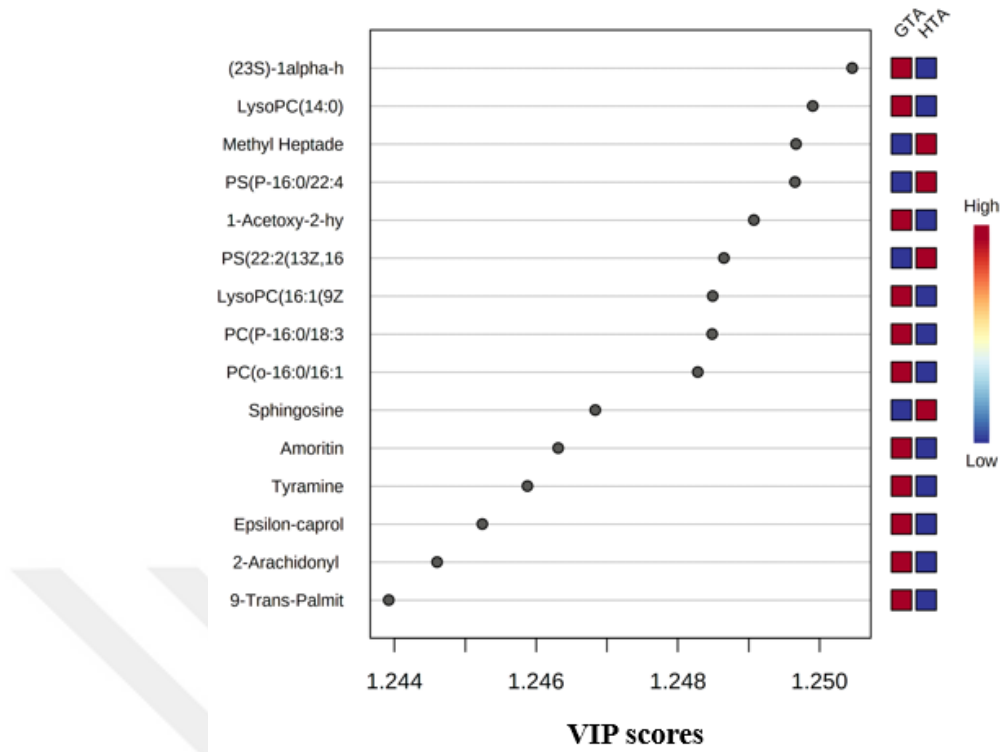


Şekil 5.25 HTA ve GTA hidrojelileri üzerinde kültürlen HT-29 hücrelerinin guplar içi ve guplar arası metabolit profilindeki ayırımı gösteren PLS-DA diyagramı

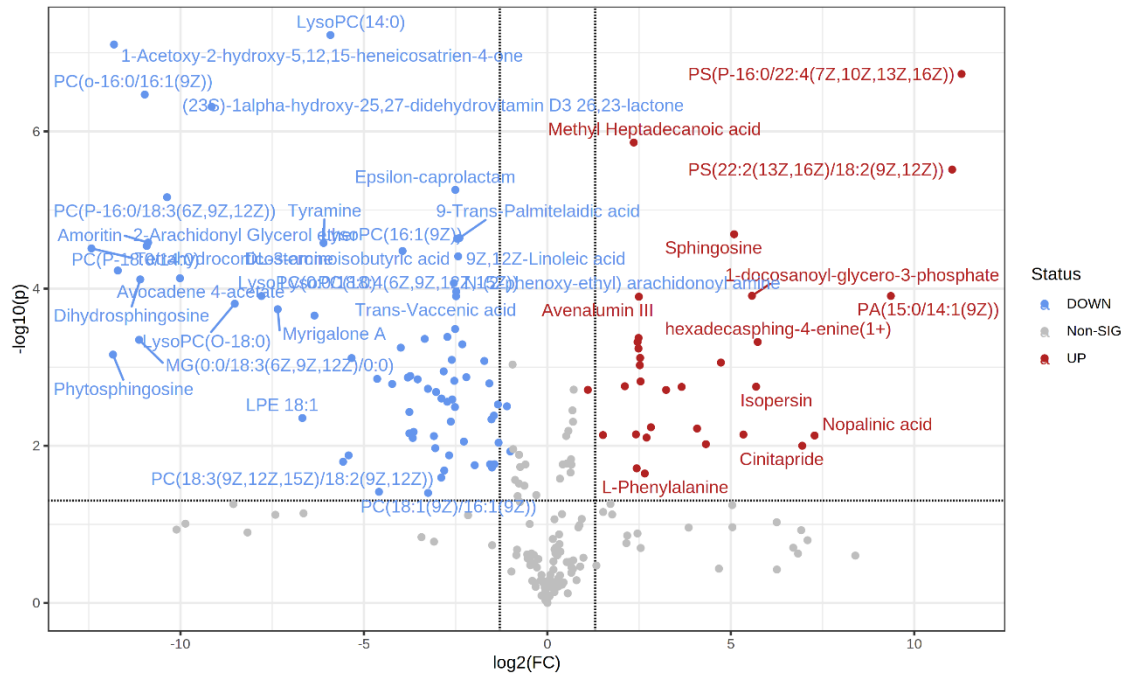


Şekil 5.26 HTA ve GTA hidrojelinde üretilen HT29 hücrelerinde farklılaşan metabolitler tarafından elde edilen hiyerarşik kümeleme analizi

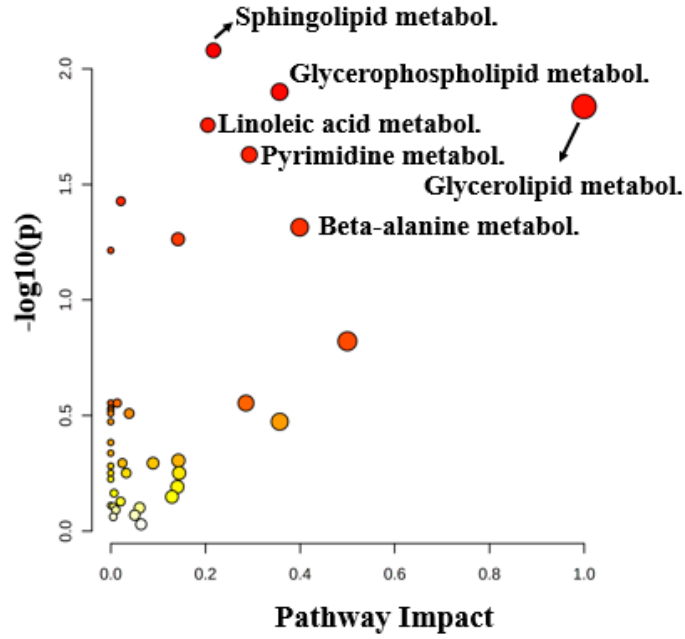
Metabolomik analiz için elde edilen t-testi sonucunda 2 grup arasında 120 metabolitin anlamlı bir şekilde değişiklik gösterdiği saptandı (Şekil 5.24). Metabolomik profillemeye meydana gelen grup içi ve gruplar arası farklılıkları incelemek için yapılan PLS-DA analizi sonucunda, HTA ve GTA hidrojelinde üretilen HT29 hücrelerinin metabolik fenotipleri arasında dikkate değer bir ayrım olduğunu gözlemlendi (Şekil 5.25). Gruplar içindeki metabolitlerin yoğunluğunu ve gruplar arası metabolit geçişteki farklılıkları temsil eden renk kodlu hiyerarşik küme analizi (HEATMAP) ile elde edilen metabolomik modelde, GTA ve HTA arasında net bir metabolit farklılık geçişi olduğu gözlemlendi (Şekil 5.26).



Şekil 5.27 HTA ve GTA grupları arasında HT29 hücreleri için en çok farklılığa uğrayan metabolitleri listeleyen VIP grafiği



Şekil 5.28 Gruplar arasında yukarı/aşağı ve benzer düzeyde regüle edilen metabolitleri gösteren yanardağ dağılım grafiği

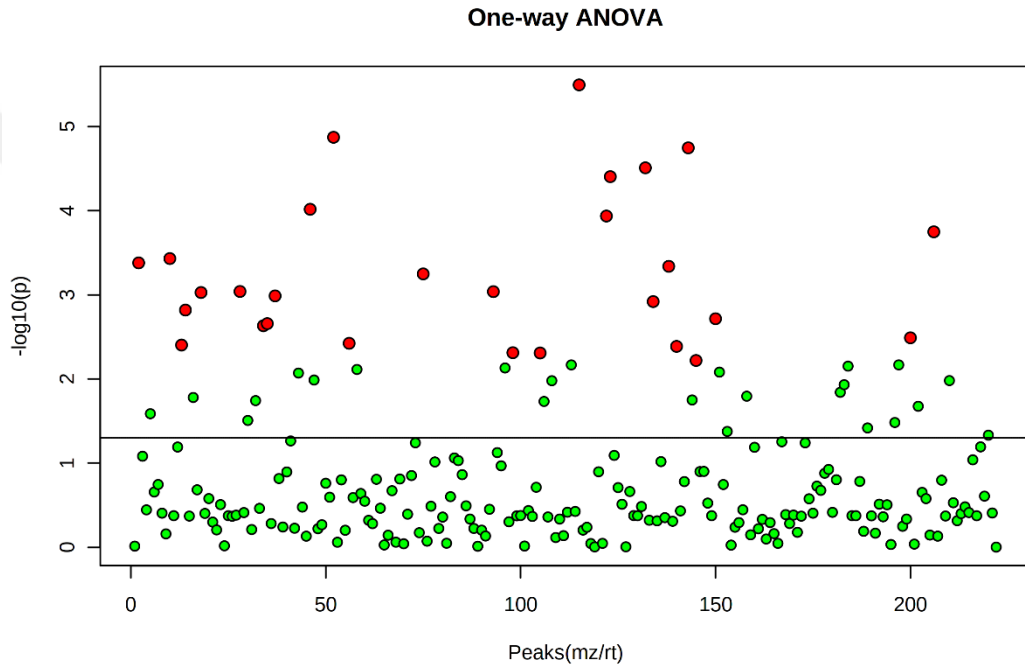


Şekil 5.29 HTA ve GTA hidrojenleri üzerinde kültürlen HT29 hücrelerinde anlamlı şekilde etkilenen yolları temsil eden yol etki grafiği

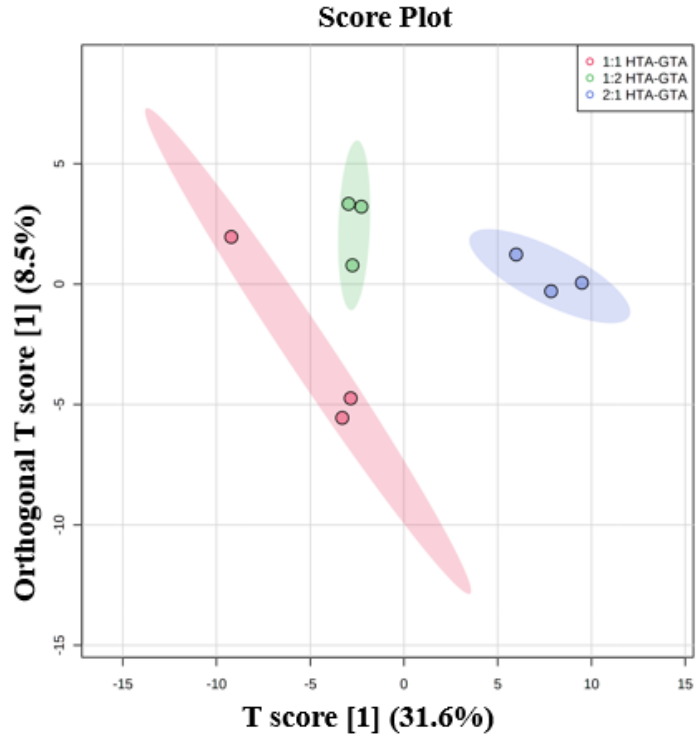
VIP grafiği, gruplar arasındaki en etkili metabolitlerin anlaşılmasını sağlamak için oluşturuldu (Şekil 5.27). Elde edilen sonuç ile, HTA ve GTA arasında en belirgin şekilde değişen on beş metabolitin arasında lakton, metil heptadekanoik asit ve sfingosinin olduğu gözlemlendi. Bu metabolitlerin çoğunun yalnızca GTA'da yukarı regüle edilip HTA'da aşağı regüle edilmesi, iki grup arasında en üst düzeyde farklılaşan metabolitlerin GTA'dan türetildiğini göstermektedir. GTA ve HTA arasındaki metabolomik çeşitliliği incelemek için, iki grup arasındaki genel farkı yansıtan bir yanardağ dağılım grafiği oluşturuldu (Şekil 5.28). Lakton, ve epsilon-kaprolaktam iki grup arasında önemli ölçüde aşağı regüle edilirken; metil heptadekanoik asit ve sfingosinin yukarı regüle edilen ana metabolitler olduğu gözlemlendi ve bu sonucun VIP grafiği ile örtüştüğü doğrulandı. Son olarak farklılaşan metabolitler göz önünde bulundurularak yapılan yolak analizinde, sfingolipid metabolizması ($p < 0.008$), gliserofosfolipid metabolizması ($p < 0.012$), linoleik asit metabolizması ($p < 0.015$) ve pirimidin metabolizmasının ($p < 0.018$), HT-29 hücrelerinin HTA ve GTA hidrojenleri üzerine yapışmasında rol alan ana yollar olduğu sonucuna varıldı (Şekil 5.29).

5.4.9 Metabolomik analiz: HT29 hücrelerinin HTA-GTA hibrit hidrojelinde üretilmesi ile elde edilen metabolomik profillem

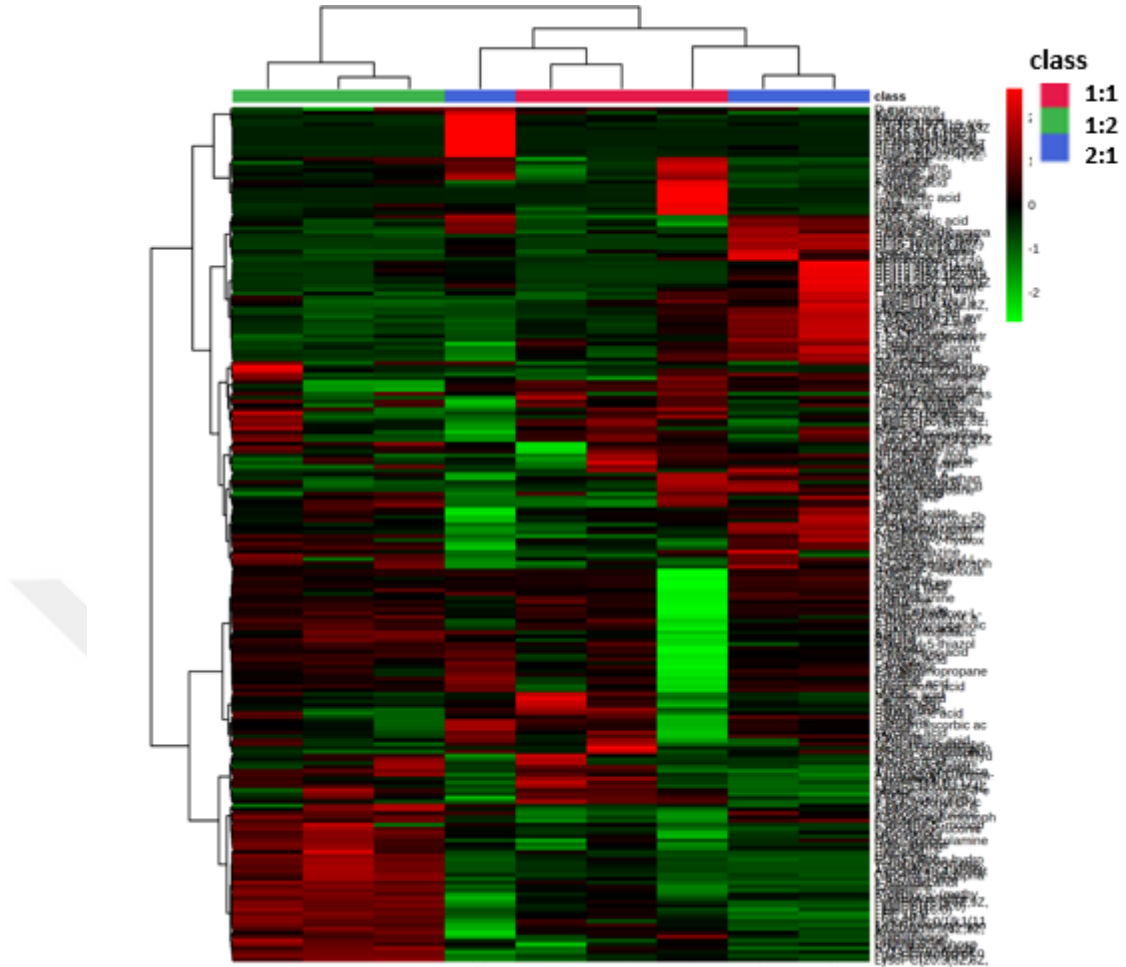
HTA ve GTA için yapılan metabolomik analizlerin ardından, HTA-GTA hibrit hidrojelinde üretilen bileşen oranlarında (2:1, 1:1, 1:2 v/v) kültür edilen HT29 hücrelerinin metabolomik yapısındaki farklılıkları aydınlatmak ve farklı metastatik davranışlarını metabolomik düzeyde incelemek için kapsamlı bir hedeflenmemiş metabolomik analizi yapıldı.



Şekil 5.30 HTA-GTA hidrojelinde üretilen bileşen oranları (2:1, 1:1, 1:2 v/v) üzerinde üretilen HT-29 hücrelerinin metabolomik profillerindeki farklılığı ayırt etmek için uygulanan ANOVA testi

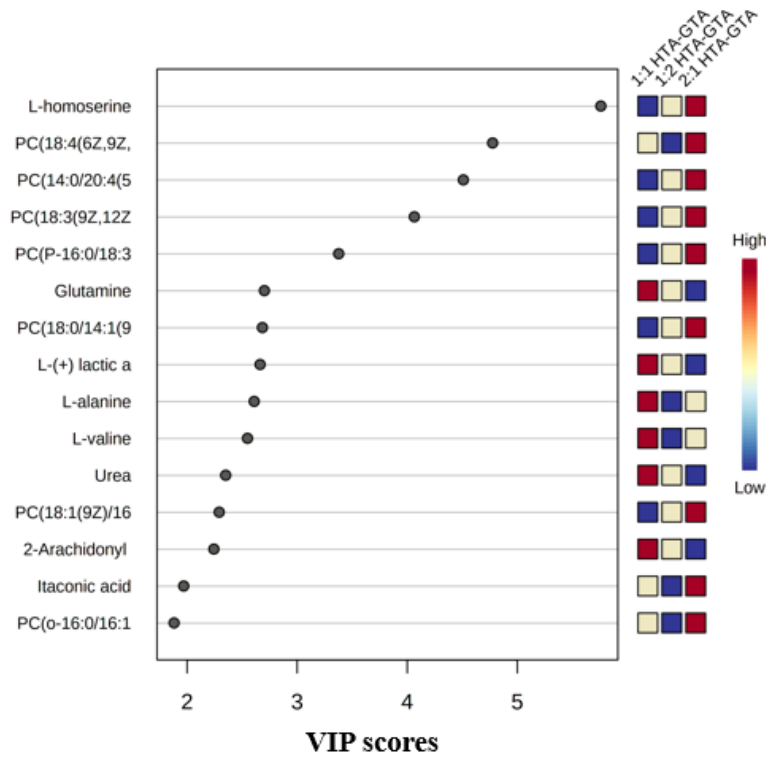


Şekil 5.31 HTA-GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) hidrojel­leri üzerinde kültürlen­en HT-29 hücrelerinin gruplar içi ve gruplar arası metabolit profilindeki ayrımı gösteren PLS-DA diyagramı

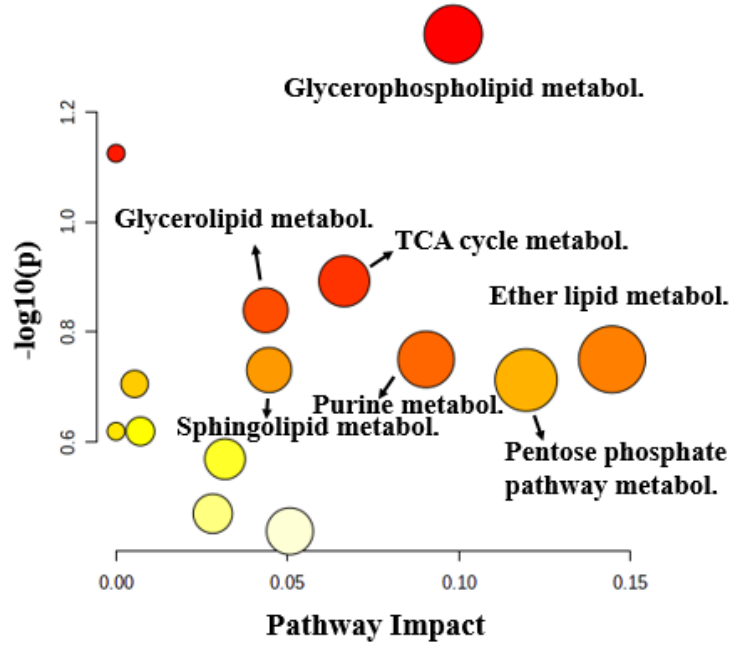


Şekil 5.32 HTA-GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) hidrojenleri üzerinde kültürlen HT29 hücrelerinde farklılaşan metabolitler tarafından elde edilen hiyerarşik kümeleme analizi

Metabolomik analiz için elde edilen ANOVA testi sonucunda 3 grup arasında 120 metabolitin anlamlı bir şekilde değişiklik gösterdiği saptandı (Şekil 5.30). PLS-DA skor grafiği, gruplar arasındaki tekrarlar oldukça tutarlı bir metabolomik yapı sergilerken; gruplar arasında net bir metabolomik küme ayrımı olduğunu doğruladı (Şekil 5.31). Farklılık yaratan metabolitlerin değişiklik eğilimini incelemek için elde edilen HEATMAP analizinde; 2:1, 1:1 ve 1:2 (v/v) HTA-GTA oranlarında kültürlen HT-29 hücreleri için net bir metabolomik ayrımı simgelen geçişin olduğu gözlemlendi (Şekil 5.32).



Şekil 5.33 HTA-GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) grupları arasında HT29 hücreleri için en çok farklılığa uğrayan metabolitleri listeleyen VIP grafiği



Şekil 5.34 HTA-GTA (2:1, 1:1, 1:2 v/v) hidrojenleri üzerinde kültürlen HT29 hücrelerinde anlamlı şekilde etkilene yolları temsil eden yol etki grafiği

Farklı HTA-GTA oranlarında kültür edilen HT-29 hücrelerinde meydana gelen metabolit farklılıkları spesifik olarak ayırt etmek amacı ile gruplar arasındaki en etkili ayrımı sergileyen metabolitler, VIP grafiğinde sunulmuştur (Şekil 5.33). Gruplar arasında en belirgin şekilde değişen on beş metabolitin arasında glutamin, L-(+)-laktik asit, L-alanin ve üre'nin 1:1 HTA-GTA'da kültür edilen HT29 hücrelerinde oldukça yukarı regüle edildiği gözlemlenirken; L-homoserin ve itanoik asit'in 2:1 oranında kültür edilen hücrelerde yukarı regüle edildiği gözlemlendi ve HEATMAP analizi ile uyum gösterdiği doğrulandı. Ayrıca sırasıyla 1:1 ve 2:1 oranlarında yukarı regüle edilen metabolitlerin, 1:2 oranında orta-düşük seviyede tanımlanması, bahsedilen metabolitlerin üç grup arasında metabolit küme ayrılmasına katkıda bulunduğunu doğruladı. Yapılan yolak analizi sonucunda üç grup arasında önemli ölçüde farklılık gösteren metabolitlerin, işlevlerini çoğunlukla gliserofosfolipid metabolizmasını ($p<0.05$) etkileyerek gerçekleştirdikleri gözlemlendi ve HT29 hücrelerinin farklı oranlardaki HTA-GTA hidrojelleri üzerinde meydana gelen metastatik genotip değişiminin bu yolak ile ilişkili olduğu sonucuna varıldı (Şekil 5.34).



6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, kolon kanseri hücrelerinin yapışma kapasitesini, yapışma sürecindeki moleküler fenotiplerini ve böylece metastazik karakterlerini kontrol edebilmek için öncelikle hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini destekleyen, tiramin ile modifiye edilmiş jelatin türevli ve enjimatik çapraz bağlanabilir GTA sentezlenmiştir. GTA sentezinin başarı derecesi H^1 -NMR ve FTIR spektroskopisi yapılarak ve GTA'nın hidrojel oluşturma yeteneği zaman ve frekans taramalı reolojik ölçümler yapılarak karakterize edilmiştir. Ardından farklı mekanik özelliklere sahip HTA-GTA hibrit hidrojelleri, değişen bileşen konsantrasyonlarında (%1, %3 HTA ve %5, %10 GTA) ve oranlarında (1:1, 1:2, 2:1 v/v) hazırlanarak hibrit hidrojellerin karakterizasyonları yapılmıştır. In vitro uygulamalarda öncelikle sentezlenen GTA'dan hazırlanan hidrojellerin ve hibrit jel bileşeni olan HTA hidrojellerinin, HT-29 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiştir ve ardından HTA-GTA jellerinin tek katmanlı bir kültürü veya hücre kümelenmesini indüklemeye yeteneği HT-29 hücreleri ile immünofloresan boyama yapılarak test edilmiştir. Hücresel yapışabilirlik için elde edilen sonuçlar gen ekspresyon analizleri ile desteklenmiştir ve metastazik davranıştaki değişiklikler metastaza özgü genler araştırılarak incelenmiştir. Son olarak hücrelerin metabolit fenotiplerindeki değişiklikler, metabolomik teknikleri içeren geniş çaplı omik analizleri ile değerlendirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında tiramin ile modifiye edilmiş jelatin, GTA sentezi üzerine odaklanılmıştır. Enzimatik olarak çapraz bağlanabilir GTA, literatürde yaygın olarak kullanılan ve jelatin ile tiramin hidroklorür arasında NHS / EDC kimyası yoluyla gerçekleşen bir yoğunlaştırma reaksiyonu yönteminin uygulanmasıyla sentezlenmiştir (Sakai vd. 2009). Tiramin modifikasyonunun jelatin yapısına etkisini ve GTA sentezinin verimini gözlemlemek için modifiye edilmemiş saf jelatin ve sentezlenen GTA'nın FTIR ve H^1 -NMR spektrumları karşılaştırılmıştır. FTIR analizinde elde edilen spektrumlar, daha önce literatürde sentezlenen GTA spektrumlarıyla uyuşmakta ve tiramin modifikasyonunun jelatinin yapısını bozmadan yapıya katıldığını desteklemektedir (Li vd. 2015). H^1 -NMR spektrumları incelendiğinde ise, jelatin yapısını gösteren ortak tepe noktalarına ek olarak GTA spektrumunda $\delta = 7.2$ ve $\delta =$

6.9 ppm'de gözlemlenen ve tiraminin fenil protonlarını temsil eden sinyal artışları, jelatinin başarılı bir şekilde tiramin ile konjuge olduğunu doğrulamakta, ayrıca GTA sentezi ve karakterizasyonunu içeren çalışmalarda gözlemlenen spektrumlarla bire bir uyuşmaktadır (Lee vd. 2018).

Sentezlenen GTA'nın hidrojelleşme yeteneğini test etmek üzere çalışma için belirlenen kontrasyonlarda (%5 ve %10) GTA çözeltileri hazırlanarak, HRP/H₂O₂ ilavesi ile enzimatik çapraz bağlama sağlanarak hidrojeller karakterize edilmiştir. Reolojik ölçümler sonucunda %5 ve %10 GTA hidrojelleri H₂O₂ ile çapraz bağlandığında, G' değerlerinin sırasıyla yaklaşık olarak 17 ve 19 kPa'a ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada GTA için elde edilen G' değeri daha önce GTA hidrojelinin reolojik ölçümlerini içeren çalışmalarda elde edilen değerlerden yüksektir (Sakai vd. 2009, Lee vd. 2018). Buna ek olarak, her iki hidrojel için G' değerlerinin G'' değerlerinden yüksek olması, hidrojelasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır (Patarroyo vd. 2020). GTA hidrojellerinin farklı konsantrasyonlarda sahip olduğu morfolojik özellikleri ve gözeneklilik yapısını incelemek üzere SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri sonucunda, %5 ve %10 GTA hidrojellerinin gözenek boyutunun sırasıyla 33 µm ve 50 µm civarında olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde, matrisin mekanik özelliklerinin ayarlanması ile değişen gözenek boyutunun, hücre yapışmasındaki önemini vurgulayan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Ji vd. 2011, Anguiano vd. 2017). Elde edilen SEM bulguları, GTA hidrojelinin yoğunluğunun değiştirilmesiyle gözeneklilik boyutunun ve matris sertliğinin ayarlanabilirliğinin mümkün olduğunu göstermekte ve GTA hidrojellerinin hücre yapışması, göç ve invaziflik gibi hücre davranışlarını incelemek için uygun bir matris olduğunu doğrulamaktadır. Degredasyon, ECM-mimetik hidrojellerin mekanik özelliklerinin zaman bazında değişmesine sebep olarak hareketlilik, yayılma ve göç etme gibi hücre davranışlarını etkiler (Dikovsky vd. 2006). Protein bazlı hidrojellerin dezavantajı ise hızlı bozunma göstermeleridir (Jonker vd. 2011). GTA hidrojellerinin fiziksel bozunma davranışlarını incelemek için yapılan degradasyon testinin sonucunda, hidrojellerin 7. güne kadar %30 civarında bir kütle kaybı sergiledikleri ve günlük %2 (%5 GTA)-%4,7 (%10 GTA)'lık bir kütle kaybı ile tamamen bozulmadan sırasıyla 50 ve 21 gün bütünlüklerini korudukları tespit edilmiştir. Şişme oranı, bir materyalin vücut sıvılarını

absorbe etme ve besinleri ve atıkları değiştirme yeteneğini ifade eder (Nasiri ve Mashayekhan, 2017). GTA hidrojellerinin su tutma kapasitesitelerini belirlemek için yapılan şişme testi sonucunda, hidrojellerinin 3 saat içinde orjinal hacimlerinin yaklaşık olarak %100'ü kadar suyu absorblayabildikleri gözlemlenmiştir. GTA hidrojellerinin üstün su tutma yetenekleri, gözenekli matris yapısı ile ilişkilendirilmiş ve biyoaktif maddelerin emilimi ve salımı için ideal bir matris olduğu doğrulanmıştır (Salerno vd. 2011).

Çalışmanın bir sonraki aşaması, HTA-GTA hibrit hidrojellerinin hazırlanmasını ve karakterizasyon çalışmalarını içermektedir. İlk olarak, HTA-GTA hibrit hidrojel yapısal karakterizasyonu için FTIR spektroskopi analizleri yapılmıştır. Elde edilen bulgular, HTA-GTA hibrit hidrojelinde HTA ve GTA'ya ait kimyasal bağları temsil eden tüm karakteristik tepe noktaları gözlemlenmiştir. HTA-GTA'ya ait FTIR spektrumunun literatüde yer alan hyaluronik asit-jelatin bazlı hibrit malzemelerin FTIR spektrumu ile bire bir aynı olması, hem HTA hem de GTA'nın hibrit HTA-GTA hidrojelinin yapısında başarılı bir şekilde yer aldığı doğrulamaktadır (AnilKumar vd. 2019). Reolojik karakterizasyon çalışmalarına bakıldığında, öncelikle hibrit jel komponenti olan HTA'nın hidrojelleşme kapasitesi frekans-tarama reolojisi ile test edilmiş ve HTA hidrojelasyonunun başarısı literatürde yer alan diğer çalışmalarda da gözlemlendiği gibi, $G'/G'' > 10$ bulunması ile doğrulanmıştır (Vildanova vd. 2021). HTA-GTA çözeltisinin zaman-taramalı reoloji ölçümlerinde, G' değerinin G'' değerinden yüksek olduğu ($G'/G'' > 1$) gözlemlenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalar göz önünde bulundurularak, HTA'nın negatif yüklü yapısı ve GTA'daki zıt yüklü amino asit kalıntılarının HTA ve GTA arasında zayıf bir moleküller arası etkileşimi meydana getirdiği, elde edilen $G'/G'' > 1$ değeri ile doğrulanmıştır (Selyanin vd. 2015). Son olarak, HTA-GTA çözeltisinin HRP/H₂O₂ ilavesiyle çapraz bağlanması sonucu elde edilen frekans-taramalı reoloji ölçümlerinde G' değerinin G'' değerinden yüksek bulunması, katı benzeri HTA-GTA hidrojel oluşumunun başarılı bir şekilde gerçekteştiğini göstermektedir. Elde edilen SEM görüntüleriyle, GTA hidrojelinin HTA'ya kıyasla daha mikro gözenekli bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. HTA ve GTA oranlarının ayarlanması ile elde edilen %1 HTA-%10 GTA hibrit hidrojelinde ise gözlemlenen değişken gözeneklilik ve gözenek boyutu göz önünde bulundurulduğunda, HTA-GTA

hidrojellerinin matris sertliğini ve hücrelerin mekanik davranışlarını kontrol edilebilir kılan bir sistem olduğu doğrulanmıştır (Vlierberghe vd. 2007).

Malzeme ve jel karakterizasyonlarının ardından in vitro çalışmalara geçilmiştir. HTA (%1 ve %3) ve GTA (%5 ve %10) hidrojellerin sitotoksik etkileri belirlenen zaman noktalarında XTT ve Canlı/Ölü testi yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar HTA ve GTA hidrojellerinin sito-uyumlu olduğunu göstermektedir. Literatürde, sferoid ve sferoid benzeri hücre kümelenmelerinin merkezinde çok sayıda sessiz ya da nekrotik hücrelerin bulunduğu dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Wallace ve Guo 2013, Brauchle vd. 2014, Dini vd. 2016). XTT bulgularına bakıldığında, GTA hidrojellerinde hücre canlılığının HTA hidrojellerine göre anlamlı şekilde fazla olması, şekil 5.15'da görüldüğü üzere HT-29 hücrelerinin HTA hidrojelleri üzerinde yetersiz vaskülarizasyon, hipoksi ve glukoz yoksunluğu gibi metabolik streslerin görüldüğü büyük hücre kümelerini oluşturmalarıdır (Zhang vd. 2009). Diğer bir yandan, GTA hidrojellerinde tek tabakalı hücre yapışmasının baskın olduğu ve HT-29 hücrelerinin invazif bir şekilde yayıldığı şekil 5.16.B'de açıkça görülmektedir. Bu sonuç, HT-29 hücrelerinin GTA hidrojelleri üzerinde canlılıklarını HTA'ya göre daha iyi bir şekilde sürdürdüklerini göstermektedir ve daha önce literatürde hücre canlılığı üzerine elde edilen bulgular ile uyumluluk göstermektedir (Sakai vd. 2019).

Kanser in vitro modellerinin geliştirilmesi için gerçekçi bir hücre kültürü mikroçevresinin tasarlanması çok önemlidir. Hücre-matris ve hücre-hücre etkileşimi ile oluşan fokal adezyonlar, kanser hücrelerinin kümelenmesini sağlar. Bu etkileşimleri kontrol ederek kanser metastazını da kontrol edilebilir kılan bir sistem tasarlamak, yeni terapi yöntemleri geliştirmek için büyük önem arz etmektedir.

Elde edilen mikroskobik ve makroskobik görüntüler (Şekil 5.16), kanser hücresi kümelenmesini ve tek tabakalı kültürünü kontrol edilebilir bir sistem tasarlanabileceğinin mümkün olduğunu göstermektedir. Bu amaçla, HT-29 kanser hücrelerinin kümelenme veya tek tabaka oluşturarak invazif bir şekilde matris üzerine yayılmaya yönelik davranışlarını kontrol edilebilir sağlayan optimal hibrit jel formülasyonunu belirlemek için kalsein-AM boyaması yapılmıştır. Her dört hibrit jel

kombinasyonunda da (%1 HTA-%5 GTA, %1 HTA-%10 GTA, %3 HTA-%5 GTA, %3 HTA-%10 GTA), en az hücre yapışmasının gözlemlendiği jel, HTA miktarının fazla olduğu 2:1 oranına sahip jeller olduğu görülmektedir. HTA oranının arttırılması, beklenildiği gibi kanser hücre yapışmasının azalmasına ve aynı zamanda 3B-sferoid benzeri büyük kümelenmelere neden olmuştur (Carvalho vd. 2016). Bileşen oranı 1:1 olarak değiştirildiğinde hücre tutunmasının arttığı, kümelenmelerin azaldığı ve jel yüzeyinde tek katmanlı hücre tutunmasının da mevcut olduğu gözlemlenmiştir. GTA oranının hacimce yüksek olduğu 1:2 jellerinde ise en fazla hücre yapışması gözlemlenmiş ve sferoid benzeri kümelenmelerin aksine, kanser hücrelerinin metastaz sırasında invazif bir şekilde yayılma davranışını temsil eden tek tabakalı hücre kültürünün baskın olduğu gözlemlenmiştir (Bahlmann vd. 2020). HTA ve GTA konsantrasyonlarının hücre yapışma üzerindeki etkisi incelendiğinde, HTA konsantrasyonunun düşük olduğu %1 HTA-%5 GTA ve %1 HTA-%10 GTA hidrojellerinde, hücre kümelenmeleri ve tek tabakalı tutunma gözlemlenmiştir. HTA konsantrasyonunun %3'e çıkartıldığı hibrit jellerde ise her üç oranda da (2:1, 1:1, 1:2), beklenildiği gibi büyük hücre kümelerinin baskın olduğu ve bu jellerde hücre yapışmasının ayarlanabilir olmadığı gözlemlenmiştir (Zhu ve Yang 2017). HTA konsantrasyonlarının düşük olduğu %1 HTA-%5 GTA ve %1 HTA-%10 GTA hidrojelleri ise kanser hücre yapışmasının ayarlanabilirliğini mümkün kılmaktadır. Jelatin zincirleri, hücre yapışmasını indükleyen arginin-glisin-aspartik (RGD) dizileri içermektedir ve literatürde, jelatin bazlı hidrojellerin hücre yapışmasını desteklediğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır (Su ve Wang 2015, Jiang vd. 2019). %1 HTA konsantrasyonu ile hazırlanan hidrojellerde 2:1 oranından 1:2 oranına doğru düzenlenen sistemlerde, 3B hücre kümelenmesinden tek tabakalı hücre yapışması ve invazif yayılma karakterine daha net geçiş göz önünde bulundurulduğunda, optimal hibrit sistem olarak %1 HTA- %10 GTA hidrojelini uygun görülmüştür.

%1 HTA-%10 GTA hibrit hidrojellerinin 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarındaki hücre yapışmasının kontrol edilebilirliğini daha iyi karakterize etmek için yapılan β -aktin ve YAP boyaması sonucunda, 2:1 oranında kültür edilen kanser hücrelerinde YAP'ın çekirdekte lokalize olduğu ve 1:2 oranına doğru hücre sitoplazmasında floresan verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 5.20). Hem β -aktin hem de YAP ekspresyonlarının beklendiği

gibi 2:1'den 1:2'ye doğru artması, 2:1' de düşük hücre-matris etkileşimini ve buna bağlı olarak hücre kümelenmesini doğrulamaktadır. 1:2 oranında ise yüksek hücre-matris etkileşimlerinin baskın olması ve tek tabakalı hücre tutunması gözlemlenmesi, %1 HTA-%10 GTA hidrojellerinde hücre yapışmasının ve morfogenezinin kontrol edilebilirliğini göstermektedir (Park vd. 2019).

Kanser hücrelerinin biyomalzemeler üzerindeki davranışları, aynı zamanda metastatik karakterleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Bu amaçla, kanser hücre yapışmasını kontrol edilebilir sağlayan hibrit jel parametresi seçildikten sonra, %1 HTA-%10 GTA'nın 2:1, 1:1 ve 1:2 oranlarında hücrelerin mekanotransdüksiyona bağlı EMT ve metastaz davranışlarını incelemek için RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. FAK ve YAP ekspresyonlarının 2:1 (HTA-yüksek) oranından 1:2 (GTA-yüksek) oranına doğru artması, GTA'nın hacimce fazla olduğu yumuşak matrislerde daha yüksek hücre-matris etkileşimlerinin baskın olduğunu ve hücre yapışmasının yüksek olduğunu, IF verilerinde de gözlemlendiği üzere desteklemektedir (Şekil 5.20). Metastaz, hücrelerin invazif karakter kazanarak uzak doku veya organlara göç etmesi olarak tanımlanır (Fares vd. 2020). Literatürde yumurtalık kanseri hücrelerinin sert ve yumuşak matrislerde kültür edilmesi ile metastazik davranışının incelendiği bir çalışmada, yumuşak matrislerde hücre mekanotransdüksiyonunun artması ile kanser hücrelerinin metastazik genotipinin orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir (McGrail vd. 2014). Dolayısıyla bu tez çalışmasında, hücre-matris etkileşiminin yüksek olduğu ve hücrelerin invazif bir şekilde yumuşak matris üzerine yayıldığı 1:2 oranında, beklenildiği üzere MMP2 ve MMP9 ekspresyonlarında 1:1 ve 2:1'e göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Kanser sürecinde, hücrelerin epitel fenotipten mezenkimal fenotipe geçmesi ikincil bir doku veya organa metastazın başladığının göstergesidir (Nieto 2017). Fakat elde edilen PCR verilerinde, epitel fenotipi temsil eden E-kaderin ekspresyonunun beklenilmedik bir şekilde 2:1'den 1:2'ye doğru arttığı ve mezenkimal fenotipe ait N-kaderin ekspresyonunun üç oran içinde düşük ifade edildiği grafilere görülmektedir. Literatürde, kanser hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun yüksek olması ile E-kaderin'in tümör baskılayıcı etkisini belirten bir çalışmada aynı zamanda E-kaderinin çevresel faktörler ve hücre yapışması ile aktive olarak metastazik genotipi arttırdığı gözlemlenmiştir (Na vd. 2020). Bu tez çalışmasında EMT süreci için elde edilen

veriler, metastazik genotipi arttıran yumuşak matrislerde yüksek hücre-matris etkileşiminden dolayı hücrelerin epitel fenotipini korudukları ve sert matrislerde (2:1) ise düşük hücre-matris etkileşimlerinden dolayı hücrelerin matrise yayılma yeteneklerini kaybederek 3-boyutlu sferoid benzeri yapılar oluşturmalarından kaynaklı epitel fenotiplerini kaybettikleri sonucuna varılmıştır.

Hücrelerin metastatik sürece girerek kanser hücre genotipini kazanması ile hücre yenilenmesi için gerekli olan apoptozun baskılandığı, vücudun hasarlı hücreleri temizlemesinde önemli olan otofajik hücre ölümünün azaldığı ve tümör hücrelerinin ölüm yolağı olan nekrozun arttığı bilinmektedir (Su vd. 2015). HT-29 hücrelerinin üç farklı (2:1, 1:1 ve 1:2) %1 HTA-%10 GTA oranında belirlenen metastatik davranışlarının ardından metastaz ile ilişkili hücre ölüm mekanizmaları apoptoz, nekroz ve otofaji genleri ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, beklenildiği üzere 2:1 oranında HT-29 hücrelerinin 1:1 ve 1:2' ye kıyasla yüksek otofaji ve apoptoz ekspresyonlarının olduğunu ve dolayısıyla 2:1 oranında kanser hücrelerinin metastazik genotipinin diğer oranlara kıyasla daha düşük olduğunu desteklemektedir. Fakat beklenilmedik bir şekilde tümör hücrelerinin ölüm yolağına ait nekroz ekspresyonu 2:1 oranında, 1:1 ve 1:2 oranına kıyasla yüksek ifade edilmiştir. Literatüde yer alan bir çalışmada nekrozun sadece tümör ile ilişkili olmadığı, büyük hücre kümelenmeleri ve sferoidlerde glukoz ve oksijen eksikliğine bağlı olarak nekrotik ölümün aktive olduğuna dair bulgular bulunmaktadır (Barisam vd. 2018). Bu sebeple, 2:1 oranında nekroz ekspresyonunun yüksek ifade edilmesinin metastaz ile ilişkili olmadığı ve sert matris üzerinde hücrelerin 3-boyutlu sferoid benzeri yapılar oluşturmalarından kaynaklı sferoid gövdesinde nekrotik ölümün baskın olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer bir yandan 1:1 ve 1:2'de kanser hücrelerinin 2:1'e kıyasla çok düşük otofajik gen ekspresyonlarına sahip olmaları sert matristen (2:1) yumuşak matrise (1:1) doğru gidildikçe metastazik genotipin baskın olduğunu kanıtlamaktadır. 2:1 oranında gözlemlenen sferoid yapıdan kaynaklı yüksek nekroz ekspresyonunun aksine, kanser hücrelerinin hem sferoid hemde tek tabakalı yayılma eğiliminde olduğu 1:1 oranında nekroz ekspresyonunun tamamen tek-tabakalı hücre yayılmasının baskın olduğu 1:2 oranına göre anlamlı bir şekilde düşük ifade edildiği gözlemlenmiştir. Literatürde 3B kanser hücre kültürlerinde, matris sertliğiyle beraber metastazik genotipin ve nekrozun arttığına dair çeşitli çalışmalar yer alırken

diğer bir yandan yumuşak matrislerde metastazın daha çok arttığına dair çalışmalar da yer almaktadır (McGrail vd. 2014, Dong vd. 2019, Micalet vd. 2021). Bu tez çalışmasında 2B kanser hücresi kültürü yapılmış ve sonuç olarak GTA hacminin arttırıldığı yumuşak matrislerde (1:2), metastazik genotipin ve dolayısıyla kanser-ilişkili nekrozun baskın olduğu kanıtlanmıştır.

Hücrelölüm yollarını aydınlatmak için yapılan gen ekspresyon analizlerinin ardından, apoptotik ve nekrotik hücreleri görselleştirmek amacıyla apoptoz-nekroz testi yapılmıştır. Apoptotik hücrelerin (yeşil floresan) sadece koloni sınırlarında yer alması, PCR sonuçlarında da gözlemlendiği üzere kanser hücrelerinin apoptoza karşı dirençli olduğunu doğrulamaktadır. Sert matrislerde (2:1), hücrelerin sferoid benzeri büyük bir küme oluşturduğu şekil 5.23’de yer alan görüntülerde açıkça görülmektedir. Bu sonuç elde edilen PCR verilerini doğrulamakta ve 2:1’de görülen nekrotik hücrelerin (kırmızı floresan) glukoz ve oksijen eksikliğine bağlı olarak nekroza yöneldiklerini göstermektedir.

HTA, GTA ve HTA-GTA hidrojellerinin değişen oranları (2:1, 1:1, 1:2 v/v) üzerinde farklı adezyon fenotipi ve metastaz genotipi sergileyen HT29 hücrelerinin, hücre adezyonu ve metastaza yanıt olarak değişen metabolitlerini belirlemek için metabolomik analizler yapıldı. HTA üzerinde kültürlen HT29 hücrelerinde sfingosin metabolitinin yüksek oranda yukarı regüle edildiği gözlemlenmesine ek olarak, HTA ve GTA arasında en büyük farkı yaratan yolağın sfingolipid metabolizması olduğu belirlenmiştir. Sfingosin-sfingolipid metabolizma yolunun hücre adezyonu üzerindeki etkisi daha önce bildirilmiştir (Ko vd. 2016). Sfingolipidler, zar dinamiklerini düzenleyen ve hücrelerin kümelenmesini sağlayan plazma zarının temel bileşenleridir (Eich vd. 2016). Hücrelerdeki sfingolipidin aşırı düzeyde artması, sfingomiyelinaz aktivitesini arttırır ve sfingomiyelini seramide dönüştürür (Hussain vd. 2012). Sfingolipid metabolizmasının bu mekanizması, ligand-reseptör etkileşiminin etkinliğini azaltarak hücre adezyonunun yapı taşları olan integrinlerin bozulmasına neden olur (Boulter vd. 2018). Böylece, sfingolipidin yüksek seviyede yukarı regüle olduğu HTA üzerinde kültür edilen HT29 hücrelerinde, integrin bozulmasından kaynaklı yetersiz hücre-matris etkileşimleri dolayısıyla sferoid benzeri hücre morfolojileri gözlemlendiği

doğrulanmıştır. Son olarak, HTA-GTA hidrojellerinin üç oranında kültürlen HT29 hücrelerinde farklılaşmış metabolitlerin işlevlerini, gliserofosfolipid metabolizma yolağını etkileyerek gerçekleştirdikleri gözlemlendi. Gliserol bazlı yağ asitleri kanser hücrelerinin temel enerji kaynağı olmakla birlikte; diasilgliseritler ve triasilgliseritler gibi daha karmaşık lipit türlerini sentezlemek için farklı metabolik yollarda yer alır (Wright vd. 2017). Ortaya çıkan bu dönüşümler; hücre döngüsünü, çoğalmasını ve hücrelerin hayatta kalmasını düzenler (Sanchez-Alvarez vd. 2015). Bu sebeple, HTA-GTA hibrit jellerinin 1:2 oranında kültürlen HT29 hücrelerinde, gliserofosfolipid metabolizmasının onkojenik sinyal yollarını aktive ettiği ve hücrelerin metastazik genotipini indüklediği doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, tasarlanan polisakkarit ve protein bazlı HTA-GTA hibrit hidrojelleri, kanser hücresi yapışma fenotipini ve metastazik genotipi kontrol edilebilir kılan bir platform sunmaktadır. Artan HTA oranı, hücre-matris etkileşimlerini azaltarak hücreleri sferoid benzeri yapılar oluşturmaya yönlendirirken; GTA oranının artırılması ile tek katmanlı kanser hücresi yapışmasının baskın olması, hücre yapışmanın kontrol edilebilir olduğunu doğrulamıştır. Yapılan gen ekspresyonu analizi, HT29 hücrelerinin metastatik genotipinin 2:1 oranından 1:2 oranına doğru arttığını göstermektedir. Metastatik genotipin, EMT'den bağımsız olduğu ve metastatik genotipin, hibrit jel komponentlerinin adezif özellikleri ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Apoptoz ve otofajinin 1:1 ve 1:2 oranlarında baskılanması metastatik genotipi doğrularken, nekrozun 2:1 oranında artması sferoid benzeri yapılardaki glukoz ve oksijen eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Metabolomik analizler sonucunda HTA-GTA hidrojellerinin üç oranında kültürlen HT29 hücrelerinin farklılaşmış metabolitlerinin; hücre döngüsünü, çoğalmasını ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasını düzenleyen gliserofosfolipid metabolizma yolağını etkilediği gözlemlenmiş ve oranlar arasındaki genotip değişimi aydınlatılmıştır. HTA-GTA hidrojellerinin kanser hücresi yapışmasını ayarlayarak metastazı kontrol etmeyi mümkün kılan ideal matrisler olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar, tasarlanan hibrit hidrojel biyomateryal bazlı kanser araştırmaları ve ilaç denemeleri için yüksek bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Aguirre-Ghiso, J. 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*, 7; 834-846.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, S. T., Sung, B. and Aggarwal, B. B. 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25; 2097–2116.
- Anguiano, M., Castilla, C., Maška, M., Ederra, C., Peláez, R., Morales, X., Muñoz-Arrieta, G., Mujika, M., Kozubek, M., Muñoz-Barrutia, A., Rouzaut, A., Arana, S., Garcia-Aznar, J. M., Ortiz-de-Solorzano, C. 2017. Characterization of three-dimensional cancer cell migration in mixed collagen-Matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis. *PLoS One*, 12(2).
- Anil Kumar, S., Allen, S. C., Tasnim, N., Akter, T., Park, S., Kumar, A., Chattopadhyay, M., Ito, Y., Suggs, L. J., Joddar, B. 2019. The applicability of furfuryl-gelatin as a novel bioink for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 107(2); 314-323.
- Annabi, N., Nichol, J. W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khademhosseini, A. and Dehghani, F. 2010. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 16(4); 371–383.
- Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O. And Lewis, N. E. 2021. Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 22; 71–88.
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, D., Javaheri, T., Zare, P. 2020. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun. Signal.*, 18(59).
- Bahlmann, L. C., Smith, L. J., Shoichet, M. S. 2020. Designer Biomaterials to Model Cancer Cell Invasion In Vitro: Predictive Tools or Just Pretty Pictures? *Advanced Functional Biomaterials*, 30(16).
- Bahlmann, L. C., Smith, L. J., Shoichet, M. S. 2020. Designer Biomaterials to Model Cancer Cell Invasion In Vitro: Predictive Tools or Just Pretty Pictures? *Advanced Functional Materials*, 13(16).
- Barisam, M., Saidi, M. S., Kashaninejad, N., Nguyen, N. T. 2018. Prediction of Necrotic Core and Hypoxic Zone of Multicellular Spheroids in a Microbioreactor with a U-Shaped Barrier. *Micromachines*, 9(3).
- Beck, J. N., Singh, A., Rothenberg, A. R., Elisseeff, J. H., Ewald, A. J. 2013. The independent roles of mechanical, structural and adhesion characteristics of 3D hydrogels on the regulation of cancer invasion and dissemination. *Biomaterials*, 34; 9486-9495.
- Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H. and Lee, S. H. 2020. Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 26(2); 164-180.
- Beri, P., Matte, B. F., Fattet, L., Kim, D., Yang, J. and Engler, A. J. 2018. Biomaterials to model and measure epithelial cancers. *Nat. Rev. Mater.*, 3; 418–430.

- Blanco-Fernandez, B., Gaspar, V. M., Engel, E., Mano, J. F. 2021. Proteinaceous Hydrogels for Bioengineering Advanced 3D Tumor Models. *Adv. Sci. (Weinh)*, 8(4).
- Boulter, E., Estrach, S., Tissot, F. S., Hennrich, M. L., Tosello, L., Cailleteau, L., de la Ballina, L. R., Pisano, S., Gavin, A.-C., Feral, C. C. 2018. Cell metabolism regulates integrin mechanosensing via an SLC3A2-dependent sphingolipid biosynthesis pathway. *Nature Communications*, 9(4862).
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A. and Weinberg, R. A. 2018. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 18; 128–134.
- Brauchle, E., Thude, S., Brucker, S. and Schenke-Layland, K. 2014. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Sci. Rep.*, 4(4698).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, A. A. and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6); 394-424.
- Burgos-Panadero, R., Lucantoni, F., Gamero-Sandemetrio, E., de la Cruz-Merino, L., Álvaro, T., Noguera, R. 2019. The tumour microenvironment as an integrated framework to understand cancer biology. *Cancer Letters*, 461; 112-122.
- Caballero, D., Abreu, C. M., Lima, A. C., Neves, N. N., Reis, R. L., Kundu, S. C. 2022. Precision biomaterials in cancer theranostics and modelling. *Biomaterials*, 280.
- Cao, J., Li, J., Chen, Y., Zhang, L. and Zhou, J. 2018. Dual Physical Crosslinking Strategy to Construct Moldable Hydrogels with Ultrahigh Strength and Toughness. *Advanced Functional Materials*, 28(23).
- Carrancá, M., Griveau, L., Remoué, N., Lorion, C., Weiss, P., Orea, V., Sigaudou-Roussel, D., Faye, C., Ferri-Angulo, D., Debret, R. and Sohier, J. 2021. Versatile lysine dendrigrafts and polyethylene glycol hydrogels with inherent biological properties: in vitro cell behavior modulation and in vivo biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 109(6); 926-937.
- Carvalho, M. P., Costa, E. C., Miguel, S. P., Correia, I. J. 2016. Tumor spheroid assembly on hyaluronic acid-based structures: A review. *Carbohydr. Polym.*, 150; 139-148.
- Cavallaro, U. and Christofori, G. 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim. Biophys. Acta*, 1552(1); 39-45.
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P. and Noisa, P. 2019. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World journal of stem cells*, 11(12); 1065–1083.
- Ciriello, G., Miller, M., Aksoy, B., Senbabaoglu, Y., Schultz, N. and Sander, C. 2013. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat. Genet.*, 45; 1127–1133.
- Collins, K., Jacks, T. and Pavletich, N. P. 1997. The cell cycle and cancer. *PNAS*, 94(7); 2776-2778.

- Comoglio, P. M., Trusolino, L. and Boccaccio, C. 2018. Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 18; 341–358.
- Cox, T. R. 2021. The matrix in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 21; 217–238.
- DePalma, T. J., Sivakumar, H., Skardal, A. 2022. Strategies for developing complex multi-component in vitro tumor models: Highlights in glioblastoma. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 180.
- Derkus, B., Okesola, B. O., Varrett, D. W., D'Este, M., Chowdhury, T. T., Eglin, D., Mata, A. 2020. Multicomponent hydrogels for the formation of vascularized bone-like constructs in vitro. *Acta Biomaterialia*, 109; 82-94.
- Di Martino, J. S., Akhter, T., Bravo-Cordero, J. J. 2021. Remodeling the ECM: Implications for Metastasis and Tumor Dormancy. *Cancers (Basel)*, 13(19);4916.
- Dicker, K. T., Gurski, L. A., Pradhan-Bhatt, S., Witt, R. L., Farach-Carson, M. C. and Jia, X. 2014. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*, 10(4); 1558–1570.
- Dikovsky, D., Bianco-Peled, H., Seliktar, D. 2006. The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3-D cellular morphology and cellular migration, *Biomaterials*, 27(8); 1496-1506.
- Dini, S., Binder, B. J., Fischer, S. C., Mattheyer, C., Schmitz, A., Stelzer, E. H., Bean, N. G., Green, J. E. 2016. Identifying the necrotic zone boundary in tumour spheroids with pair-correlation functions. *J. R. Soc. Interface*, 13(123).
- Dong, Y., Zheng, Q., Wang, Z. et al. 2019. Higher matrix stiffness as an independent initiator triggers epithelial-mesenchymal transition and facilitates HCC metastasis. *J Hematol Oncol.*, 12(112).
- Dow, J. T. and Davies, S. A. 2003. Integrative physiology and functional genomics of epithelial function in a genetic model organism. *Physiol. Rev.*, 83(3); 687-729.
- Dunn, D.W., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J. D., Halsall, A., Haselden, J. N., Nicholls, A. W., Wilson, I. D., Kell, D. B., Goodacre, R. 2011. “Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry” *Nature Protocols*, 6; 1060-1083.
- Dutta, S. D., Hexiu, J., Patel, D. K., Ganguly, K. and Lim, K. T. 2021. 3D-printed bioactive and biodegradable hydrogel scaffolds of alginate/gelatin/cellulose nanocrystals for tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 167; 644-658.
- Eich, C., Manzo, C., Keijzer, S., bakker, G.-J., Reinieren-Beeren, I., Garía-Parajo, M. F., Cambi, A. 2016. Changes in membrane sphingolipid composition modulate dynamics and adhesion of integrin nanoclusters. *Scientific Reports*, 6(20693).
- Esmaeili, J., Barati, A., Ai, J., Nooshabadicd, V. T., Mirzar, Z. 2022. Employing hydrogels in tissue engineering approaches to boost conventional cancer-based research and therapies. *RSC Advances*, 11.
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. and Fares, Y. 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(28).

- Fernando, K., Kwang, L. G., Lim J. T. C., Fong, E. L. S. 2021. Hydrogels to engineer tumor microenvironments in vitro. *Biomater. Sci.*, 2021, 9; 2362-2383.
- Frayssinet, A., Petta, D., Illoul, C., Haye, B., Markitantova, A., Eglin, D., Mosser, G., D'Este, M. and H  lary, C. 2020. Extracellular matrix-mimetic composite hydrogels of cross-linked hyaluronan and fibrillar collagen with tunable properties and ultrastructure. *Carbohydr. Polym.*, 236(116042).
- Friedl, P. and Wolf, K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer*, 3; 362–374.
- Gkretsi, V. and Stylianopoulos, T. 2018. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Frontiers in oncology*, 8(145).
- Gloushankova, N. A., Rubtsova, S. N. and Zhitnyak, I. Y. 2017. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. *Tissue Barriers*, 5(3).
- Gomez-Florit, M., Pardo, A., Domingues, R. M. A., Gra  a, A. L., Babo, P. S., Reis, R. L. and Gomes, M. E. 2020. Natural-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Molecules*, 25(24); 5858.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5); 646-674.
- Hassanpour, S. G. and Dehghani, M. 2017. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4); 127-129.
- Hussain, M. M., Jin, W. Jiang, X. C. 2012. Mechanisms involved in cellular ceramide homeostasis. *Nutrition & Metabolism*, 9(71).
- Ign  y, F. and Krammer, P. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 2; 277–288.
- Iskratsch, T., Wolfenson, H., Sheetz, M. 2014. Appreciating force and shape — the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15; 825–833.
- Ji, C., Khademhosseini, A., Dehghani, F. 2011. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 32(36); 9719-9729.
- Jia, Y., Wei, Z., Zhang, S., Yang, B., Li, Y. 2022. Instructive Hydrogels for Primary Tumor Cell Culture: Current Status and Outlook. *Advanced Healthcare Materials*.
- Jiang, T., Munguia-Lopez, J. G., Gu, K., Bavoux, M. M., Flores-Torres, S., Kort-Mascort, J., Grant, J., Vijayakumar, S., De Leon-Rodriguez, A., Ehrlicher, A. J., Kinsella, J. M. 2019. Engineering bioprintable alginate/gelatin composite hydrogels with tunable mechanical and cell adhesive properties to modulate tumor spheroid growth kinetics. *Biofabrication*, 12(1).
- Jisoo, K., Jinah, J., Dong-Woo, C. 2021. Controlling Cancer Cell Behavior by Improving the Stiffness of Gastric Tissue-Decellularized ECM Bioink With Cellulose Nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.
- Jonker, A. M., L  wik, D. W. P. M., van Hest, J. C. M. 2011. Peptide- and Protein-Based Hydrogels. *Chem. Mater.* 24(5); 759–773.
- Kai, F., Drain, A. P., Weaver, V. M. 2019. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. *Developmental Cell*, 49(3); 332-346.

- Kalluri, R. and Weinberg, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6); 1420–1428.
- Kaszak, I., Witkowska-Piłaszewicz, O., Niewiadomska, Z., Dworecka-Kaszak, B., Ngosa-Toka, F. and Jurka, P. 2020. Role of Cadherins in Cancer-A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(20); 7624.
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., Searson, P. C. 2016. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 4(12).
- Kim, J., Jang, J. and Cho, D. W. 2021. Controlling Cancer Cell Behavior by Improving the Stiffness of Gastric Tissue-Decellularized ECM Bioink With Cellulose Nanoparticles. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9(605819).
- Klein, C. 2009. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat. Rev. Cancer*. 9; 302–312.
- Klein, C. A. 2020. Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. *Nature Reviews Cancer*, 20; 681–694.
- Ko, P., Kim, D., You, E., Jung, J., Oh, J., Kim, J., Lee, K.-H., Rhee, S. 2016. Extracellular Matrix Rigidity-dependent Sphingosine-1-phosphate Secretion Regulates Metastatic Cancer Cell Invasion and Adhesion. *Scientific Reports*, 6(21564).
- Le Bras, G. F., Taubenslag, K. J. and Andl, C. D. 2012. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell adhesion & Migration*, 6(4); 365–373.
- Lee, D. S., Kang, J. I., Hwang, B. H. and Park, K. M. 2019. Interpenetrating Polymer Network Hydrogels of Gelatin and Poly(ethylene glycol) as an Engineered 3D Tumor Microenvironment. *Macromol. Res.*, 27; 205-211.
- Lee, D., Heo, D. N., Nah, H. R., Lee, S. J., Ko, W. K., Lee, J. S., Moon, H. J., Bang, J. B., Hwang, Y. S., Reis, R. L., Kwon, I. K. 2018. Injectable hydrogel composite containing modified gold nanoparticles: implication in bone tissue regeneration. *International journal of nanomedicine*, 13; 7019–7031.
- Lee, J. H. and Kim, H. W. 2018. Emerging properties of hydrogels in tissue engineering. *Journal of tissue engineering*, 9.
- Li, X. and Wang, J. 2020. Mechanical tumor microenvironment and transduction: cytoskeleton mediates cancer cell invasion and metastasis. *International journal of biological sciences*, 16(12); 2014–2028.
- Li, Z., Qu, T., Ding, C., Ma, C., Sun, H., Li, S. and Liu, X. 2015. Injectable gelatin derivative hydrogels with sustained vascular endothelial growth factor release for induced angiogenesis. *Acta Biomater.*, 13; 88-100.
- Lu, L., Yuan, S., Wang, J., Shen, Y., Deng, S., Xie, L. and Yang, Q. 2018. The Formation Mechanism of Hydrogels. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 13(7); 490-496.
- Maciejowski, J. and de Lange, T. 2017. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 18; 175–186.

- Madduma-Bandarage, U. S. K. and Madihally, S. V. 2021. Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(19); 50376.
- Mahinroosta, M., Farsangi, Z. J., Allahverdi, A. and Shakoory, Z. 2018. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications, *Materials Today Chemistry*, 8; 42-55.
- Markman, M. 2021. <https://www.cancercenter.com/cancer-cells-vs-normal-cells>. 10.06.2021.
- Marte, B. 2004. Cell division and cancer. *Nature*, 432; 293.
- Massagué, J. and Obenauf, A. 2016. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 529; 298-306.
- Matthews, H. K., Bertoli, C. and de Bruin, R. A. M. 2022. Cell cycle control in cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 23; 74–88.
- McGrail, D. J., Kieu, Q. M., Dawson, M. R. 2014. The malignancy of metastatic ovarian cancer cells is increased on soft matrices through a mechanosensitive Rho-ROCK pathway. *Journal of cell science*, 127; 2621–2626.
- Micalet, A., Moeendarbary, E., Cheema, U. 2021. 3D In Vitro Models for Investigating the Role of Stiffness in Cancer Invasion. *ACS Biomater. Sci. Eng.*
- Miles, F. L., Pruitt, F. L., van Golen, K. L. and Cooper, C. R. 2007. Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*. 25(4); 305-24.
- Na, T. Y., Schecterson, L., Mendonsa, A. M., Gumbiner, B. M. 2020. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *PNAS*, 117(11); 5931-5937.
- Nasiri, B., Mashayekhan, S. 2017. Fabrication of porous scaffolds with decellularized cartilage matrix for tissue engineering application. *Biologicals*. 2017 Jul;48:39-46.
- Nezhad-Mokhtari, P., Ghorbani, M., Roshangar, L. and Rad, J. S. 2019. A review on the construction of hydrogel scaffolds by various chemically techniques for tissue engineering, *European Polymer Journal*, 117; 64-76.
- Nieto, M. A. 2017. Context-specific roles of EMT programmes in cancer cell dissemination. *Nat. Cell. Biol.*, 19; 416–418.
- Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S. and Weinberg, R. A. 2008. Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways. *Cancer Research*, 68(10).
- Ozudogru, E., Isik, M., Eylem, C. C., Nemutlu, E., Arslan, Y. E., Derkus, B. 2021. Decellularized Spinal Cord Meninges Extracellular Matrix Hydrogel That Supports Neurogenic Differentiation and Vascular Structure Formation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 15(11).
- Ozudogru, E., Isik, M., Eylem, C. C., Nemutlu, E., Arslan, Y. E., Derkus, B. 2021. Decellularized spinal cord meninges extracellular matrix hydrogel that supports neurogenic differentiation and vascular structure formation. *J. Tissue Eng. Regen. Medicine*.

- Pal, M., Chen, H., Lee, B. H., Lee, J. Y. H., Yip, Y. S., Tan, N. S. and Tan, L. P. 2019. Epithelial-mesenchymal transition of cancer cells using bioengineered hybrid scaffold composed of hydrogel/3D-fibrous framework. *Sci. Rep.*, 9(1); 8997.
- Park, J., Kim, D. H., Shah, S. R., Kim, H., Kshitiz, Kim, P., Quinones-Hinojosa, A., Levchenko, A. 2019. Switch-like enhancement of epithelial-mesenchymal transition by YAP through feedback regulation of WT1 and Rho-family GTPases. *Nat. Commun.*, 10(2797).
- Patarroyo, J. L., Florez-Rojas, J. S., Pradilla, D., Valderrama-Rincón, J. D., Cruz, J. C., Reyes, L. H. 2020. Formulation and characterization of gelatin-based hydrogels for the encapsulation of *kluveromyces lactis*-applications in packed-bed reactors and probiotics delivery in humans. *Polymers (Basel)*, 12(6):1287.
- Peng, C., Wallwiener, M., Rudolph, A., Čuk, K., Eilber, U., Celik, M., Modugno, C., Trumpp, A., Heil, J., Marmé, F., Madhavan, D., Nees, J., Riethdorf, S., Schott, S., Sohn, C., Pantel, K., Schneeweiss, A., Chang-Claude, J., Yang, R. and Burwinkel, B. 2016. Plasma hyaluronic acid level as a prognostic and monitoring marker of metastatic breast cancer. *Int. J. Cancer*, 138(10); 2499-509.
- Pradhan, S. and Slater, J. H. 2019. Tunable hydrogels for controlling phenotypic cancer cell states to model breast cancer dormancy and reactivation. *Biomaterials*, 215; 119177.
- Puckert, C., Tomaskovic-Crook, E., Gambhir, S., Wallace, G. G., Crook, J. M., Higgins, M. J. 2020. Molecular interactions and forces of adhesion between single human neural stem cells and gelatin methacrylate hydrogels of varying stiffness. *Acta Biomaterialia*, 106; 156-169.
- Rebers, L., Reichsöllner, R., Regett, S., Tovar, G. E. M., Borchers, K., Baudis, S. and Southan, A. 2021. Differentiation of physical and chemical cross-linking in gelatin methacryloyl hydrogels. *Sci. Rep.*, 11(3256).
- Reymond, N., d'Água, B. and Ridley, A. 2013. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 13; 858–870.
- Ribatti, D., Tamma, R. and Annese, T. 2020. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational Oncology*, 13.
- Riggio, A. I., Varley, K. E. and Welm, A. L. 2021. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 124; 13–26.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A. and Gurtner, G. C. 2019. Wound Healing: A cellular perspective. *Physiological Reviews*, 99; 665–706.
- Romani, P., Valcarcel-Jimenez, L., Frezza, C., Dupont, S. 2021. Crosstalk between mechanotransduction and metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 22; 22–38.
- Sakai, S., Hirose, K., Taguchi, K., Ogushi, Y., Kawakami, K. 2009. An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 30(20); 3371-3377.
- Salerno, A., Borzacchiello, R. and Netti, P. A. 2011. Pore structure and swelling behavior of porous hydrogels prepared via a thermal reverse-casting technique. *Journal of Applied Polymer Science*, 122(6); 3651-3660.

- Sánchez-Aguinagalde, O., Lejardi, A., Meaurio, E., Hernández, R., Mijangos, C. and Sarasua, J. R. 2021. Novel Hydrogels of Chitosan and Poly(vinyl alcohol) Reinforced with Inorganic Particles of Bioactive Glass. *Polymers (Basel)*, 13(5); 691.
- Sanchez-Alvarez, M., Zhang, Q., Finger, F., Wakelam, M. J., Bakal, C. 2015. Cell cycle progression is an essential regulatory component of phospholipid metabolism and membrane homeostasis. *Open Biol.* 5(9);150093.
- Selig, M., Lauer, J. C., Hart, M. L., Rolauffs, B. 2020. Mechanotransduction and Stiffness-Sensing: Mechanisms and Opportunities to Control Multiple Molecular Aspects of Cell Phenotype as a Design Cornerstone of Cell-Instructive Biomaterials for Articular Cartilage Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15); 5399.
- Selyanin, M., Boykov, P., Khabarov, V., Polyak, F. 2015. Molecular and Supramolecular Structure of Hyaluronic Acid. *Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine*, 97-119.
- Sharifi, S., Islam, M. M., Sharifi, H., Islam, R., Koza, D., Reyes-Ortega, F., Alba-Molina, D., Nilsson, P. H., Dohlman, C. H., Mollnes, T. E., Chodosh, J. and Gonzalez-Andrades, M. 2021. Tuning gelatin-based hydrogel towards bioadhesive ocular tissue engineering applications. *Bioact. Mater.*, 6(11); 3947-3961.
- Shukla, A., Singh, A. P. and Maiti, P. 2021. Injectable hydrogels of newly designed brush biopolymers as sustained drug-delivery vehicle for melanoma treatment. *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 6(63).
- Silvestre, A. J. D., Freire, C. S. R. and Vilela, C. 2021. Special Issue: Advanced Biopolymer-Based Nanocomposites and Hybrid Materials. *Materials*, 14.
- Su, K. and Wang, C. 2015. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnol. Lett.*, 37; 2139–2145.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol. Cancer*, 14(48).
- Sun, Q., Hou, Y., Chu, Z., Wei, Q. 2022. Soft overcomes the hard: Flexible materials adapt to cell adhesion to promote cell mechanotransduction. *Bioactive Materials*, 10; 397-404.
- Sun, Y., Deng, R., Ren, X., Zhang, K. and Li, J. 2019. 2D Gelatin Methacrylate Hydrogels with Tunable Stiffness for Investigating Cell Behaviors. *ACS Appl. Bio. Mater.*, 2(1); 570-576.
- Tamayo-Angorrilla, M., López de Andrés, J., Jiménez, G., Marchal, J. A. 2021. The biomimetic extracellular matrix: a therapeutic tool for breast cancer research. *Transl. Res.*
- Tang, Y., Huang, B., Dong, Y., Wang, W., Zheng, X., Zhou, W., Zhang, K. and Du, Z. 2017. Three-dimensional prostate tumor model based on a hyaluronic acid-alginate hydrogel for evaluation of anti-cancer drug efficacy. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 28(14); 1603-1616.

- Teixeira, L. S., Feijen, J., van Blitterswijk, C. A., Dijkstra, P. J. and Karperien, M. 2012. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*, 33(5); 1281-1290.
- Thiery, J. P. and Chopin, D. 1999. Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.*, 18(1); 31-42.
- Tryfonidis, K., Senkus, E., Cardoso, M. J. and Cardoso, F. 2015. Management of locally advanced breast cancer-perspectives and future directions. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 12; 147–162.
- Vildanova, R. R., Sigaeva, N. N., Kukovinets, O. S., Kolesov, S. V. 2021. Preparation and rheological properties of hydrogels based on N-succinyl chitosan and hyaluronic acid dialdehyde. *Polymer Testing*, 96(107120).
- Vlierberghe, S. V., Cnudde, V., Dubruel, P., Masschaele, B., Cosijns, A., Paepe, I. D., Jacobs, P. J., Hoorebeke, L. V., Remon, J. P., Schacht, E. 2007. Porous gelatin hydrogels: 1. Cryogenic formation and structure analysis. *Biomacromolecules*, 8(2); 331-337.
- Wallace, D. I. and Guo, X. 2013. Properties of tumor spheroid growth exhibited by simple mathematical models. *Front. Oncol.*, 3(51).
- Wang, L., Wang, C., Wu, S., Fan, Y. and Li, X. 2020. Influence of the mechanical properties of biomaterials on degradability, cell behaviors and signaling pathways: current progress and challenges. *Biomaterials science*, 8; 2714-2733.
- Wang, Y., Zhang, S. and Wang, J. 2021. Photo-crosslinkable hydrogel and its biological applications. *Chinese Chemical Letters*, 32(5); 1603-1614.
- Wang, Z., Wang, C., Abudukeremu, A., Rui, X., Liu, S., Zhang, X., Zhang, M., Zhang, J., Dong, L. 2018. Engineering a Tumor Microenvironment- Mimetic Niche for Tissue Regeneration with Xenogeneic Cancer Cells. *Advanced Science*, 5.
- Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K.J. and Werb, Z. 2020. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat. Commun.*, 11(5120).
- Wisdom, K.M., Adebawale, K., Chang, J., Lee, J. Y., Nam, S., Desai, R., Rossen, N. S., Rafat, M., West, R. B., Hodgson, L., Chaudhuri, O. 2018. Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments. *Nat. Commun.*, 9(4144).
- Witjas, F. M. R., van den Berg, B. M., van den Berg, C. W., Engelse, M. A., Rabelink, T. J. 2019. Concise Review: The Endothelial Cell Extracellular Matrix Regulates Tissue Homeostasis and Repair. *Stem Cells Transl. Med.*, 8(4); 375-382.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. 2010. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(2); 85–101.
- Wright, H. J., Hou, J., Xu, B., Cortez, M., Potma, E. O., Tromberg, B. J., Razorenova, O. V. 2017. CDCP1 drives triple-negative breast cancer metastasis through reduction of lipid-droplet abundance and stimulation of fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114(32);6556-6565.

- Wu, S. C., Chang, W. H., Dong, G. C., Chen, K. Y., Chen, Y. S. and Yao, C. H. 2011. Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(6).
- X. Zhu and Y. Yang. 2017. Hollow spheroid formation by cells at the mechanical interface of hyaluronic acid hydrogels in three dimensions," 2017 IEEE 17th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO), 218-222.
- Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Savelieva, O. E., Kaigorodova, E. V., Krakhmal, N. V. and Perelmuter, V. M. 2019. Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. *Biochemistry (Mosc)*, 84(7); 762-772.
- Zhang, G., Sheng, H., He, Y. X., Xie, X. H., Wang, Y. X., Lee, K. M., Yeung, K. W., Li, Z. R., He, W., Griffith, J. F., Leung, K. S., Qin, L. 2009. Continuous occurrence of both insufficient neovascularization and elevated vascular permeability in rabbit proximal femur during inadequate repair of steroid-associated osteonecrotic lesions. *Arthritis. Rheum.*, 60(10); 2966-2977.
- Zhu, M., Wang, J. and Li, N. 2018. A novel thermo-sensitive hydrogel-based on poly(N-isopropylacrylamide)/hyaluronic acid of ketoconazole for ophthalmic delivery. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 46(6); 1282-1287.
- Zuidema, J. M., Rivet, C. J., Gilbert, R. J., Morrison, F. A. 2014. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomaterials*, 102(5); 1063-1073.