



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

**ÇİP ÜZERİNDE KARACİĞER KANSERİ PLATFORMUNDA
İLACA BAĞLI KARACİĞER ENDOTEL HASARININ
İNCELENMESİ**

NİGAR GASİMZADE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. HÜSEYİN AVCI

Eskişehir, 2024



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

**ÇİP ÜZERİNDE KARACİĞER KANSERİ PLATFORMUNDA
İLACA BAĞLI KARACİĞER ENDOTEL HASARININ
İNCELENMESİ**

NİGAR GASİMZADE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. HÜSEYİN AVCI

Eskişehir, 2024

**Proje No: BAP TYL-2022-2720; TUBİTAK 1004 20AG003 ve 20AG031, BAP-
ONAP TOA-2022-2307; TÜSEB 2023-A2-01**

ÖZET

Başlık: Çip üzerinde karaciğer kanseri platformunda ilaca bağlı karaciğer endotel hasarının incelenmesi

Amaç: Günümüzde hastalıklı dokuların morfolojik ve fonksiyonel rekonstrüksiyonu için mikroakışkanlardaki son gelişmelerle birlikte, tasarlanmış in vitro sistemlere damar hücreleriyle birlikte vasküler bileşenler dahil edilmiştir. Bu sayede hemodinamiğin ve ilaçların/çözünür faktörlerin mikroakışkan perfüzyon kanalı yoluyla hepatosellüler kanser (HCC) ile birlikte sağlıklı ve hastalıklı 3B karaciğer mikroçevresinin gerçeğe daha yakın modellenmesine olanak tanımaktadır (Lauschke, 2019). Kemoterapötik ilaçlar karaciğer kanseri üzerinde etkili olmasına rağmen kanser hücrelerine karşı seçici değildir ve sağlıklı hücrelere de etki ederek toksisiteye neden olabilmektedir. Çalışmamızda, 3B karaciğer kanser modeli oluşturularak karaciğer kanserinde kullanılan bir kemoterapi ilacının (Siklofosfamid) endotel hücrelerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Endotel hücrelerinin monolayer statik kültürde ve çip üzerinde karaciğer kanser platformu içerisinde 24 ve 96 saat siklofosfamide maruz bıraktıktan sonra ilacın toksik etkisini belirlemek için canlı/ölü boyama ile canlılık analizi, flow sitometri analizi ile hasar belirteci doku faktörünün (CD142) ekspresyonu, ilaç uygulaması sonrasında hücrelerin canlılık ve proliferasyonu (MTT yöntemi ile) ve endotel hücre yüzey belirtecinin (CD31/PECAM1), immunofloresan işaretlemesi yapılarak morfolojik değişiklikleri incelenmiştir.

Bulgular: Siklofosfamid'in hem monolayer statik kültür ve 3B dinamik kültürü yapılan endotel hücrelerinin canlılık oranını düşürdüğü gözlemlendi. İkili kültürü yapılan deney gruplarının ilacın etkisine karşı daha dayanıklı olduğu İF işaretleme ve canlı/ölü boyama analizleri ile görüldü.

Sonuç: Tez çalışmasında özellikle CD31 ve CD142 belirteçlerinin Siklofosfamid'in endotel hücreleri üzerinde olan hasarı belirlemede yardımcı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Bu tez çalışması TUBİTAK 1004 20AG003 ve 20AG031, BAP-ONAP TOA-2022-2307, BAP 2022-2720 ve TÜSEB 2023-A2-01 projeleri ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: 3B karaciğer kanser modeli, mikroakışkan çip, endotel hücre hasarı.



ABSTRACT

Title: Investigation of drug-induced endothelial damage on liver cancer on a chip platform.

Objective: Today, with recent advances in microfluidics for morphological and functional reconstruction of diseased tissues, vascular components along with vascular cells have been incorporated into engineered in vitro systems. In this way, it allows more realistic modeling of the healthy or diseased 3D liver microenvironment, such as hepatocytes, which are the parenchymal cells of the liver, through the microfluidic perfusion channel of hemodynamics and drugs/soluble factor (Lauschke, 2019). Although chemotherapeutic drugs are effective on liver cancer, they are not selective against cancer cells and it can also affect healthy cells and cause toxicity. In our study, we aimed to examine the effect of the selected chemotherapy drug (cyclophosphamide) used in liver cancer on endothelial cells by creating a 3D liver cancer model.

Methods: To determine the toxic effect of the drug after exposing endothelial cells in static culture and in the chip platform for 24 and 96 hours, viability analysis with Live/Dead staining, expression of tissue factor (CD142), which is a damage marker, by flow cytometry analysis, viability and proliferation by MTT method, and morphological changes were examined by immunofluorescent labeling of the surface marker specific to endothelial cells CD31 /PECAM1.

Results: It was observed that cyclophosphamide reduced the viability of both static and dynamic cultured endothelial cells. It was seen by IF labeling and Live/Dead staining analyzes that the co-cultured experimental groups were more resistant to the effect of the drug.

Conclusions: In this thesis, it was concluded that CD31 and CD142 markers can help determine the damage caused by the drug cyclophosphamide on endothelial cells.

This thesis study was supported by TUBİTAK 1004 20AG003 and 20AG031, BAP-ONAP TOA-2022-2307, BAP -2022-2720 and TÜSEB 2023-A2-01 projects.

Keywords: Endothelial cell damage, hepatotoxicity, 3D liver cancer model, microfluidic chip.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....	
ETİK BEYAN.....	
TEŞEKKÜR.....	
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Karaciğerin Vücuttaki Önemi	4
2.2. Hepatosellular Karsinoma (HCC)	5
2.2.1. HCC tedavisinde kullanılan yöntemler	6
2.3. Endotel Hücre Hasarı.....	10
2.3.1. PECAM/CD31	12
2.3.2. Doku faktörü.....	13
2.4. Siklofosfamid	14
2.5. Çip Üzerinde Organ Sistemleri	16
2.5.1. Karaciğer kanseri çipi.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	23
3.3. Deney Protokolü.....	26
3.3.1. Deney gruplarının oluşturulması	26
3.3.2. Hücrelerin temin edilmesi, çözdürülmesi ve kültüre edilmesi	28
3.3.3. MTT analizi ile Siklofosfamid'in IC50 değerinin belirlenmesi	31
3.3.3.1. Siklofosfamidin hazırlanması.....	31
3.3.4. 3B karaciğer çipinin üretimi	32
3.3.5. Çip üstü karaciğerde 3B dinamik kültürün oluşturulması ve karakterizasyonu	34
3.3.5.1. Kaplaması gerçekleşen membrana hücre ekimi	34
3.3.6.1. Flow sitometri yöntemi ile CP'nin hücrelere olan etkisinin değerlendirilmesi	35

3.3.7. Canlı /Ölü boyama yöntemi ile hücre canlılığı analizi.....	36
3.3.8. CP'in etkisinin IF işaretleme yöntemi ile belirlenmesi.....	37
3.4. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Hücre Karakterizasyonları	39
4.1.1. İnsan HCC ve endotel hücrelerinin çözülmesi ve kültürü.....	39
4.2.1. MTT analizi ile hücre canlılığının belirlenmesi	40
4.1.3. Canlı/Ölü boyama ile hücre karakterizasyonu	42
4.1.4. İF işaretleme ile hücre karakterizasyonu	46
4.1.5. CD142 belirtecinin hücrelere CP uygulandıktan sonra flow sitometri ...	50
ile immunofenotipik olarak verimlilik analizi.....	50
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	57
8. EKLER DİZİNİ.....	Error! Bookmark not defined.
EK-1. İntihal Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	Error!
Bookmark not defined.	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan gereç ve cihazların listesi.	23
Tablo 3.2. Kullanılan hücreler.	26
Tablo 3.3. Tekli EA.hy 926 hücre hattından oluşan deney grupları.	26
Tablo 3.4. EA.hy 926 ve HepG2 hücre hücre hatlarının oluşturduğu ikili	27
Tablo 3.5. Hücre kültür besiyerinin içeriği	29
Tablo 3.6. Hücre dondurma besiyerinin içeriği.	30



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Karaciğerin vücuttaki yeri.	5
Şekil 2.2. Pıhtılaşma kaskadının ve fibrinolitik sistem şematik gösterimi	14
Şekil 2.3. Karaciğer kanserinin metabolik aktivitesine ve bir antikanser ilacının metabolitinin sağlıklı damar üzerindeki yan etkilerine göre CP anti-kanser ilacının etkisinin gösterimi.	16
Şekil 3.1. Mikroakışkan çip tasarımı.	32
Şekil 3.2. PDMS'in hazırlanmasının şematik görüntüsü.	33
Şekil 3.3. Hazırlanmış biyomalzemelerin üstten görünümü. a) PDMS, b) PMMA. .	33
Şekil 3.4. Çip platformunun yukarıdan görünümü.	34
Şekil 4.1. İnsan endotel hücre hattının (EA.hy926) kültüre alındıktan sonra faz-kontrast mikroskop görüntüleri	39
Şekil 4.3. Karaciğer HCC hücre hattının (HepG2) kültüre alındıktan sonra faz-kontrast mikroskop görüntüleri	40
Şekil 4.4. İç ve dış yüzeyine hücrelerle kaplaması yapılan PET membranın kültürü sırasında çekilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri	40
Şekil 4.5. Siklofosfamid'in hücrelere 24 saatlik etkisinin incelenmesi.	41
Şekil 4.6. Siklofosfamid'in konsantrasyonlarının HepG2, EA.HY 926 ve ikili kültür hücrelerinde 24 saatlik MTT analizi sonrası canlılık verileri.	42
Şekil 4.7. Canlı /Ölü boyama işaretleme yöntemi ile monolayer statik kültürü yapılan EA.hy 926 hücre kültürüne CP uygulandıktan ve CP uygulanmadıktan sonra çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri.	43
Şekil 4.8. Canlı /Ölü boyama işaretleme yöntemi ile monolayer statik kültürü yapılan İkili hücre kültürüne CP uygulandıktan ve CP uygulanmadıktan sonra çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri.	44
Şekil 4.9. Canlı /Ölü boyama işaretleme yöntemi ile 3B dinamik kültürü yapılan İkili hücre kültürüne CP uygulandıktan ve CP uygulanmadıktan sonra çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri.	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Şekil 4.10.** Canlı /Ölü boyama işaretleme yöntemi ile 3B dinamik kültürü yapılan EA.hy 926 hücre kültürüne CP uygulandıktan ve CP uygulanmadıktan sonra çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri.....46
- Şekil 4.11.** Monolayer statik kültürde EA.hy 926 hücrelerine CP uygulandıktan sonra CD31 ile immunoflorsan işaretleme ile floresan mikroskopta alınmış görüntüleri.....47
- Şekil 4.12.** Monolayer statik ikili kültür hücrelerine CP uygulandıktan sonra CD31 ile immunoflorsan işaretleme ile floresan mikroskopta alınmış görüntüleri.....48
- Şekil 4.13.** 3B dinamik kültürde EA.hy 926 hücrelerinin CP uygulandıktan sonra CD31 ile immunoflorsan işaretleme ile floresan mikroskopta alınmış görüntüleri.....49
- Şekil 4.14.** 3B dinamik ikili kültür hücrelerine CP uygulandıktan sonra CD31 ile immunoflorsan işaretleme floresan mikroskop görüntüleri.....50
- Şekil 4.15.** EA.hy 926 hücrelerinin CD142 belirtecini 1.5mM CP uygulandıktan sonra 24 ve 96 saat sonra flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılan verimlilik analizi. 51
- Şekil 4.16.** HepG2 926 hücrelerinin CD142 belirtecini 3mM CP uygulandıktan sonra 24 ve 96 saat sonra flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılan verimlilik analizi.....51
- Şekil 4.17.** HepG2 ve EA.hy926 hücrelerinden oluşan ikili kültürde CD142 belirtecini 3s mM CP uygulandıktan 24 ve 96 saat sonra flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılan verimlilik analizi. 52

SİMGİ VE KISALTMALAR DİZİNİ

2B	:	İki boyutlu
3B	:	Üç boyutlu
Col I	:	Tip I kolajen
DAPI	:	4,6-Diamidino-2-Fenilindol
Dk	:	Dakika
DMEM	:	Dublecco's modified eagle's medium
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	:	Fetal sığır serumu
FN	:	Fibronektin
H&E	:	Hematoksilen&Eozin
İF	:	İmmunofloresan
ml veya Ml	:	Mililitre
mM	:	Milimola
PBS	:	Fosfat tamponu
PDMS	:	Polidimetilsiloksan
PMMA	:	Polimetilmetakrilat
Sn	:	Saniye
µm	:	Mikrometre
CD142	:	Doku faktörü
CD31/PECAM1:		Endotel hücre yüzey belirteci
LSEC	:	Karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri
EA.hy 926	:	Vasküler endotel hücre hattı
HepG2	:	Karaciğer kanser hücre hattı
HCC	:	Hepatosellüler karsinoma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer, enerji ve lipid metabolizmasını düzenleyen, aynı zamanda güçlü immünolojik fonksiyonlara sahip olan vücudun merkezi metabolik organıdır (Yahoo et al., 2023). Bu nedenle, çeşitli sebeplerden dolayı karaciğerde meydana gelen herhangi bir hastalık hayati tehlikeye neden olabilmektedir. Karaciğer hastalıkları her 25 kişiden 1'inin ölümüne sebep olmakla, yılda 2 milyon ölüme neden olmaktadır (Devarbhavi et al., 2023). Karaciğerin neden olduğu ölümlere akut hepatit, hepatoselüler karsinoma ve siroz gibi en yaygın olarak görülen vakalar sebep olmaktadır (Devarbhavi et al., 2023). Karaciğer kanseri, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2021 yılı verilerine göre dünya çapında kanser görülme sıklığında yedinci, ölüm oranlarında ise akciğer ve kolorektum kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (<https://gco.iarc.fr/today/home>). Primer karaciğer kanserleri; hepatoblastoma, hepatosellüler karsinom (HCC), anjiyosarkom veya kolanjiyokarsinom (CCA) olarak kategorize edilebilir (Aravalli et al., 2013). Hepatoselüler karsinom, tüm vakaların %80'inden fazlasını kapsama oranıyla en sık görülen formu oluştururken, kolanjiyokarsinom %10-20 arasında ve anjiyosarkom ise yaklaşık %1'dir (Zhu et al., 2016). İnsidans ve mortalite oranları Doğu Asya ve Afrika kıtalarında en yüksek olmasına rağmen, ABD ve Avrupa'nın farklı yerlerinde vaka oranlarında artış görülmektedir (McGlynn et al., 2015).

Kemoterapötik ilaçlar ve kimyasallar portal ven, hepatik arter, sinüzoidler ve santral ven düzeyinde olmak üzere vasküler sistemin her seviyesinde hasara neden olabilir. Sinüzoidal hücreler, Kupffer hücreleri ve diğer vasküler yapılar toksik ajanlar tarafından hasara uğrayabilir. Örneğin granulomatöz reaksiyonları bu hasarlara neden olabilir (Kaplowitz, 2004).

Karaciğere akan kandaki ksenobiyotikler, antijenler ve diğer yabancı partiküllerle ilk temas noktası olan karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri (LSEC) karaciğeri bu tür zararlı etkenlere karşı koruyan sağlam bir sistemle donatılmıştır. Bu sistemin bozulması, hem LSEC'lerde hem de sonuçta karaciğer parankiminde hasara yol açarak karaciğer hasarına neden olur (Baiocchi et al., 2019).

LSEC'lerin bariyer fonksiyonu, temizleme fonksiyonu, küçük parçacıkların temizlenmesi ve hepatik yıldız hücre (HSC) hareketsizliği gibi fizyolojik rolleri göz önüne alındığında, bunlara herhangi bir müdahale HCC hücreleri ve karaciğer

fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyerek karaciğer hasarına neden olabilir. LSEC'leri hepatotoksik ilaçların hedefi olarak tanımlayan çeşitli raporlar bulunmaktadır. Örneğin dünyanın bazı yerlerinde içme suyunda bulunan *P. Aeruginosa*'nın LSEC'lerin hızla yok olmasına neden olduğu (Mereish et al., 1991; Wei et al., 2008), LSEC'lerin şişerek, boşluk oluşturması ve kırmızı kan hücresi infiltrasyonuna ve Disse boşluğunda birikmesine yol açan fenestral birleşme yarattığı rapor edilmiştir (Hooser et al., 1991; McCuskey et al., 2005). Bu raporların sonucunda LSEC hasarının ardından HCC hücre iskeletinin hasar gördüğünü, bunun da HCC hücrelerinin morfolojik değişiklikler göstermesine ve karaciğer nekrozuna yol açtığını gösterilmiştir (Hooser et al., 1991; McCuskey et al., 2005).

İlaça bağlı karaciğer hasarı hem tanının konulmasında, hem de tedavinin belirlenmesinde bazı klinik sorunlara neden olabiliyor. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı'na göre, yeni bir kimyasal ürünün güvenliğinin sağlanarak insan klinik deneylerinde kullanılmadan önce hem kemirgen hem de kemirgen olmayan hayvan modellerinde değerlendirilmesi gerekiyor. Bu nedenle, insanlarda yan etkiye sebep olan 150 ilaç kullanılarak sıçan ve köpekler üzerinde yapılan çalışmalarda, bu deney hayvanlarının insanlardaki toksisitenin yalnızca %70 ini doğru şekilde tespit ettiği görülmüştür (Olson et al., 2000). Ayrıca gastrointestinal hematolojik ve kardiyovasküler hasarlar hayvan deneylerinin sonuçlarına benzer olmasına rağmen karaciğer hasarını tahmin etme yeteneği çok daha düşüktür. İnsanlarda DILI'nin tahminin zayıf olması, klinik olmayan çalışmalardan elde edilen yetersiz verilerle klinik aşamaya geçişten kaynaklı olduğu düşünülüyor. Bu zorluğun boyutu ve sağlık hizmetleri maliyetleri ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi üzerindeki olumsuz etkisi göz önüne alındığında, hayvan modellerine alternatif olan çalışmalara kritik bir ihtiyaç vardır (Monticello et al., 2017).

Çip üzerinde organ teknolojileri çok hücreli mimari, doku-doku arayüzü, vasküler perfüzyon, sıvı akışı ve insan organlarının diğer ilgili fiziksel mikro ortamı gibi üç boyutlu (3B) organ mikro ortamlarını tasarım, mühendislik ve mühendislik özelliklerinin akıllıca bir kombinasyonu oluşturarak insan vücudunun mikrofizyolojisini daha iyi yansıtabildiği için giderek daha popüler hale gelmektedir (Huh et al., 2010; Huh et al., 2012; Bhatia & Ingber, 2014; Kasendra et al., 2018). Bu sistemlerin akciğer, bağırsak ve böbrek de dahil olmak üzere birçok insan organının

karmaşık fonksiyonlarını ve patofizyolojisini aslına benzer bir şekilde taklit edebildiği gösterilmiştir (Bhatia & Ingber, 2014; Huh et al., 2012; Kasendra et al., 2018).

Bu Yüksek Lisans tez çalışmasında, karaciğer kanser hücreleri ve endotel hücreleri kullanarak geliştirilen ip üzerinde karaciğer kanseri platformunda, dünyada insidansı gittikçe artan karaciğer kanserinde klinik olarak kullanılan ve FDA tarafından onaylanan kemateraptik ilaçlardan olan Siklofosfamid'in (CP) karaciğer kanseri hücrelerine etkisi sırasında endotel hücreleri üzerinde yaptığı değişiklikler, bu hücrelere spesifik olan PECAM1/CD31 ve TF/CD142 belirteçlerinin ekspresyon oranlarının farklı karakterizasyon çalışmaları yapılarak incelenmiştir.

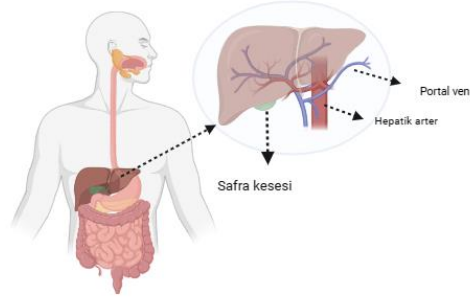


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğerin Vücuttaki Önemi

Karaciğer, kalp kadar önemli olan hayati organlardan biri olmakla beraber vücudun en büyük iç organıdır. Koyu kırmızımsı veya kahverengi renkte, koni şeklinde, vücuttaki en büyük bez olan karaciğer, karın boşluğunun sağ kısmında, diyaframın altında, mide, sağ böbrek ve bağırsakların üstünde bulunur (Kang, 2015). Yetişkin bir insanın ağırlığının yaklaşık %2-5'ini, yenidoğan bir bebeğin ağırlığının yaklaşık %5'ini oluşturur (Desmet, 2001). Karaciğer dokusunun temel yapısal birimi, çevresinde portal yollar ve merkezinde hepatik ven kolu bulunan hepatik lobüldür.

Karaciğerin dış tabakası seröz bir zar olan periton ile çevrelenmiştir ve bu tabakanın iç tarafı ise karaciğeri lob, segment ve lobüllere ayıran, elastik lif ve kolajenden oluşan Glisson kapsülünden ibarettir (<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/liver-histology>). Karaciğerin dört lobu vardır: sağ (lobus hepatis dekster), sol (lobus hepatis sinister), dörtgen (lobus quadratus) ve kuyruklu (lobus caudatus) (Hamilton Vernon 1). Karaciğer hem arteriyel (hepatik arter) hem de venöz (portal ven) sistemler gibi iki farklı kaynaktan kan aldığından dolayı diğer organlardan farklı bir kan dolaşımına sahiptir. Hepatik portal ven karaciğere bağırsaklardan, pankreastan ve dalaktan venöz kanın %75'inin gelmesini sağlar. Bu kan oksijen eksikliğine rağmen besin, endokrin salgıları bakımından zengin kan taşır. Hepatik arter damar ise, merkezi dolaşımdan karaciğere bol miktarda oksijen taşıyan ve karaciğere gelen toplam kanın yaklaşık %30-20'ini sağlayan sistemdir (Harkins & Ahmad, 2020). Böylelikle, iki farklı kaynaktan kan alan süngerimsi yapıdaki bu organ, vücuttaki birçok organ sistemlerinde önemli role sahiptir (Taub, 2004).



Created in BioRender.com bio

Şekil 2.1. Karaciğerin vücuttaki yeri.

2.2. Hepatosellular Karsinoma (HCC)

HCC'nin heterojenliği hedef genlerin ve iyi tedavilerin bulunmasını zorlaştırdığından, ilaç geliştirmenin maliyeti her yıl artmaktadır. Tek bir başarılı ilaç için tahmini en yüksek maliyet yaklaşık 2,7 milyar dolardır. İlaçların çoğu klinik testlerde başarısız oluyor ve bu da klinik öncesi testler için yeni bir stratejiye ihtiyaç duyulduğunu düşündürüyor (Prasad & Mailankody, 2017). 2015 yılında tahminen 810.000 kişinin karaciğer kanserinden öldüğü belirtilmiştir (Wang et al., 2016). Karaciğer kanseri dünya çapında erkeklerde kanserden ölümlerin ikinci, kadınlarda ise altıncı önde gelen nedenidir (Wang et al., 2016). ABD'de insidans oranları yılda yaklaşık %3 ila %4 artmakta ve 5 yıllık sağkalım oranı %20'nin altındadır (Strazzabosco et al., 2000). Karaciğer kanserinin en çok yayılan çeşitlerinden biri olan hepatoselüler karsinom, dünya çapındaki primer karaciğer kanserlerinin %85-90'ını oluşturur (El-Serag & Rudolph, 2007). 2020 yılında yayımlanan verilere göre, HCC yetişkinler arasında en çok rastlanan 6. kanser türü olup, kansere bağlı ölümlere sebep olan akciğer ve kolorektal kanserden sonra 3.sırada yer almıştır (Sung et al., 2021). Yıllık tahminlere göre, HCC'ye bağlı ölümlerin 2040 yılında 1,3 milyon ölümü aşması bekleniyor (Lampertico et al., 2017). HCC gelişmesi erkeklerde ve 65 yaş üstü hastalarda daha olasıdır ve genellikle karaciğer sirozunun ilerlemesi olarak gözlenir (El-Serag & Rudolph, 2007). HCC için diğer risk faktörleri arasında ileri yaş, cinsiyet, ailede karaciğer kanseri sıklığı, coğrafi bölge, aşırı alkol tüketimi, sigara, aflatoksin yüksek HBV viral yükü, HBV enfeksiyonunun süresi, Tip 2 diyabet, obezite, kalıtsal durumlar (asemokromatoz gibi), aflatoksin B1 ile kontamine gıdaların tüketimi, tütün kullanımı ve bir dizi metabolik bozukluk yer alır (Chen et al., 2006; El-Serag &

Rudolph, 2007; Lampertico et al., 2017; Marrero et al., 2005). HBV aşısının uygulanması ve HCV'ye karşı etkili tedavilerin uygulanması, viral hepatite bağlı vakalarının sayısını önemli ölçüde azaltmıştır.

HCC vakalarının büyük çoğunluğu kronik karaciğer hastalığı ortamında ortaya çıkar ve siroz HCC için birincil risk faktörüdür (Lampertico et al., 2017). Dünya çapında görülme oranları, risk faktörlerinin yaygınlığına dayanmaktadır. HCC hastalarının %80'inden fazlasının Sahra altı Afrika (SSA) ve Doğu Asya'da meydana geldiği tahmin edilmektedir Ayrıca risk faktörlerinin düşük ve orta gelirli ülkeler ile yüksek gelirli ülkeler arasındaki dağılımında da heterojenlik bulunmaktadır (Kedar Mukthinuthalapati et al., 2021). Batı ülkelerinde ise HCC 'nin insidansının giderek daha da yayılmasının yağlı karaciğer hastalığı (MAFD) ile ilişkili olduğu görülmüştür (Singal et al., 2020).

2.2.1. HCC tedavisinde kullanılan yöntemler

HCC tedavisi, tümörün evresine, hastanın performans durumuna ve karaciğer fonksiyon rezervine bağlıdır. HCC'nin kısa dönem sağkalımı son birkaç yılda cerrahi ve lokorejyonel tedavilerdeki önemli ilerlemelerle yükselmiştir ancak hastalığın tekrar oluşması hala önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (Raza & Sood, 2014). Karaciğer kanserini tedavi etmek amaçlı uygun tedavi yönteminin seçilmesinde karaciğerdeki tümörün yeri, boyutu, karaciğer hücrelerinin vücuttaki diğer organlara doğru yayılması gibi önemli faktörler incelenmelidir. Bu faktörler değerlendirildikten sonra cerrahi veya cerrahi olmayan tedavi yolları uygulanabilir. 2010 yılında güncellenen Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği'nin (AASLD) tedavi verilerine göre karaciğer kanser için sağkalım oranının daha yüksek olduğu hatta tamamen tedavi eden (küratif) yöntemler arasında cerrahi rezeksiyon veya diğer ismiyle parsiyel hepatektomi, transplantasyon (karaciğer nakli), perkütan ablasyon yer alıyor. Yaşam kalitelerini artırmak, hastalığın semptomlarını azaltmak (nonküratif) için kullanılan tedavi yöntemleri arasında ise transarterial kemoembolizasyon, kemoterapi (örneğin lipiodol ile doksorubisin, 5-fluorourasil, mitomisin ve sisplatin), radyoterapi tedavileri yer almaktadır. Parsiyel hepatektomi adı verilen bu tedavi yöntemi kanserin erken evresinde teşhis edildiğinde, karaciğerin tümörlü kısmı cerrahi olarak çıkarılarak uygulanmaktadır. Cerrahi işleminden sonra zamanla karaciğer dokusu kendini yenileyebilmektedir. HCC'nin farklı etiyolojileri göz önüne alındığında en iyi tedavi seçeneğinin belirlenmesi zorlaştırmaktadır. Sıklıkla karaciğer sirozu/fibrozisi

oluşması ve hastalığın yükü ve yaygınlığı tedavi edilememesinin altında yatan temel sebeplerdir (Llovet et al., 2021). Yukarıda söylediğimiz gibi karaciğer rezeksiyonu erken evre HCC hastaları için uygun bir seçenektir. Ancak çoğu hasta, altta yatan karaciğer fonksiyon bozukluğu veya lokal ilerlemiş hastalık nedeniyle rezeksiyona aday değildir (Llovet et al., 2021). Bazı cerrahlar HCC tedavisi için anatomik rezeksiyonu savunurken, diğer veriler anatomik olmayan rezeksiyonun yeterli bir sınır elde edildiği sürece benzer nüks ve prognoz riskine sahip olduğunu ileri sürmektedir (Llovet et al., 2021).

Transplantasyon işlemi uygun bir donörden alınan karaciğerin hastaya nakil edilmesiyle gerçekleşmektedir. Bu operasyon sırasında nakli gerçekleşen karaciğerde metastatik özelliklerin olmamasına dikkat edilmektedir.

Diğer bir tedavi yöntemi olan ablasyon işlemi hastaya lokal anestezi uygulanarak soğutma, ısıtma, etanol enjeksiyonları ile karaciğerin kanser oluşturan dokusunun hücrelerinin öldürülmesiyle gerçekleştirilmektedir. Karaciğer nakli hem hastanın malignitesini hem de kronik karaciğer hastalığını tedavi etme olanağı sağlarken, çok sayıda hasta nakil için uygun değildir ve dünya çapında da donör kıtlığı vardır (Llovet et al., 2021). Bu nedenle, cerrahi rezeksiyon erken evre hastalığı olan çoğu hasta için en erişilebilir seçenek olmaya devam etmektedir. Bir tümörün rezeksiyon kriterlerini karşılamaması durumunda, erken evre HCC'de radyofrekans ablasyon (RFA) ve orta evre HCC'de trans-arteriyel kemoembolizasyon (TACE) gibi seçeneklerle birkaç loko-bölgesel tedavi kullanılabilmektedir. Bununla birlikte, rezeksiyon yapılan hastalarda, beş yıllık tümör nüks oranının %70 olduğu tahmin edilmektedir. Bu da sağ kalım sonuçlarını ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir.

Cerrahi işlemler olarak rezeksiyon ve transplantasyon, küratif amaçlı tedavi seçeneklerinin temel taşı olmaya devam etmektedir. Tedavi amaçlı tedaviye aday olmayan hastalar için, immünoterapiler ve tirozin kinaz inhibitörleri dahil olmak üzere HCC'nin sistemik tedavisine yönelik moleküler ve hücresel yaklaşımlarda ilerlemeler kaydedilmiştir (Shannon et al., 2022).

Kanser hücrelerinin beslenmesi kanserin erken evrelerinde portal venden ileri evrelerinde ise hepatik arterden sağlanmaktadır. Bu yüzden transarteriyel embolizasyon hepatosellüler karsinomun kanserin ileri evrelerinde kullanılmaktadır.

Transarterial kemoembolizasyon tedavi yöntemi arter damarlarının tıkanmasıyla tümör dokusu içerisindeki hücrelere nekroz yaratılması ile uygulanmaktadır.

Radyasyon terapisi (radyoterapi olarak da bilinmektedir) yüksek enerjili ışınlar (örneğin X ışınları) ve radyoaktif maddeler sayesinde, kanser hücrelerini yok etmek, tümörleri küçültmek ve/veya kansere bağlı bazı semptomları hafifletmek için kullanılır. Doktorlar bu tedaviyle kanser hücrelerindeki DNA'ya zarar vermek, onları öldürmek veya büyüme veya bölünme yeteneklerini ortadan kaldırmak için yüksek enerjili X ışınları ve diğer radyasyon terapisi türlerini kullanmaktadır. Kemoterapi ileri HCC tedavisinde en önemli tedavi yöntemlerinden biridir. Bu tedavi yönteminde karaciğer kanserini oluşturan hücrelerinin kimyasal ilaçlar yardımıyla yok edilmesi amaçlanmaktadır(<https://www.cancer.org/cancer/types/livercancer/treating/chemotherapy.html>).

HCC için kemoterapi, sistemik kemoterapi ve hepatik arteriyel infüzyon kemoterapisi (HAIC) olarak sınıflandırılabilir. Japonya'da, sistemik kemoterapi esas olarak ekstrahepatik metastazı olan ileri HCC hastaları için kullanılırken, HAIC esas olarak vasküler invazyon kanıtı olan lokalize ileri HCC'li hastalar için kullanılmaktadır. Sistemik kemoterapi ile ilgili olarak, yapılan çalışmaların sonuçlarına dayanarak, sorafenib şu anda dünya çapında ileri evre HCC için standart terapötik ajan olarak kabul edilmektedir (Ikeda et al., 2018).

Kemoterapi tedavisi sadece hızlı büyüyen kanser hücrelerini öldürmekle kalmaz, aynı zamanda hızla büyüyen ve bölünen sağlıklı hücreleri de öldürür veya büyümesini yavaşlatır. Örnekler ağzınızı, bağırsaklarınızı, damarlarınızı kaplayan sağlıklı hücrelerin hasar görmesine sebep olarak ağız yaraları, mide bulantısı ve saç dökülmesi gibi yan etkilere neden olabilir.

Kemoterapi ile tedavilerde, kanser hücrelerini öldürmek veya büyümesini yavaşlatmak için güçlü ilaçların kullanıldığından bahsettik. Bu tedavinin sonuçlarını daha da etkili etmek için adjuvan ve neadjuvan kemoterapiler de kullanılmaktadır. Neoadjuvan kemoterapi, kanserin geri gelme olasılığını azaltarak, ameliyat veya radyasyon tedavisi gibi birincil tedaviden önce uygulanan ve bu tedavi yöntemlerini daha kolay veya daha etkili hale getirerek tümörü küçültmek veya kanserin diğer organlara yayılma potansiyelini kontrol etmeye yönelik kullanılan bir stratejidir. Ameliyat sırasında karaciğer dokusundaki tümörlü kısım cerrahi yolla çıkarılsa bile

mikroskopik kanser parçaları bazen kalabilmektedir ve mevcut yöntemlerle tespit edilmemektedir. Bu sırada kanserin geri gelme olasılığını azaltmak için adjuvan tedavi kullanılmaktadır.

Daha önce bahsedilen çalışmalarda, birçok neoadjuvan sistemik tedavi, hem tek başına hem de adjuvan tedavilerle kombine edildiğinde, HCC tümörlerinin boyutunu küçültme ve tedavi edilemeyen hastalığı rezeke edilebilir hale getirme potansiyeli göstermiştir. Ayrıca neoadjuvan tedavilerin majör tümör nekrozuna neden olduğu gösterilmesi, nüks oranlarının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Chamseddine et al., 2023). Adjuvan sistemik tedavilerin tek başına etkisi hakkında daha az şey bilinmektedir. Bununla birlikte, faz III Imbrave050 çalışmasının ön sonuçlarına göre, atezolizumab ve bevacizumab ile adjuvan tedavi, HCC'li hastalarda cerrahi rezeksiyon veya ablasyon sonrasında nüksüz sağkalım oranını arttırmıştır (Kudo, 2023).

Son olarak, sınırdaki rezeke edilebilir ve rezeke edilebilir HCC'li hastalar için sistemik tedavilerin rolünün anlaşılmasında ilerleme kaydedilmiş olsa da, önemli zorluklar devam etmektedir. Neoadjuvan tedavilerin neden olduğu tümör nekrozu ile objektif yanıt arasındaki ilişki ve bu son noktaların nüks oranlarını nasıl etkilediği daha fazla araştırmayı gerektirmektedir. Özellikle, HCC'de immünoterapideki ilerlemeler çağında, ameliyattan önce tümör yoğun tümör infiltrate eden lenfositlerin bulunduğu mevcut aktif tümör mikro ortamı göz önüne alındığında neoadjuvan yaklaşım avantajlıdır (Chamseddine et al., 2023).

Kanser hastalarını tedavi etmek için kullanılan iki yaygın kemoterapinin (doksoru-bisin ve paklitaksel) karaciğer dokusu hasarına neden olduğu gözlemlenmiştir (Hong et al., 2013). Doksorubisin, karaciğerdeki yağ asitlerinde artış olan steatoza neden olabilirken, paklitaksel hipotansiyon (düşük kan basıncı) ve iskemi (kan akışının yetersizliği) gibi durumlar, organlara yeterli oksijen ve besin sağlanmasını engelleyerek ciddi karaciğer hasarına neden olabilmektedir (Diabetes et al., 2012; Timm et al., 2022).

Bir melanom modelinde, sisplatin ile tedavi edilen fareler, karaciğer fibrozisini indükleyerek ve karaciğerdeki metastatik lezyonların sayısını artıran inflamatuvar yolları aktive ettiği görülmüştür (Timm et al., 2022). Düşük dozlarda paklitakselin aynı zamanda *in vivo* fare modelinde meme kanseri karaciğer metastazını arttırdığı ve epitelyal-mezenkimal geçişi başlatarak meme kanseri hücre göçünü teşvik ettiği de

gösterilmiştir (Timm et al., 2022). Kemoterapi tedavisinin karaciğer ECM'sinin genel bileşimini nasıl değiştirdiği ve bu değişikliklerin metastatik kolonizasyona nasıl katkıda bulunduğu hala bilinmemektedir.

Çeşitli kanser türlerinde ve otoimmün hastalıklarının tedavisinde giderek kullanımı artan diğer bir ilaç siklofosfamiddir. Fakat bu ilacın da yüksek dozları ölümcül hemorajik miyokardit de dahil olmak üzere ciddi kardiyak toksisiteye neden olabilmektedir. CP metabolitlerinin oksidatif strese neden olduğuna ve proteinlerin, eritrositlerin ve toksik metabolitlerin damar dışına sızmasıyla sonuçlanan doğrudan endotel kapiller hasarına neden olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca toksik metabolitlerin varlığında endotel hücrelerinin parçalanması, miyokard ve kılcal kan damarlarında hasara yol açarak, interstisyel kanamaya ve mikrotombüsün oluşumuna neden olmaktadır (Mills & Roberts, 1979). Bu olumsuz durumlar da kalp yetmezliği ve aritmiler olarak ortaya çıkmaktadır. 1976'da Appelbaum ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 4 hastadan 3'ünde Siklofosfamid kaynaklı kardiyotoksosite ile histopatolojik durumunun ilişkisinin olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Dhesi et al., 2013).

Kanser tedavileri için kullanılan 5-FU, oksaliptatin ve irinotekanın gibi ilaçlar HCC hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak karaciğer hasarına neden olduğu düşünülmektedir (Shiga & Hiraide, 2020).

Kemoterapötik ilaçların önemli bir maddesi olan antrasiklin antineoplastik ajanlar hematolojik malignitelere ve tümörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ajanların kullanımı tedavinin ilerlemesini ciddi şekilde etkileyen kardiyotoksosite ile bağlantılı olabilmektedir (Bernstein, 2018).

2.3. Endotel Hücre Hasarı

Tüm damar sisteminin kan damarlarını kaplayan endotel hücreleri katman oluşturarak yayılmış hücrelerdir. Vasküler endotel hücreleri çevreleriyle üç farklı arayüzde etkileşime girmektedir (Bazzoni & Dejana, 2004):

- Bazal yüzey, altta yatan damar intimasının bazal membranına endotelial bağlantıdır. Membran, plazma proteinleri (heparin gibi), kolajenlerden oluşur; laminin; glikoprotein ve fibronektin.

- Yan yüzeyler, geçirgenliği düzenleyen ve hücre (Colagrande et al., 2015) yüzey polaritesini koruyan bir bağlantı oluşturmak için bitişik endotel hücreleriyle etkileşime girmektedir.

- Apikal veya luminal yüzey kan ve onun hücresel elemanları ile etkileşime girer. Apikal yüzey lökositleri veya trombositleri bağlayabilen yapışma molekülleri (ICAM-1, PECAM1, ICAM-2 vb.) olup homeostazisin ve vasküler olayların korunmasında hayati bir rol oynamaktadır (Privratsky, 2010). Plazma proteinleri (heparin), albümin ve fibrin, glikoproteinler vb. gibi periferik bileşenlerle kaplanmıştır. Endotelyumun çeşitli rolleri vardır; en bariz olanı kan ve interstisyel sıvılar arasında metabolitlerin, besinlerin veya salgı ürünlerinin değişimidir. Endotel hücreleri ayrıca membran taşınmasını, pıhtılaşmayı ve fibrinolizi, vazoaaktif hormonların sentezini ve salınmasını vb. düzenlemektedir (Privratsky, 2010).

Genel olarak kemoterapiye sistemik endotel disfonksiyonu eşlik eder sonucunda kardiyovasküler hastalık (KVH) riskini artırır ve vasküler komplikasyonların oluşmasını desteklemektedir (Morganti et al., 2002). Sistemik endotelial fonksiyon bozukluğu olan kanser hastaları, antikanser ilaçlarının zararlı etkilerine karşı duyarlı olabilir. Kardiyotoksik kanser tedavileri ile tedavi edilen hastalarda hipertansiyon, obezite, dislipidemi ve metabolik sendrom gibi birçok risk faktörü ortaya çıkar, bu da vasküler rezervin daha da kötüleşmesine ve kardiyotoksikite riskinin artmasına neden olmaktadır. Bu problemlerin sonucu da morbidite ve/veya mortalitenin artmasına neden olarak kanser tedavilerinin etkinliğini sınırlayabilmektedir (Cardinale et al., 2013).

Hepatik endotelial hücreleri veya karaciğer sinüzoidal endotelleri, karaciğere özgü morfolojik özelliklere ve işlevlere sahip benzersiz bir endotel hücre popülasyonu oluşturmaktadır (Lalor et al., 2006). Endotel hücreleri, mikroçevresinden gelen uyarıya bağlı olarak, ürünleri endotel hücre matrisinin yeniden şekillenmesi, pıhtılaşması ve fibrinolizin yanı sıra polimorfonükleer lökositler, trombositler ve lenfositlerle etkileşimler ve anjiyogeneze merkezi olan çeşitli genlerin ekspresyonunu değiştirerek de yanıt verebilmektedir. Endotelial algısında, gen ekspresyonunun sitokinler (örneğin doku faktörü veya CD142), reaktif oksijen ara ürünleri ve mekanik kuvvetler tarafından düzenlenmesinde yer alan moleküler olaylar tartışılmaktadır.

Karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri (LSEC), hepatik lobüle giren kanın fiziksel dağıtım sistemini sağlamaktadır. HCC hücreleri ve sinüzoidlerdeki endotel hücreleri arasındaki yakın ilişkiler göz önüne alındığında, zebra balığında doğrudan bir hücresel etkileşim olduğu görülmüştür (Sakaguchi et al., 2008). LSEC'ler karaciğer sinüzoidlerinin kılcal damarlarının iç astarını oluşturan ve kanla taşınan partiküller, patojenler ve ksenobiyotiklerle ilk temas eden hücre grubu olduğundan bunların zararlı etkilerine karşı eğilimlidirler (Sørensen et al., 2011).

In vitro çalışmalarında endotel hücrelerinin kimyasallara, ilaçlara veya farklı koşullar altında, örneğin fotodinamik tedaviye nasıl tepki vereceğini incelemek için araştırmacılar LSEC'lerin stabil endotel özellikleri kendinde taşıyan ölümsüzleştirilmiş vasküler endotelyal hücre dizisi olan EA.hy926 kullanmışlardır (Urbanczyk et al., 2022). Mevcut tez çalışmasında, vücuda intravenöz yolla enjekte edilen antikanser ilacın, damar hücrelerinde (EA.hy926) doku faktörü ve yüzey belirtecinde hangi değişikliklere sebep olduğunu incelenmesi bu çalışmanın hedeflerinden bir tanesidir.

Endotel hasarla bu çalışma kapsamında oluşturulan modelde ilişkisinin incelenmesi hedeflenen ve birkaç çalışmada hasar sırasında ekspresyonundaki değişikliklerin gözlemlendiği CD142, yaklaşık 47 kDa'lık bir transmembran glikoproteinidir ve pıhtılaşma faktörleri VII (F VII) ve VIIa ve pıhtılaşma proteaz kaskadının olan F VIIa'nın başlatılması için kofaktör görevi görmektedir. Ayrıca, hücrelerin büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve apoptozis gibi süreçleri de düzenleyerek hücresel homeostazı korumaktadır. Bunu yanı sıra, pıhtılaşma kaskadında yer alan protein kompleksi olduğu için damar hasarı sırasında pıhtı oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır. Diğer belirteç ise endotel hücrelerinin spesifik yüzey belirteci olan PECAM-1, diğer bir adlandırılması CD31'dir.

2.3.1. PECAM/CD31

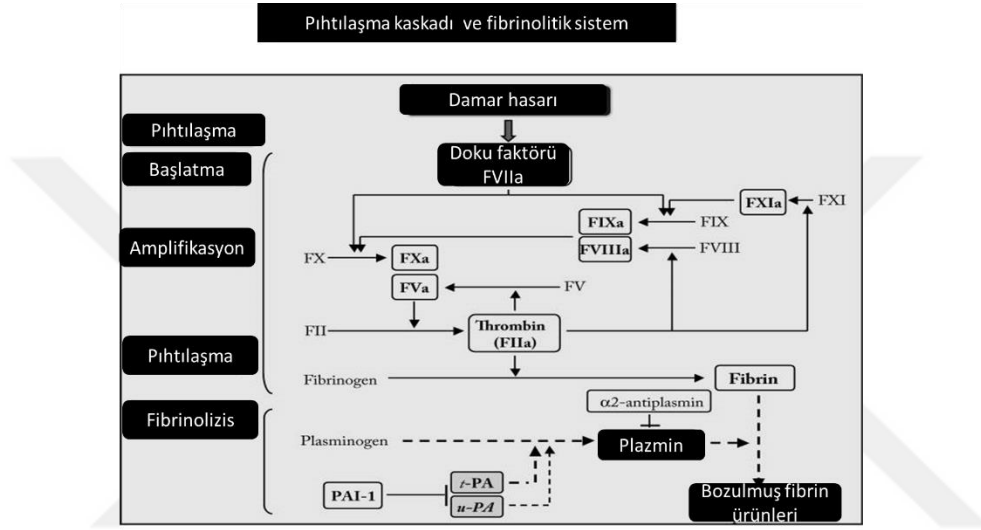
Platelet endotel hücre yapışma molekülü olan PECAM-1 veya CD31 endotelyal hücrelerin yüzeyinde seçici olarak eksprese edilen hücre adezyon moleküllerinin 130 kDa'lık bir glikoprotein hücre yapışma ve sinyal reseptörü üyesidir (Lertkietmongkol, 2017; Newman et al., 1990). PECAM-1, EC'lerde endotelyal hücreler arası bağlantılarda en yoğun yüzey reseptörüdür ve damar bütünlüğünün korunmasında çok önemlidir. PECAM-1, iki İmmünoresseptör Tirozin bazlı İnhibitör

Motif (ITIM'ler) (Şekil 4) yoluyla hücre içi sinyalleşme sağlayan bir hücre dışı alan ve bir sitoplazmik alandan oluşan bir tip I trans-membran glikoproteindir. PECAM-1'in hücre dışı alanı, PECAM-1/PECAM-1 homofilik etkileşimleri yoluyla PECAM-1'e yapışkan özellikler kazandıran altı İmmünoglobulin benzeri alan (IgD) halinde düzenlenir (Newman et al., 1990). Bu altı alandan, PECAM-1 homofilik bağlanmasına aracılık etmek için IgD1'in gerekli olduğunu gösterir (Sun et al., 1996). PECAM-1 çoğunlukla trombositler, monositler, nötrofiller, insan T hücresi, insan ve fare B hücreleri tarafından eksprese edilir (Newman et al., 1990). PECAM-1, bir sinyal reseptörü ve bir yapışma molekülü olarak çok yönlü roller sergiler. Homofilik etkileşimler oluşturma yeteneği PECAM-1'in hücre-hücre sınırlarında yoğunlaştırarak, akışı algılama, lökositlerin transendotelial göçüne aracılık etme ve vasküler geçirgenliği düzenleme işlevlerini yerine getirir. Enflamatuvar süreçler sırasında endotel hücre-hücre birleşiminden geçen vasküler endotel hücreleri ve lökositler üzerindeki lokalizasyonu ve ekspresyonu ve çeşitli hücre içi sinyalleşme süreçlerini modüle etme yeteneği nedeniyle PECAM-1, vasküler bariyerin düzenlenmesinde hayati bir rol üstlenmek üzere hazırlanmıştır (Privratsky & Newman, 2014)

2.3.2. Doku faktörü

Doku faktörü (DF), sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Normal hemostazda yüksek afiniteli hücre yüzeyi reseptörü ve faktörler VII ve VIIa için gerekli kofaktör olarak işlev gören 47-kDa'lık bir transmembran glikoproteindir. CD142, ayrıca doku faktörü (tissue factor) veya faktör III (factor III) olarak da bilinen, pıhtılaşma kaskadının başlatılmasında önemli bir rol oynayan bir protein olan dokuya spesifik faktör proteinini tanımlar. DF'nin hücre yüzeyine maruz kalması, dışsal pıhtılaşma yolunu başlatır ve bir kan pıhtısı oluşumuna yol açar. Yeni protein sentezinin yokluğunda indüklenen ani-erken gen olarak sınıflandırılmıştı. DF mRNA'sının veya antijeninin ekspresyonu, mutlaka aktif proteinin fonksiyonel kullanılabilirliğini yansıtmayabilir. Normalde, DF insan kan dolaşımında tespit edilemez ancak bazı patolojik durumlarda monositler ve endotel hücreleri, yüzeylerinde dF'yi eksprese eder. Monosit türevi makrofajlar ve vasküler endotelium tarafından DF ekspresyonu, kanser, enfeksiyon, inflamasyon ve ateroskleroz gibi patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Doku faktörü, faktör VII'nin aktif formu olan faktör VIIa'ya aktivasyonuna kofaktör olarak katılarak kan pıhtılaşmasının dışsal yolunu

başlatır. Faktör VIIa-doku faktörü kompleksi, Ca^{2+} varlığında faktör X ve faktör IX'u aktive ederek intrinsik yol yoluyla pıhtılaşmayı teşvik eder. Faktör VII'nin DF'ye bağlanması, faktör X ve IX aktivasyonunun katalitik etkinliğinde milyon kat bir artışa neden olur. Faktör Xa, protrombini trombine aktive eder ve trombin, fibrinojeni fibrine dönüştürür (Şekil 2.2). DF, vasküler yaralanma durumunda kanamayı sınırlamak için hemostazda önemli bir rol oynar. Aynı zamanda tümörle ilişkili anjiyogenez gibi hemostatik olmayan roller de oynar. DF, erken embriyogenezde kan damarı gelişiminin düzenlenmesine katkıda bulunur.



Şekil 2.2. Pıhtılaşma kaskadının ve fibrinolitik sistem şematik gösterimi (Félétou, 2011).

DF aynı zamanda sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesidir; faktör VIIa'nın DF'ye bağlanması, bunun sonucunda çeşitli hücre tiplerinde sitozolik kalsiyum sinyalleri-nin transdüksiyonuna yol açması, DF'nin hücre içi sinyalleşmede de yer alabileceğini düşündürmektedir. Doku Faktörü pıhtılaşmanın ana başlatıcısıdır ve kontrolsüz ekspresyonu aterosklerozla ilişkili trombotik atakları başlatır.

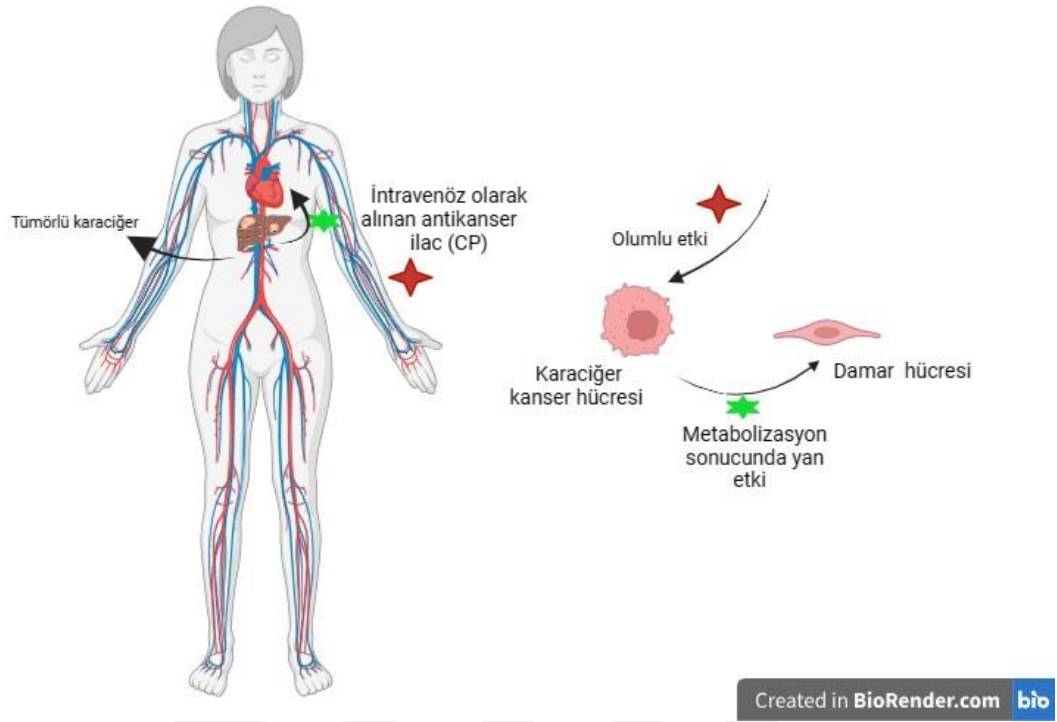
2.4. Siklofosfamid

Siklofosfamid (CP), DSÖ Temel İlaçlar Listesi'nde yer alan yaygın bir kemoterapötiktir. CP, DNA'nın alkilasyonu yoluyla DNA ve RNA çapraz bağlanması sonucu protein sentezini inhibe ederek aktif bir forma metabolize olarak etkisini göstermektedir (Mills et al., 2019).

CP'nin antineoplastik etkilerinin çoğunluğu, ilacın sitokrom P-450 gibi karaciğer enzimleri tarafından metabolize edilmesiyle oluşan fosforamid hardalın-dan kaynaklanmaktadır. Karaciğer enzimleri önce CP'yi hidrosisiklofosfamide dönüştürür ve daha sonra aldofosfamide metabolize olur. Aldofosfamid, aktif alkileyici ajanlardan olan fosforamid hardalı ve akroleine bölünür. Fosforamid metaboliti, guanin N-7 pozisyonunda bitişik DNA şeritleri içinde ve arasında çapraz bağlantılar oluşturur. Bu değişiklikler kalıcı olmakla birlikte programlanmış hücre ölümüne yol açmaktadır (Colvin, 1999). Akroleinin antitümör aktivitesi yoktur ancak hemorajik sistitin ortaya çıkmasından sorumlu olan ana ajandır (Ogino & Tadi, 2020).

İlacın metabolizması ve aktivasyonu karaciğerde gerçekleşmektedir. İlacın %75'i sitokrom P450 izoformları, CYP2A6, 2B6, 3A4, 3A5, 2C9, 2C18 ve 2C19 tarafından aktive edilir. CYP2B6 izoformu en yüksek 4-hidroksilaz aktivitesine sahip enzimdir. CP, sonunda aktif metabolitler olan fosforamid hardalı ve akroleini oluşturmak üzere aktivasyona uğrar. CP'nin kendi metabolizmasını indüklediği görülmektedir; bu da klirenste genel bir artışa, 4-hidroksil metabolitlerinin oluşumunun artmasına ve tekrarlanan uygulamayı takiben $t_{1/2}$ değerlerinin kısılmasına neden olur((Cyclophosphamide: Uses).

Düşük dozlarda CP, tümör öncesi düzenleyici T hücrelerini (Treg'ler) tüketirken, CD8+ T hücreleri gibi anti-tümör bağışıklık hücreleri canlı ve aktif kalmaktadır. Bu da CD8+ T hücresi yanıtını arttırmayı amaçlayan tedaviler için avantajlı olabildiği düşünülmektedir. Klinik olarak CP, bir kapsül veya tablet şeklinde ağızdan, çözelti halinde intravenöz olarak veya çözelti halinde doğrudan uygulama yoluyla alınır. Siklofosfamid çoğunlukla hastanın metabolizmasına, diğer ilaç etkileşimlerine, vücut kütleline ve yaşına bağlı olarak 2-5 günlük bir süre boyunca yaklaşık 40 ila 50 mg'lık genel bir öneri ile uygulanır. CP, kanserli olup olmadıklarına bakılmaksızın çeşitli hücre türlerini etkilediği için "sitotoksik ajan" olarak nitelendirilir. CP'in klinik yan etkileri diğer anti-kanser ilaçlarına göre daha az olmasına rağmen, karın ağrısı, iştahsızlık, kusma, saç dökülmesi ve cilt renginde değişikliklere sebep olabilmektedir (<https://www.mayoclinic.org/>).



Şekil 2.3. Karaciğer kanserinin metabolik aktivitesine ve bir antikanser ilacının metabolitinin sağlıklı damar üzerindeki yan etkilerine göre CP anti-kanser ilacının etkisinin gösterimi.

Anti-kanser ilacı karaciğer kanserini etkili bir şekilde tedavi edebilse de, ilacın metaboliti kalp gibi sağlıklı dokulara giderek bu dokulara zarar verebilir. CP'nin yan etkilerini iki tip hücre kullanarak özetlemek için in vitro modelimizde bir karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) ve endotel hücre hattı (EA.hy926) kullanılmıştır. İkili kültür sisteminde, bir ilaç metaboliti metabolik aktivite ile HepG2 hücrelerinden salınabilir ve endotel hücre hasarına neden olabilir.

2.5. Çip Üzerinde Organ Sistemleri

Mikroakışkan sistemler, organların fizyolojik, yapısal, biyolojik ve fonksiyonel olarak benzeşimini yeniden oluşturmak için son yıllarda en çok çalışılan sistemlerdir. Bugüne kadar çoğu doku ve/veya organ tipi, örneğin kan beyin bariyeri, kalp, akciğer, karaciğer, bağırsak, damar sistemi, böbrek ve kas-iskelet sistemi dahil ilgili fonksiyonel alt birimleri yeniden üretmek için başarılı bir şekilde modellenmiştir. Bu bireysel cihazlar, entegre platformların insan vücut sisteminin fizyolojisini ve bölümlendirmesini daha fazla taklit edecek şekilde bağlanabilir ve farmakokinetik ve

farmakodinamik araştırmalarını mümkün kılar. ip içerisinde organ (organ-on-a-chip, OOC) platformu ile alakalı makaleler ilk olarak 2000’li yıllardan itibaren yayımlanmaya başlamıştır. Örneğin, sıçan ve insan primer HCC hücreleri yapay sinüzoid modeli olarak tasarlanmış mikroakışkan bir çipte endotel benzeri bir bariyer varlığında 2007 yılında çalışılmıştır (Lee, Hung ve Lee, 2007).

Gelişen ilk on teknoloji arasında yer alan ip üzerinde organ (organ-on-a-chip), mikroakışkan ip üzerine inşa edilmiş fizyolojik biyomimetik organ sistemidir (Wu, 2020). Bu mikrofizyolojik sistemler, insan vücudu dışındaki doku ve organların daha yüksek düzeydeki fonksiyonlarını yeniden yaratma, hücrelerin insan vücudu gibi mikro ortamı taklit edebilen hücre kültürlerinin gerçekleştirme potansiyeline sahiptirler. Ayrıca bu platformlar insanların ilaçlara veya başka bileşiklere nasıl tepki vereceğine dair daha fazla öngörüde bulundukları ve daha az iç gücü gerektirmektedir. Daha hızlı sonuçlar üretebilme potansiyeline sahip olduklarında dolaylı ilaçların piyasaya sunulması için gereken süreyi kısaltabilmektedirler. Araştırmalar, genetik bozukluğu olan hastalardan elde edilen hücrelerin ipteki hücrelerde bu özellikleri sergilemeye devam ettiğini, bilim adamlarının bu tür hastalıkların nasıl geliştiğini ve nasıl tedavi edilebileceğini daha iyi anlamak için hastalık modelleri oluşturmasına olanak tanıdığını gösterdi. Bu mikroakışkan biyoreaktör sistemleri, organa özgü hücre kültürleri ve mikrolitre ortamlar kullanılarak organ veya çoklu organ fonksiyonlarının ve etkileşimlerinin analiz edilmesine olanak tanır. Böylece sistemler, insan organlarının sağlıklı ve hastalıklı olmak üzere in vitro modellerde geliştirilmesine, hastalık etiyolojisi ve organogenezinin temel mekanizmalarının araştırılmasına, ilaç etkinliğine, toksisiteye ve ilaçların etken maddesinin keşfine model platform sağlayan sistemlere olanak sağlamaktadır. Bugüne kadar kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, karaciğer gibi ana organlardan plasenta gibi daha periferik organlara kadar farklı organlar için birçok farklı ip üzerinde organ sistemi geliştirilmiştir. ip üzerinde kalp, ilacı hızlı bir şekilde test etmek ve kalp hücrelerinin reaksiyonunu gözlemlemek için kalbin mekanizmalarını yeniden üreten bir mikroakışkan platformdur. ip üzerinde kalp modeli oluşturmak için mikroipin kalbin ana özelliklerini, örneğin mekanik kasılmalar, moleküler taşıma, elektriksel aktivite ve bazı ilaç uyarımlarına verilen spesifik tepkileri taklit etmesi gerekmektedir. Sidorov ve ark. yapmış oldukları çalışma ile atan kalp kasına dönüşen kardiyomiyositleri kltrlemeyi başara bilmişlerdir. Profesör Wikswo ve ark 3 boyutlu kalp dokusunda hem elektriksel

stimülasyon hem de kronik ölçümler için kullanılabilen kabloları içeren I-Wire Heart-on-Chip tasarlamışlardır (Schroer et al., 2017)

Hyun Jung Kim ve arkadaşları, bağırsak peristaltizmi benzeri hareketler ve akış deneyimleyen mikrobiyal floranın olduğu çip üzerindeki insan bağırsak sistemini başarıyla tasarlamıştır (Kim et al., 2012). Diğer taraftan, beyinde nöronlar, oligodendrositler, astrositler ve mikroglia, hücre türleri birbirleriyle sürekli etkileşimi ve nöron hücrelerinin esnek olması nedeniyle insan beyninin karmaşıklığını modellemek çok zordur. Bu problem de çok bölgeli beynin in vitro modellerinin geliştirilmesinin önemini vurgulamaktadır. Bu sebeple Dauth ve ark. beynin farklı alanları ve bu alanların iletişim yoluyla hareket ettiği gözlemine dayanarak yeni bir çip üzerinde beyin modelini tasarladılar (Dauth et al., 2017). İlaç geliştirmeye, insan dokusunu taklit etmeye hem de hastalık modellemeye yönelik hücre kültürleri, 2 boyutlu hücre kültürü, 3 boyutlu hücre kültürü (3 boyutlu biyo-baskı teknolojisini içerir) ve mikroakışkan yonga sistemleri kullanılmaktadır. 2D hücre kültürü sistemi hücrelerin in vivo ortamında oksijen ve diğer moleküllerin difüzyonunu taklit etmekte de başarısız olduğundan, aynı zamanda hücreler tek tabaka halinde büyütüldüğünden dolayı vücudumuzdaki hücrelerin durumunu doğru bir şekilde yansıtamadığından bu kültürle ilgi gittikçe azalmaktadır. Bu dezavantajları göz önüne aldığımızda 3B hücre kültürü son yıllarda daha fazla ilgi görmeye başlamıştır. 3B hücre kültürleri, hücre kültürü yaklaşımlarının kapsamını genişletmiş ve bu yöntemler kullanılarak birçok araştırmalar yapılmıştır. Ancak yöntemler, hassasiyet, mekanik stabilite ve kontrol, istenilen işlevsellik ve orijinal insan organ ve dokularına fizyolojik ve biyokimyasal benzerlikten yoksundur. Üç boyutlu kültürün yararlı yönleri kullanılarak çip üzerinde organ modellerinin geliştirilmesi yönünde çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Çip üzerindeki organlar, insan fizyolojisini organa özgü bir bağlamda incelemek ve in vitro hastalık modelleri geliştirmek için mikroakışkan teknolojilerini 3B kültürde yaşatılan canlı hücreler kullanılarak bütünleştirilmektedir (Huh et al., 2011) .

Karaciğer homeostazis ve hayatta kalmak için çok önemli olan çeşitli metabolik görevlere sahiptir. Özellikle, kan plazmasının ozmolaritesini korumak için serum albümininin üretimini, yaralanmanın iyileşmesini sağlamak için kan pıhtılaşma kademesinde kullanılan faktörlerin salgılanmasını, vücuttan atılmaya hazırlanmak için kandaki ilaçların ve toksinlerin metabolizmasını kontrol ettiği için, ilaç endüstrisinde

birçok bileşimin metabolizmasının incelenmesi için iyi in vitro karaciğer modelleri oldukça aranmaktadır. Ancak birçok geleneksel model, birçok dezavantajı nedeniyle sınırlı uygulamalarda kullanılmıştır: Örneğin, eksplant kültürler yalnızca kısa süreliğine canlı tutulabilir, ayrıca insan HCC hücreleri nadirdir ve pahalıdır. Son derece kontrollü ortamlarda kültürleri minyatürleştirmeyi amaçlayan çip üzerinde karaciğer modelleri, bu dezavantajların üstesinden gelme potansiyeline sahiptir. Ek olarak, biyofabrikasyondaki ilerlemeler, fiziksel ve biyolojik olarak insan karaciğer dokusuna benzeyen karmaşık mikro ortamların özetlenmesini mümkün kılmıştır. Son deneyler, bu platformların yalnızca uzun vadeli yaşayabilirliğini göstermekle kalmamış, aynı zamanda karaciğerde doğal olarak bulunan çeşitli hücre tiplerinin dahil edilmesi yoluyla, bunların in vivo karaciğer fizyolojisini simüle etme ve karaciğer fonksiyonlarının çoğunu özetleme yeteneklerini de ortaya koymuştur. Lee ve ark. mikroakışkan endotelial bariyere sahip yapay karaciğer sinüzoidleri oluşturmak için mikrobiyofabrikasyonun potansiyelinden yararlanarak ve hücrel kendiliğinden birleşme yoluyla çipte büyüyen mikro dokunun, karaciğerdeki asinüs yapısına benzer kütle taşıma özelliklerine sahip olduğunu keşfetti. Ancak en büyük sorunlardan biri bu cihazlarda kullanılacak HCC hücrelere uygun hücre kaynaklarının bulunmamasıdır. Bu amaçla Bhatia ve meslektaşları, iPSC'den türetilen sferoidleri HCC hücrelere ayırmak ve bunları mikroakışkan bir cihaza dahil etmek için bir protokol geliştirdiler. Mikro üretim teknolojisindeki bu devam eden gelişme, kök hücre bazlı kaynaklardan türetme protokolleri ve hücre-hücre iletişiminin bir araya getirilen dokunun genel işlevselliğini nasıl destekleyebileceğinin temel düzeyde anlaşılması, çeşitli ilaç testi uygulamalarında kullanıma yönelik platformlar, çip üzerinde karaciğerin üretilmesine yol açacaktır.

2.5.1. Karaciğer kanseri çipi

Geleneksel iki boyutlu modeller, kanser dokularının doğal *in situ* ortamını taklit edemezken, küresel kültür, 3B biyobaskı ve mikroakışkan sistemler gibi gelişen son teknolojileri üç boyutlu (3B) modeller, tümör dokusunun hipoksik ortamının simülasyonu gibi tümör mikroçevresinin belirli yapılarını ve bileşenlerinin *in vitro* reproduksiyonunu sağlayabilmektedir. Çip üzerinde kanser teknolojisi, tümör dokusunun mikro ortamını ve bunun metastazdaki rolü gibi özelliklerinin incelenmesini sağlayan 3B hücre kültürü teknolojisini birleştirmektedir (Zhang et al., 2022). Mikroakışkan sistemlerin modüler yapısı, farklı hücre tiplerini dahil etme ve

konsantrasyon gradyanları ve akış gibi biyokimyasal ve biyofiziksel faktörleri kontrol etme kolaylığı sunmaktadır (Ngan Ngo et al., 2023; Zhang et al., 2022).

Karaciğer kanser çipi, karaciğer kanseri tedavisi için bir platform sağlayabildiği düşünülmektedir. Karaciğer kanserinin incelenmesinde sitotoksosite analizleri, ilaç geliştirme ve tarama açısından oldukça önem taşımaktadır. İlaç metabolizmasının neden olduğu reaksiyonlar, HCC'lerin çip üzerinde organ sistemlerindeki rolünü arttırmaktadır. Şimdiye kadar yapılmış farklı çip üzerinde karaciğer platformları vardır. Örneğin, Shuler ve Tatosian, vücudun tepkisini taklit etmek için birbirine bağlı olacak şekilde çeşitli doku veya organlardan oluşan, çip üzerinde karaciğer-bağırsak-meme platformu geliştirmiştir. Bu platform ile, farklı ilaçlara maruz kalan kanserli organların tedavisinde ilaçların etkisinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılabildiği düşünülmektedir (Tatosian & Shuler, 2009). Hirschi'nin ekibi, insan sağlığı ve hastalıklarında ilaç testleri için tek bir insan pluripotent kök hücre hattından türetilen, işlevsel olarak birbirine bağlı vasküler, karaciğer ve kalp mikrodokularına sahip entegre kalp-karaciğer-damar mikrofizyolojik sistemlerinden ibaret bir platform geliştirmiştir (Vunjak-Novakovic et al., 2013). Çip üzerindeki kanserin, kanserli ve kanserli olmayan hücreler arasındaki ilişkiyi anlamak için çok güçlü bir araç olarak kullanılabileceğini düşünülmektedir. Ayrıca mikroakışkan sistemler, karmaşık tümör mikroçevresini yeniden oluşturarak hücrelerin daha detaylı incelenmesine ve metastaz sürecinin ilerlemesini modüle eden farklı faktörlerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Zhang et al., 2022).

Damar sistemi (dolaşım sistemi olarak da bilinir) oksijen, besin maddeleri ve ilaçları taşımanın yanı sıra hücrelerden kaynaklanan metabolik atıkları uzaklaştırmak, vücut içindeki organlar ve dokular arasında etkileşimi kolaylaştırmak aynı zamanda kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %90'ından sorumlu olan tümör metastazında önemli göreve sahip bir ağ sistemidir (Lambert et al., 2017). Mikroakışkan cihazlarda vaskülarize tümör modelleri oluşturmak için damar sistemi ayrı ayrı veya tümörle birlikte oluşturulabilir. Damar sistemi endotel hücre (EC) astarı, vaskülogenez ve anjiyogenez gibi üç farklı yöntemle oluşturulabilir. İlk yöntem yaklaşık birkaç yüz mikrometre çapında damar sistemi oluştururken, vaskülogenez ve anjiyogenez yöntemleri in vivo kılcal damarlara daha iyi benzeyen daha dar bir damar lümeni üretme potansiyeline sahiptir (Ngan Ngo et al., 2023). Tümör kitlesinin büyümesi ve metastazı anjiyogenez prosesini gerektirdiğinden bu mekanizmaları daha iyi anlamak

için mikrovasküler ağlara sahip tümör modelleri geliştirilmiştir. Kanser hücreleri herhangi bir dokuyu evreledikten sonra o dokunun damar sistemine dahil olarak dolaşımdaki tümör hücreleri haline gelir. Bu hücreler de vücut boyunca tek hücre veya kümeler halinde dolaşarak damar içinde dolaşan diğer hücrelerle birleşebilirler. Daha sonra da damarda hasar oluşturarak dolaşımdan çıkabilir ve başka bir tümör oluşturabilirler. Bu yüzden vaskülarize ip üzerinde kanser modellerinin geliştirilmesi, kanser metastazının çeşitli aşamalarındaki mekanizmaları aydınlatmak için çok önemli veri kaynağı olarak görülmektedir (Huang & Tu, 2023). Bu avantajlarla birlikte, mikroakışkan vaskülarize ip üzerinde kanser modelleri aynı zamanda terapötik ilaç uygulamaları için de büyük potansiyele sahiptir.

Kim ve ark., endotel ve fibroblastlardan ibaret bir vaskülarize ip üzerinde tümör modeli tasarlamıştır (Kim et al., 2022). Tümörlerin yüksek interstisyel sıvı basıncını taklit eden interstisyel akış, fibroblast tarafından salgılanan moleküllerin endotel kanalına doğru göçüne yardımcı olabilecek bir yönde sağlandığı ve bunun fibroblast kanalına doğru anjiyojenik filizlenmeyi desteklendiği görülmüştür (Liu et al., 2020).

Miller ve ark. HUVEC'lerle birlikte hastadan türetilen renal karsinom hücrelerini ortak kültüre ettiler (Miller et al., 2018). Bu kültürde, endotel çıkışın yakınında daha belirgin anjiyojenik filizler gözlemlendi. Tümörün, çıkışın yakınında yoğunlaşan pro-anjiyojenik salgı salgıladığını düşünülmüştür. .

3B modellere mikroakışkanların dahil edilmesi ip üzerinde vaskülarize karaciğer sistemleri çalışmalarının yapılmasına umut vermektedir. Bu yaklaşım, fizyolojik akış koşulları altında farklı hastalık durumları sırasında endotel hücrelerinin araştırılmasını sağlamaktadır. Bugüne kadar, önceki incelemeler üretim yöntemlerindeki farklılıkları, hepatik ilaç metabolizması ve yanıtını ; (Jang et al., 2019) tartışmıştır. Bununla birlikte, karaciğer hastalıklarının, kullanılan ilaçların vasküler bileşenleri üzerindeki etkisinin veya vasküler bileşenin hastalığın ilerlemesine katkısının kapsamlı bir incelemesi yoktur (zkan et al., 2020).

Son bulgular arteriyelizasyon, sinüzoid kapillerizasyon, hipervaskülarite ve anjiyogenezdeki artışın HCC'da, karaciğerin vasküler sağlığını zararlı hale getirdiğini göstermektedir (Zhu et al., 2011). Endotel hücreli in vitro HCC modellerine ilişkin literatür sınırlıdır. Chiew ve ark. (2015) HepG2 hücrelerinin HUVEC-C3 hücrelerinin

farklılaşmasına ve tübüler yapılar ve çıkıntılar oluşturmaya yol açtığını gösterdi. Ayrıca endotel hücrelerinin, monokültürle karşılaştırıldığında HepG2 ile ortak kültür koşulları altında SU5416, sorafenib, U0126, SP600125, LY294002, SB202190 ve Y27632 gibi anti-anjiyogenik inhibitörlere karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Son olarak ilaca bağlı damar hasarı ve fonksiyon bozukluğu, nitrik oksit ve reaktif oksijen türlerinin aktivitesini artırarak karaciğerdeki homeostatik fonksiyonların düzensizliğine neden olmaktadır (Vairappan, 2015). Karaciğerde biriken ilaçlara bağlı olarak birçok vakada karaciğer hasarı görülmüştür. Ancak endotel hücrelerindeki seçici olmayan hasar iyi araştırılmamıştır (Ma et al., 2012);(Liu et al., 2016). Bu sınırlı alanda Özkan ve ark. farklı doksorubisin dağıtım yöntemlerini test etmek için yeni bir vaskülerize çip üzerinde HCC sistemi kullanmıştır. Özellikle endotel hücrelerinde tedavi etkinliğini ve seçici olmayan hasarı belirlemek için intravenöz (iv) enjeksiyonu ve transarteriyel kemoembolizasyonu (TACE) araştırdılar. Bu çalışma, kan damarı endotel bütünlüğünü sürdürmek için ilaçların TACE yöntemiyle verilmesinin intravenöz enjeksiyondan daha faydalı olduğunu gösterdi.

Çip üzerinde organ ve karaciğer modellerinin çoğu hepatik damar sisteminin rolünü yeterince araştırmamıştır. Her ne kadar ilk mikroakışkan çip üzerinde karaciğer yaklaşık on üç yıl önce tanıtılmış olsa da (Lee et al., 2007) yeni çip üzerinde karaciğer modelleri çok az sayıda ekibin kapsamlı mekanik çalışmaları gerçekleştirmesiyle ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bu modellerin daha fizyolojik bir in vitro ortamda ilaç keşfi için kullanılması, kronik karaciğer hastalıklarına yönelik yeni, hedefe yönelik tedavilerin test edilmesi ve geliştirilmesi için gelecekte daha öğretici bir araştırma aracı sağlayacaktır.

Çalışmamızda, hücresel bileşim, mikroçevresel özellikler, spesifik hücresel roller için mevcut hücre kaynakları dahil olmak üzere karaciğer mikroçevresini tanımayı amaçlıyoruz. Karaciğer kanseri için alınan ksenobiyotikler HCC kanser hücrelerine varmadan önce karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri tarafından oluşturulan hepatik sinüzoidle karşılaşır. Bu bariyer ksenobiyotiklerin kinetiğini ve konsantrasyonunu düzenleme potansiyeline sahiptir. Bu fizyolojik durumu taklit etmek için, akışkan bir platform kullanarak HCC hücreleri ile endotel hücrelerinin birlikte in vitro olarak ikili kültürü gerçekleştirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Çalışmamız boyunca aşağıda tabloda belirtilen cihazlar kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan gereç ve cihazların listesi.

Laminar air flow-Class II	:	Telstar Biovanguard, Tokyo, Japonya
CO ₂ /O ₂ - çok gazlı inkübatör	:	Panasonic MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya
-150°C derin dondurucu	:	Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya
Floresan ataşmanlı inverted araştırma mikroskobu	:	Carl Zeiss Axio Observer D1, Oberkochen, Almanya
Flow sitometri cihazı	:	Agilent Novacyte 3500, Kaliforniya, ABD
Işık mikroskobu	:	Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya
Flow sitometri dizüstü bilgisayar	:	Lenova
Otomatik pipet seti	:	Eppendorf, Research® plus, Hamburg Almanya
Çalkalamalı su banyosu	:	JeioTech BS-11, Seul, Kore
Şarjlı pipetör	:	Rainin PX-100 EU, Kaliforniya, ABD
Kit saklama dolabı (+4/-20°C)	:	Panasonic MPR-414F-PE.

Tablo 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan gereç ve cihazların listesi

-86 dik tip ultra dondurucu	:	Artico ULUF 750-2M
-150 dondurucu	:	Panasonic MDF-C2156VAN-PE
Hassas terazi	:	Kern AEJ-200-4CM
Bilgisayar	:	Lenovo Ideapad 310, Çin
Vakumlu desikatör-pompa	:	ISOLAB Rocker 300
UV LED masking system	:	Kloe UV-KUB2
Peristaltik pompa	:	Bimerton PT-800)
Floresan ataşmanlı araştırma Mikroskobu	:	Leica DM2500, Wetzlar Almanya
3D bioprinter	:	Axolotl Biosystems
3D bioprinter masaüstü bilgisayarı	:	DELL
Masaüstü soğutmalı santrifüj	:	Hettich Rotina 380R, Westphalian, Almanya
Bilgisayar	:	Lenovo Ideapad 310, Çin
Kit Saklama Dolabı (+4/-20°C)	:	ARÇELİK 5231
ELISA Okuyucu	:	BIOTEK ELx808IU
Mikropipet Seti	:	EPPENDORF

Tablo 3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal ve sarfların listesi.

Fetal bovin serum (FBS)	:	FBS-12A,	Capricorn	Scientific,
		Ebsdorfergrund,	Almanya	
Primocin	:	ant-pm-2,	Invivogen,	California, ABD
Stabil glutamin	:	STA-B,	Capricorn	Scientific,
		Ebsdorfergrund,	Almanya	
Dulbecco's fosfat buffer salin	:	PBS-1A,	Capricorn	Scientific,
		Ebsdorfergrund,	Almanya	
Trypsin-EDTA	:	25200056,	Thermo Fisher Scientific,	Gibco,
		Massachusetts,	ABD	
MEM nonessential amino acids	:	NEAA-B,	Capricorn	Scientific,
		Ebsdorfergrund,	Almanya	
Alexa Flour 488 seconder antibody	:	4408S,	Cell Signaling	Technology,
		Massachusetts,	ABD	
Alexa Flour 594 seconder antibody	:	8889S,	Cell Signaling	Technology,
		Massachusetts,	ABD	

3.3. Deney Protokolü

3.3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Bu çalışma yalnızca hücre kültürü ortamında (insan ya da hayvan vücudu dışında) ve ticari olarak satın alınan hücreler ile gerçekleştirildiğinden insan ya da hayvan herhangi bir etik kurul izni gerektirmemektedir. Çalışmamızda kullanılmak üzere Tablo 3.3.'de gösterildiği gibi 2 farklı hücre hattı kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Kullanılan hücreler.

1. Endotelyal hücre hattı: İnsan endotelyal hücre hattı (EA.hy 926)
2. HCC hücre hattı: Karaciğer kanser hücre hattı (HepG2)

3B dinamik kültür ve monolayer statik kültürde kullanılmak üzere tekli EA.hy 926 hücre hattından ve ikili hücre gruplarından (EA.hy 926 ve HepG2) oluşturulmuş deney grupları kullanılmıştır (**Tablo 3.4.**). Biyolojik olayların, örneğin seçilmiş hücrelerin çoğalma, büyüme, migrasyon veya apoptoz gibi biyolojik aktivitelerini izlemek, uygulanmış ilacın etkilerini uzun vadeli olarak değerlendirmek ve ilacın etkinliğini zaman içinde gözlemlemek için deney sürecini 4 gün boyunca gözlemlemeyi planladık. Bu süre zarfında yeterli veri ve analizler toplayarak 1 günlük çalışmalardaki veriler ve analizler arasındaki farklılıkları karşılaştırmakla hücrelerde ne gibi değişiklerin oluştuğunu ortaya çıkarmaya yardımcı oldu.

Tablo 3.3. Tekli EA.hy 926 hücre hattından oluşan deney grupları.

3B dinamik kültür (1. gün)	3B dinamik kültür (4. gün)
i) Kontrol grubu : Membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri	iv) Kontrol grubu: Membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri
ii) Deney grubu : Membranın alt yüzeyini kaplayan ve ilaca maruz bırakılmış endotel hücreleri	v) Deney grubu : Membranın alt yüzeyini kaplayan ve ilaca maruz bırakılmış endotel hücreleri

Monolayer statik kültür (1. gün)	Monolayer statik kültür (4. gün)
i) Kontrol grubu : Membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri	iv) Kontrol grubu: Membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri
ii) Deney grubu : Membranın alt yüzeyini kaplayan ve ilaca maruz bırakılmış endotel hücreleri	v) Deney grubu : Membranın alt yüzeyini kaplayan ve ilaca maruz bırakılmış endotel hücreleri

Tablo 3.4. EA.hy 926 ve HepG2 hücre hücre hatlarının oluşturduğu ikili kültürden oluşan deney grupları.

3B dinamik kültür (1. gün)	3B dinamik kültür (4. gün)
i) Kontrol grubu : Membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri ve üst yüzeyini kaplayan HCC hücreleri	iv) Kontrol grubu Membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri ve üst yüzeyini kaplayan HCC hücreleri
ii) Deney grubu : İlaca maruz bırakılmış olan membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri ve üst yüzeyini kaplayan HCC hücreleri	v) Deney grubu : İlaca maruz bırakılmış olan membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri ve üst yüzeyini kaplayan HCC hücreleri

Monolayer statik kültür (1. gün)	Monolayer statik kültür (4. gün)
i) Kontrol grubu : Membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri ve üst yüzeyini kaplayan HCC hücreleri	iv) Kontrol grubu: Membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri ve üst yüzeyini kaplayan HCC hücreleri
ii) Deney grubu : İlaça maruz bırakılmış olan membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri ve üst yüzeyini kaplayan HCC hücreleri	v) Deney grubu: İlaça maruz bırakılmış olan membranın alt yüzeyini kaplayan endotel hücreleri ve üst yüzeyini kaplayan HCC hücreleri

3.3.2. Hücrelerin temin edilmesi, çözündürülmesi ve kültüre edilmesi

Çalışmamızın esas amaçlarından biri, insan karaciğer kanserinin antikanser ilaca maruz kalma durumunun taklit edilmesi olduğu için, karaciğer sinusoidini oluşturan hücrelerden biri olan endotel (EA.hy926) ve HCC (HepG2) hücrelerini kullanarak deneylerimizi gerçekleştirdik.

3.3.2.1. Endotel hücre hattının kültür edilmesi

Endotel hücre hattı olarak kullanılan EA.hy926 (ATCC CRL-2922 Manassas, ABD) hücre hattı ticari olarak temin edilmiştir. Soğuk koşullarda bekletilen hücreler uygun kültür koşullarında çözülerek ve 125xg'de 5 dakika santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edilmiştir. Hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen hücre pelletine Tablo 3.6.'da belirtilen içeriklere sahip besiyeri ile eklenerek süspansiyon edilmiştir.

Tablo 3.5. Hücre kültür besiyerinin içeriği

DMEM High Glucose without L-Glutamine, with Sodium Pyruvate
Stable Glutamine (L-Alanyl-L-Glutamine Solution 200 mM, Capricorn)
FBS(FBS-11A, Capricorn)
HEPES
MEM
PRİMOCİN

Besiyerinde homojenize olan canlı hücrelerin sayısının tespit edilmesi için hücreli besiyeri solüsyonu ve tripan mavisini 1:1 oranında olacak şekilde süspanse edilerek Thoma laminasının yardımı ile sayılmıştır. Hücrelerin canlılık oranı gözlemlendikten sonra hücre solüsyonu T75 kültür flasklarına ekilmiştir. Ardından hücrelerin %5 CO₂'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37°C'lik ortamda kültüre edilmesi için inkübatöre alınmıştır. Hücreler yeterli çoğunluğa ulaşana kadar 2 günde bir besiyeri yenisi ile değiştirilmiştir. Mikroskopta kontrol sırasında %70 çoğalma oranına sahip olduklarında pasaj işlemi gerçekleştirilerek yeni T75 kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücrelerin pasajlanması için öncelikle ölü hücreleri veya atıkları uzaklaştırmak için yıkama işlemi Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat tamponu (PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi ardından hücreler 1 mL Tripsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) enziminin yardımı ile 2 dakika boyunca 37°C'lik inkübatöre alınarak muamele edilmiştir. Hücrelerin kültür kabının tabanından ayrıldığından emin olduktan sonra PBS ile tripsin inaktifleştirilmiştir. Bu işlem sırasında kültür kabındaki hücreler fosfat tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Ardından 15ml'lik tüplere toplanan solüsyon 125xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem sırasında hücrelerin yeniden kültürlenmesi için besiyeri eklenmiş kültür flasklarına ekimi yapılarak %5 CO₂'lik inkübatörde inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin dondurma işlemi sırasında santrifüj sonrasında supernatantı atılan hücre pelletleri +4°C 'de bekletilen dondurma besiyeri (Tablo 3.7) ile sulandırıldıktan sonra her kriyovialde en fazla 3 milyon hücre olacak şekilde -150°C (Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) derin dondurucu muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.6. Hücre dondurma besiyerinin içeriği.

%60 DMEM(DMEM High Glucose (4,5 g/l), without L-Glutamine, with Sodium Pyruvate)
%35 FBS(FBS-11A, Capricorn)
%5 DMSO

3.3.2.2. HCC hücre hattının kültür edilmesi

İnsan hepatoselüler karsinom hücre olarak çok yaygın kullanılan HepG2 (HepG2, Sigma Aldrich 85011430, Filadelfiya, ABD) hücre hattı ATCC'den ticari olarak temin edilmiş çalışmalarda kullanılması için gerekli sayı elde edilene kadar çoğaltılmıştır. Öncelikle kriyoviyalde donmuş şekilde getirilen hücreler %10 fetal sıgır serumu (FBS-11A, Capricorn, ABD), %1 primocin (İnvivogen, California, ABD) ve %1 stabil L-glutamin (Stable Glutamine (L-Alanyl-L-Glutamine Solution) içeren DMEM (DMEM High Glucose (4,5 g/l), without L-Glutamine, with Sodium Pyruvate) den ibaret besiyeri ile 15ml'lik santrifüj tüpüne aktarılarak 200xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra hücrelerin üzerinden süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen hücre pelletine Tablo 3.6'de belirtilen içeriklerden oluşan hücre kültür besiyeri eklenerek süspanse edilmiştir. Süspansiyonda olan hücrelerin canlılık oranının tespiti için hücreli besiyeri solüsyonu ve tripan mavisi (Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya) ile eşit oranlarda (1:1 oranında) karıştırılarak Thoma lamının yardımı ile sayılmıştır. Canlılık oranı belirlendikten sonra hücre sayısına ve hücre tipine önem verilerek T25 kültür flasklarına hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Ardından hücrelerin %5 CO₂'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37°C'lik ortamda inkübe edilmesi için inkübatöre alınmıştır. Mikroskopta kontrol sırasında %70 çoğalma oranına sahip olduklarında pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çoğunluğa ulaşana kadar hücrelerin 2 günde bir besiyeri yenisi ile değiştirilmiştir. Hücrelerin pasajlanması için öncelikle ölü hücreleri veya atıkları uzaklaştırmak için işlemi fosfat tamponu (Ca, Mg içermeyen PBS) yardımı ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından 2 dakika boyunca 37°C'lik inkübatöre hücreler 2 mL Tripsin-EDTA enzimi muamele edilmiştir. Kullanılan enzimin inaktivasyonu için PBS kullanılarak 2 kez yıkama gerçekleştirilmiştir. Ardından 15ml'lik santrifüj tüplerine toplanan solüsyon 200xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemin ardından hücrelerin yeniden kültürlenmesi için besiyeri eklenmiş kültür flasklarına ekimi yapılarak %5 CO₂'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37°C'lik inkübatörde inkübasyonu

gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin dondurma işlemi sırasında santrifüj sonrasında supernatantı atılan hücre pelletleri +4°C’de bekletilen dondurma besiyeri (Tablo 3.7.) ile sulandırıldıktan sonra her kriyovialde en fazla 3 milyon hücre olacak şekilde -150°C (Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) derin dondurucu muhafaza edilmiştir.

3.3.3. MTT analizi ile Siklofosfamid’in IC50 değerinin belirlenmesi

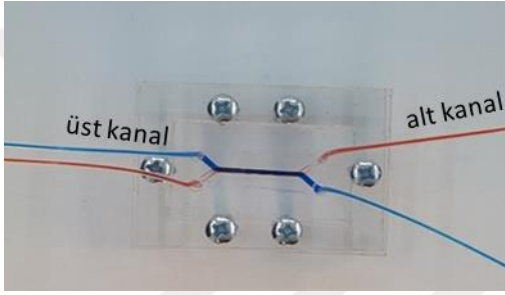
Üremesini devam ettiren canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi için 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizde suda çözünür tetrazolyum tuzları hücre içerisinde metabolize edilerek suda çözünmez formazan kristallerine dönüşmektedir. Elde edilen formazan kristallerinin DMSO içinde çözünmesini takiben spektrofotometrik ölçümlerle elde edilen renk yoğunluğu çoğalan canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT çalışmaları için, 96 kuyucuklu plakaların her bir gözüne 9.3×10^3 EA.hy.926 ve $23,2 \times 10^3$ HepG2 hücreleri olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Deney gruplarından ikili için bu hücre sayılarının yarısı, tekli endotel hücreleri için ise belirtilen sayı kullanılarak kültüre edilmiştir. Hücrelerin tutunması için 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından besiyeri uzaklaştırılarak, ilaç grupları için ayrılmış kuyucuklara 100 µL içinde ve 1,5 mM ve 3mM konsantrasyonunda CP ilacı eklenmiştir. CP ilacı eklendikten 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki ilaç içeren ve kontrol gruplarındaki hücrelerde ise ilaçsız besiyeri uzaklaştırılarak, her bir göze 10 µL MTT (5 mg/mL, PBS içerisinde) ve 90 µL serumsuz yeni besin ortamı eklenmiştir. Örnekler 37°C’de 3 saat inkübe edildikten sonra, üzerlerindeki MTT içeren ortam uzaklaştırılmış ve her göze 100 µL DMSO çözeltisi eklenmiştir. Monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, Vermont, ABD) 570 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.3.3.1. Siklofosfamidin hazırlanması

Toz halde ticari olarak temin edilerek 0,5 molar derişime sahip olan Siklofosfamid’ten 28 mg tartılıp 1000 µL DMSO’da çözülmüştür. DMSO’nun %0,2’lik toksik dozu göz önünde bulundurularak ana stok hazırlanmıştır. Ana stok -20°C’de muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılmak üzere 1.5 mM derişimli siklofosfamid dozları ara stoklar kullanılmıştır (Ferrari & Rasponi, 2021) .

3.3.4. 3B karaciğer çipinin üretimi

Karaciğer çipi üretimi için polidimetilsiloksan (PDMS) mikrokanalları alt ve üst mikrokanalları olacak şekilde yumuşak litografi tekniği kullanılmıştır. Dikdörtgen mikrokanallar yaklaşık 25 mm uzunluğunda, 1 mm genişliğinde ve 200 mikron yüksekliğinde olup, litografi yöntemi ile üretilmiştir. Alt mikrokanalın boyutları $Y \times G \times U = 200 \mu\text{m} \times 1 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ ve üst mikrokanalların boyutları $Y \times G \times U = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ olarak tasarlanmıştır. Sadece hücrelerle kaplı mikrokanallar alanının uzunluğu 15mm olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu alana, alt kanalı endotel hücreleri, üst kanalı HCC hücreleri kaplayacak şekilde planmış olan PET membran yerleştirilmiştir.

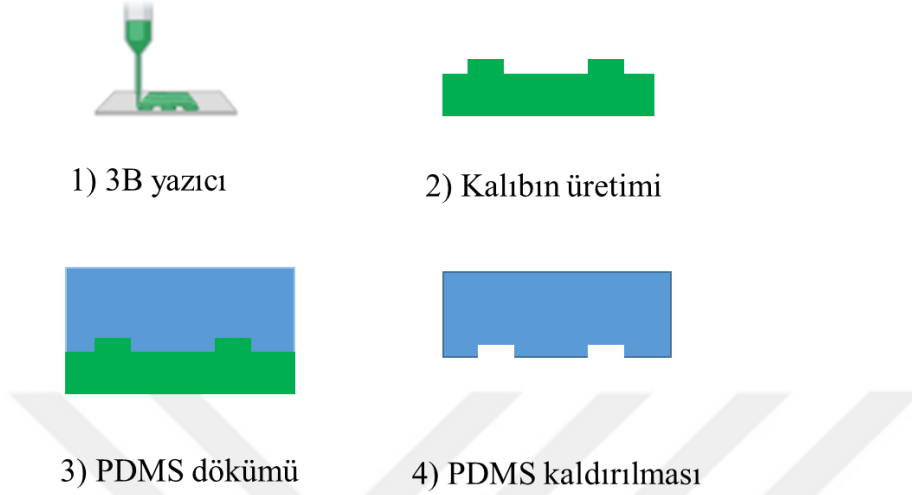


Şekil 3.1. Mikroakışkan çip tasarımı.

Mikrokanalların boyutu 3B yazıcı kullanılarak tasarlandıktan sonra, kopya kalıplama yöntemi kullanılarak Polidimetilsiloksan (PDMS) mikrokanalları yapılmıştır. Autocad programı ve 3B yazıcı kullanılarak basılan kalıplara PDMS dökülerek mikrokanallar üretilmiştir. PDMS çiplerde gerekli olan giriş ve çıkış delikleri, kalıpları üretirken 4 adet direklerin tasarlanması sayesinde gerçekleştirilmiştir. Kalıplar yazıcı platformundan çıkarılarak alt ve üst PDMS mikrokanalı ayrı olmak şartıyla dikdörtken şekilde kesilmiştir.

Yapılan çizimin baskılanması için çizimi AutoCAD programı kullanılarak “.stl” formatında kaydettikten sonra “.ctb” formatına çevrilmiştir. Ardından “.ctb” formatına sahip dosya ile 3B yazıcı kullanılarak kalıplar üretilmiştir. Polidimetilsiloksan (PDMS), karıştırıcı kabında karıştırıcı yardımı ile 9:1 oranında silikon elastomer ve çapraz bağlayıcı maddesi ile hazırlanmıştır. Dikkatlice kalıbın yüksekliğini taşımayacak seviyeye gelene kadar karışım kalıba dökülmüştür. Karışımın homojen olması için karıştırıldığı sırada oluşan hava kabarcıklarını gidermek için desikatöre yerleştirilmiştir. Hava kabarcıklarının uzaklaştırılmasının

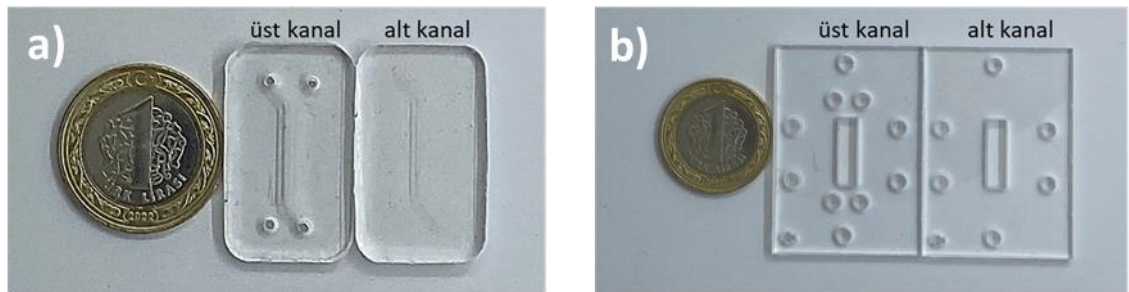
ardından PDMS'in polimerizasyonun tamamlanması için, desikatörden çıkarılarak 2 saat boyunca 75°C'de ısıtıcıda bekletilmiştir. PDMS tamamen polimerize edildikten sonra PDMS çipleri kalıplardan çıkarılmıştır.



Şekil 3.2. PDMS'in hazırlanmasının şematik görüntüsü.

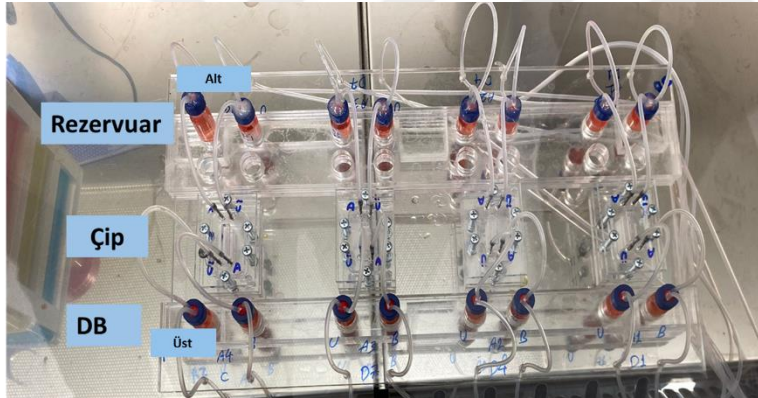
Çiplerin kenar kısımları kesilerek cam kaplara kanal kısımları yukarı bakacak şekilde yerleştirildi ve önce alkol (%70 etanol) ile ardından steril distille su ile yıkama gerçekleştirilerek azot gazı ile kurutulmuştur.

Çiplerin temizlik aşaması bittikten sonra temiz bir Petri kabına konularak, steril ortam sağlayan laminar hava akışlı kabinde, 30 dakika boyunca ultraviyole ışık (UV) cihazının içine yerleştirilerek UV uygulandı. UV bittikten sonra çipler deney için hazır hale getirilmiştir. İki PDMS kanalı alt ve üst kanalların bir-birinin üzerine gelecek şekilde kapatılarak sızıntıyı önlemek ve çipi daha dayanıklı hale getirmek için vidalarla bir birine bağlanan 2 şeffaf PMMA ile desteklenmiştir.



Şekil 3.3. Hazırlanmış biyomalzemelerin üstten görünümü. a) PDMS, b) PMMA.

Kültür ortamının etkili bir şekilde sürekli perfüzyonunu sağlamak için çiplere ve peristaltik pompaya bağlanan şeffaf hortumlar ile 0.7 µl/dakika akış hızı uygulanmıştır. Mikrokanallardaki hücrelerin yaşaması ve hücre salgılarının toplanması için cam tüp kullanılmıştır. Çip sistemlerinde akış sırasında peristaltik pompa kaynaklı hava kabarcıkları hortumlarda oluşmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda kullandığımız cam tüplerden bazıları bu hava kabarcıklarını gidermek için kullanılmıştır. Kabarcıklar peristaltik pompa kaynaklı akış ile tüplerdeki besiyerinin yüzeyine doğru hareket etmektedir. Hortumların ucuna birleştirilen uzun pinlerin sayesinde kabarcıksız besiyeri hortumların yardımıyla çipe doğru hareket etmektedir. Şekil 3.4.'te görüldüğü gibi çip platformumuzda 2 adet rezervuar (alt ve üst kanal için) ve 2 adet kabarcık giderici (alt ve üst kanal için) cam tüp bulunmaktadır. Peristaltik pompa ile besiyerinin akışı rezervuardan kabarcık gidericiye (bubble trap) doğru, kabarcıklardan arındırılmış ve kabarcık gidericiden çıkan besiyeri çipe doğru hareket etmektedir.



Şekil 3.4. Çip platformunun yukarıdan görünümü.

3.3.5. Çip üstü karaciğerde 3B dinamik kültürün oluşturulması ve karakterizasyonu

3.3.5.1. Kaplaması gerçekleşen membrana hücre ekimi

Çift kanallı cihaz için ticari olarak temin edilebilen transwelllerden elde edilen membran polietilentereftalattan (PET) yapılmıştır ve yaklaşık 10 µm kalınlığında ve yaklaşık 0,4 µm gözenek boyutundadır. PET membranın alt ve üst yüzeyine, kollajen (0,2 mg/ml) ve fibronektin (çip çalışmaları, örneğin Emulate'in kullandığı konsantrasyonlar temel alınmıştır) eklenerek 2 saat boyunca %5 CO₂'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37°C'de inkübatörde kaplanması sağlanmıştır. Ardından

çalışmamızda endotel hücreleri, HCC ve endotel hücrelerinin kombinasyonu kullanılmıştır. Hücreler önce hücre kültürü kaplarında %70 civarında çoğunluğa gelene kadar %5 CO₂/95 nemlendirilmiş inkübatörde 37°C'de inkübe edilmiş, ardından farklı deney grupları için kullandığımız membranlara uygun olarak tek taraflı endotel hücreleri ve alt tarafı endotel, üst tarafı HCC hücreleri olacak şekilde ekimi sağlanmıştır. Her hücre ekimi 1 gece inkübasyon süresine tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi tamamlandıktan in-verted ışık mikroskopunda hücrelerin membranda homojenize şekilde dağılımı kontrol edildikten, mikroakışkan yonganın kapatılması sırasında kanalları kaplaması için istenilen boyuta getirilip, iki PDMS mikrokanalı arasına yerleştirilmiştir. İki PDMS kanalı daha sonra alt ve üst kanallar bir-birinin üzerine gelecek şekilde kapatıldıktan sonra sızıntıyı önlemek ve çipi daha dayanıklı hale getirmek için vidalarla birbirine bağlanan 2 PMMA ile desteklendi. Mikrokanalların girişler ve çıkış noktaları, PDMS kopya kalıplamadan sonra açılan delikler aracılığı ile oluşturuldu. Kültür ortamının etkili bir şekilde sürekli perfüzyonunu sağlamak için ikili mikrokanal peristaltik pompaya bağlanarak ve 0.7 µl/dakika akış hızı uygulandı. Mikrokanallardaki hücrelerin yaşaması ve hücre salgılarının toplanması için cam tüp kullanılmıştır.

3.3.6. CP etkisinin fonksiyonel analizlerle belirlenmesi

3.3.6.1. Flow sitometri yöntemi ile CP'nin hücrelere olan etkisinin değerlendirilmesi

EA.hy 926 endotel hücrelerinde , bu hücrelere özgü transmembran proteini olan CD142 proteinin karakterizasyonu için flow sitometri analizi gerçekleştirildi. Öncelikle hücreler Tripsin-EDTA ile süspanse edilerek 125xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelletin üzerine 100 µL bağlama solüsyonu (Binding Buffer) (%2 FBS'li PBS) ve 1 µL CD142 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD) antikoru eklendi. Ardından deney grupları 45 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 1 mL PBS eklenerek 500xg'de 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda pellete 200 µl bağlama solüsyonu eklendi. Bu sırada 50 µl solüsyondan ayrılarak boyanmamış grup(unstain) olarak kullanılmak amacıyla başka bir tüpe aktarıldı. Geri kalan solüsyona 1 µL ALEXA FLUOR 488 eklendi ve 45 dakika boyunca +37°C'de inkübe edildi.İnkübasyon süresinin ardından tüm deney gruplarına 300 µL PBS eklenerek flow sitometri (NovoCyte, Agilent, Palo Alto, CA, USA)

cihazında okutulması gerçekleştirildi. Deney sırasında analizin gerçekleştirilmesi için NovoExpress software programı kullanıldı.

3.3.7. Canlı /Ölü boyama yöntemi ile hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığını niteliksel olarak değerlendirmek için memeli hücre kültürüne yönelik bir Canlı/Ölü boyama kiti (L3224, ThermoFisher,Paisley, ABD) kullanılmıştır. Kit, sırasıyla canlı ve ölü hücrelerle temas halinde farklı floresan sinyaller sergileyen kalsein AM ve etidyum homodimer çözeltilerinden oluşmaktadır. Kalsein AM (asetoksimetil ester), hücre içi esterazlar tarafından kalseine bölünebilen, floresan olmayan, hücreye nüfuz eden bir bileşiktir. Kalsein bölündükten sonra hücrede kaldığı için 495/515 nm civarında uyarılma/emisyon zirveleri ile floresan ışık verir. Boyanın bölünmesi hücre içi ürünlere bağlı olduğundan ve bölündükten sonra hücre içinde kaldığından dolayı membran bütünlüğünün ve hücre canlılığının bir göstergesi olarak kullanılıyor. Karşıt boyası olarak sayılan etidyum homodimer-1 (EthD-1), membrandan geçirgen olmadığından dolayı, yalnızca hücre membranı hasarlı olan ölü hücrelere girer onları boyar (Pasricha & Sachdev, 2017).

3.3.7.1. Monolayer statik kültürde canlı ölü boyama

Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.'de belirtilen deney gruplarına göre 12 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler 24 saat inkübatöre alınarak, uygun sıcaklık, nem ve CO₂ ortamında tutunmaları sağlanmıştır. Hücreler, %70 konflüensiye ulaştıklarında belirli bir yoğunluğa erişmiş oldukları için hücrelerin çoğalma sırasında oluşan atıkları ve ölü hücreleri uzaklaştırmak için eski besiyeri uzaklaştırılmıştır. Belirlenen gruplara 1.5 mM CP uygulanarak 24 ve 96 saat boyunca inkübasyonu sağlanmıştır. Bu sürecin sonunda hücrelerin üzerinden besiyeri çekilerek 1 kez PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. İlaç uygulanmış ve uygulanmamış deney gruplarına Canlı/Ölü boyası eklenerek 30 dakika boyunca inkübatörde inkübasyonu sağlanılmıştır. İnkübasyonun ardından boyama sayesinde canlı veya ölü olarak boyanan hücreler floresan mikroskop (CARL ZEISS AXIO OBSERVER D1, Oberkochen, Almanya) ile görüntülemeye tabi tutulmuştur.

3.3.7.2. Dinamik kültür sonrasında Canlı/Ölü boyama

Mikroakışkan çipte Tablo 3.5.'de belirtilen deney gruplarına göre, hücrelerin 24 ve 96 saat boyunca inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. İncelenen süre sonunda, pens yardımıyla mikroakışkan chipin PDMS tabakaları arasından çıkarılan PET membran

üzerindeki hücreler Canlı/Ölü boyama için hazır hale getirilmiştir. Hücrelerin üzerindeki ölü hücreleri uzaklaştırmak için 1 kez fosfatlı tampon çözeltisi (PBS) ile yıkama yapılmıştır. Membran üzerine Canlı/Ölü boyası eklenmiş ve 30 dakika boyunca %5 CO₂'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37°C'de inkübatöre alınarak inkübasyonu sağlanılmıştır. Inkübasyonun ardından, boyama sayesinde canlı veya ölü olarak boyanan hücreler, floresan mikroskop (CARL ZEISS AXIO OBSERVER D1, Almanya) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.3.8. CP'nin etkisinin IF işaretleme yöntemi ile belirlenmesi

Deney gruplarına uygulanan CP'nin vasküler hücre belirteci olan CD31 antikorunun ekspresyonuna yaptığı değişikliği göstermek için immüno floresan işaretleme analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3.8.1. Monolayer statik kültürde İF işaretleme

Deney hücre grupları 12 kuyucuklu plakalarda yuvarlak cam lameller üzerine ekilerek 24 saat inkübatörde inkübasyonu sağlandı. Yeterli sayıya ulaştıklarında ilaç uygulanması planan deney gruplarının üzerinden eski besiyeri uzaklaştırılarak 1.5 mM konsantrasyonunda CP 1 mL DMEM High besiyeri içerisinde uygulandı. Ardından 24 ve 96 saat boyunca inkübatörde inkübasyonu sağlandı. Kontrol deney gruplarına ise CP uygulanmadı. Inkübasyon süresinin sonunda her kuyucuktan besiyeri çekilerek ölü hücreler uzaklaştırıldı ve 2 kez için PBS(Ca⁺ Mg⁺) solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Oda sıcaklığındaki %4 paraformaldehitte 20 dakika boyunca +4°C'de hücrelerin fiksasyonu sağlandı. İşlem sonrasında paraformaldehid PBS(Ca⁺ Mg⁺) ile yıkanarak uzaklaştırıldı. CD31 antikorunun EA.hy 926 hücrelere bağlanmasını engelleyen nonspesifik bağlantıları önlemek amacıyla hücreler bloklama solüsyonu ile 20 dakika boyunca oda sıcaklığında muamele edildi. Sürenin sonunda bloklama solüsyonu örnekler üzerinden aspire edilerek primer antikor CD31 (Cell Signaling, Massachusetts, ABD) antikor seyreltme çözeltisi içerisinde örneklerin üzerine eklenerek 16-18 saat boyunca +4°C'de karanlık ortamda bekletilmiştir. Süre sonunda primer antikorun uzaklaştırılması için PBS (Ca⁺ Mg⁺) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ertesi sabah oda sıcaklığında örneklerin üzerinden primer antikor aspire edilerek PBS ile yıkandı. Kullanılan primer antikora özgü olarak seçilen Alexa Flour-594 (kırmızı) (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD) sekonder antikorları antikor seyreltme çözeltisi içerisinde hücrelerin üzerine eklenerek oda

sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat boyunca inkübe edildi.İnkübasyonun ardından hücrelerden sekonder antikorun uzaklaştırılması için 3 kez PBS ile yıkandı. Nukleus belirteci olan DAPI kullanılarak boyama yapıldıktan sonra floresan mikroskopta (CARL ZEISS AXIO OBSERVER D1, Almanya) görüntüleme aşamasına geçildi.

3.3.8.2. 3B dinamik kültür sonrası İF işaretleme

Belirlenen deney gruplarına göre kurulumu gerçekleşen mikroakışkan chipin 24 ve 96 saat inkübasyon süresi sonucunda PET membrana tutunan hücrelerin İF boyamasını yapmak için membranın 2 PDMS tabakası arasından pens yardımı ile dikkatlice çıkarılması gerçekleştirildi. Ardından ölü hücreleri uzaklaştırmak için 1 kez fosfatlı tampon çözeltisi (PBS) ile yıkama yapıldı. Yıkama işleminden sonra membran %4 paraformaldehit içeren çözelti ile 20 dakika boyunca +4°C'de fiksede edilmiştir. Fiksatif çözeltisi, fosfatlı tampon çözeltisi (PBS) içerisinde (Ca⁺ Mg⁺) yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Nonspesifik bağlanmaları önlemek amacıyla hücreler, bloklama solüsyonu ile 20 dakika boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Bloklama sonrasında, CD31 antikor,antikor seyreltme çözeltisi içinde hücrelere eklenerek 16-18 saat boyunca +4°C'de karanlık ortamda bekletilmiştir. Primer antikorun uzaklaştırılmak için PBS (Ca⁺, Mg⁺) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Alexa Fluor-594 (kırmızı) sekonder antikor, antikor seyreltme çözeltisi içinde hücrelere eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücrelerden sekonder antikorun uzaklaştırılmak için 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Nukleusları belirlemek için DAPI kullanılarak boyama yapılmıştır. Son olarak, boyanmış örnekler floresan mikroskop (CARL ZEISS AXIO OBSERVER D1, Almanya) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

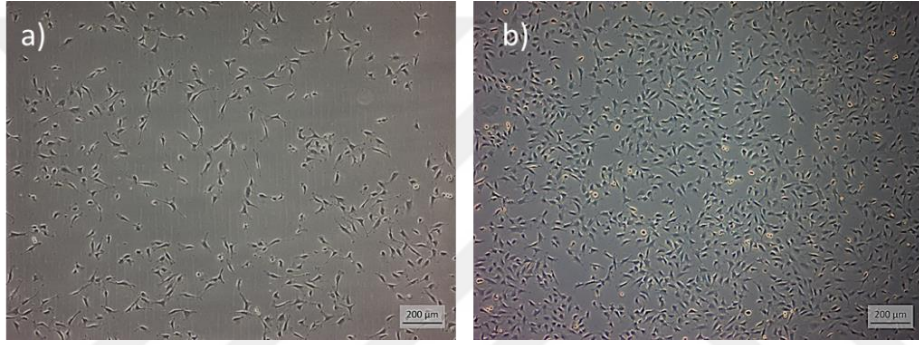
Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri GaphPad Prism 10 yazılımı kullanılarak yapıldı. Deney süresince grupların etkileşimli etkilerini değerlendirmek için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Anlamlılık düzeyleri gruplar arasında *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ve ****p<0,0001 olarak gösterildi.

4. BULGULAR.

4.1. Hücre Karakterizasyonları

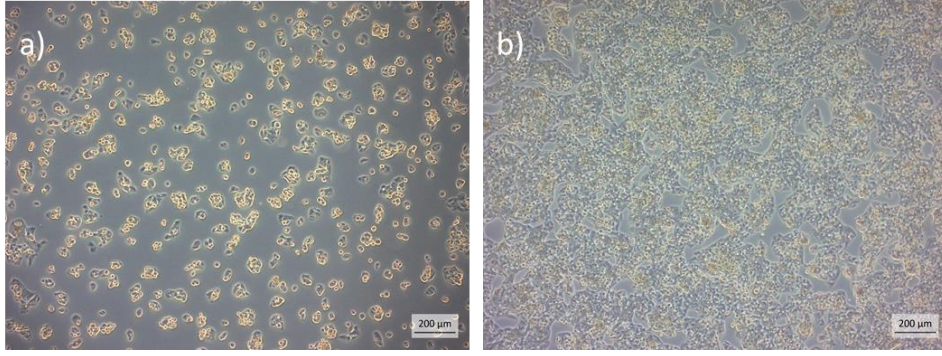
4.1.1. İnsan HCC ve endotel hücrelerinin çözülmesi ve kültürü

Çözüldükten sonra kültür kabında kültür edilen ve mikroakışkan çipte alt kanalda kullanılmak üzere olan insan EA.hy 926 hücre hattı, faz-kontrast mikroskobu ile günlük olarak mikroskopik (Carl Zeiss Axio Observer D1, Oberkochen, Almanya) görüntüleri alındı. Mikroskop altında incelenen hücrelerin morfolojileri incelendiğinde EA.hy 926 hücrelerinin epitelyal görünüme sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.1).



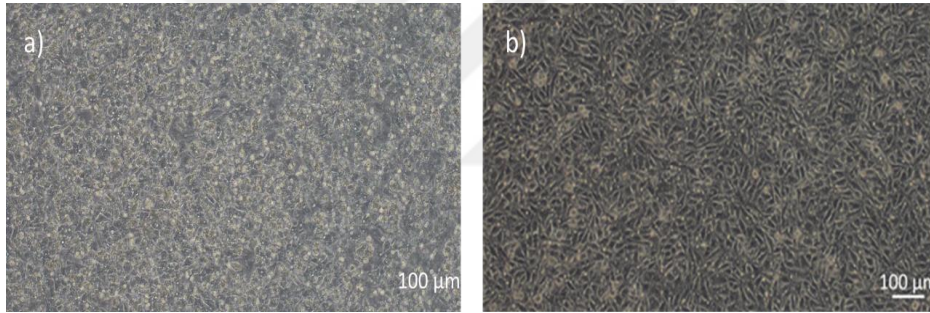
Şekil 4.1. İnsan endotel hücre hattının (EA.hy926) kültüre alındıktan sonra faz-kontrast mikroskop görüntüleri. (a) Kultüre alındıktan 1 gün sonra EA.hy 926 hücreleri, P3. (b) Kultüre alındıktan 2 gün sonra EA.hy 926 hücreleri P3, ölçek çubuğu 200 µm.

Mikroskop altında incelenen HCC hücre hattı mikroakışkan çipte üst kanalda kullanılmak üzere önce kültür kabında kültür edilmiş ve günlük olarak mikroskopik (Carl Zeiss Axio Observer D1, Oberkochen, Almanya) görüntüleri alınmıştır. Mikroskop altında incelenen HepG2 hücrelerinin de epitelyal görünüme sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Karaciğer HCC hücre hattının (HepG2) kültüre alındıktan sonra faz-kontrast mikroskop görüntüleri (a) Kültüre alındıktan 1 gün sonra HepG2 hücreleri, P3. (b)Kültüre alındıktan 3 gün sonra HepG2 hücreleri P3. Ölçek çubuğu: 200 µm.

İç yüzeyi endotel, dış yüzeyi HCC hücrelerle kaplanarak, hücrelerin membrana tutunması sağlanmış ve 3B dinamik kültürde kullanılmadan önce monolayer statik kültürde mikroskop altında görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İç ve dış yüzeyine hücrelerle kaplaması yapılan PET membranın kültürü sırasında çekilen faz-kontrast mikroskop görüntüleri (a) İç yüzeyi EA.hy926 hücreleri, dış yüzeyi HepG2 hücreleri ile kaplanmış membran görüntüsü. (b) Sadece iç yüzeyi EA.hy 926 hücreleri ile kaplanmış membran görüntüsü. Ölçek çubuğu: 100 µm

4.2. Sitotoksite Analizi

4.2.1. MTT analizi ile hücre canlılığının belirlenmesi

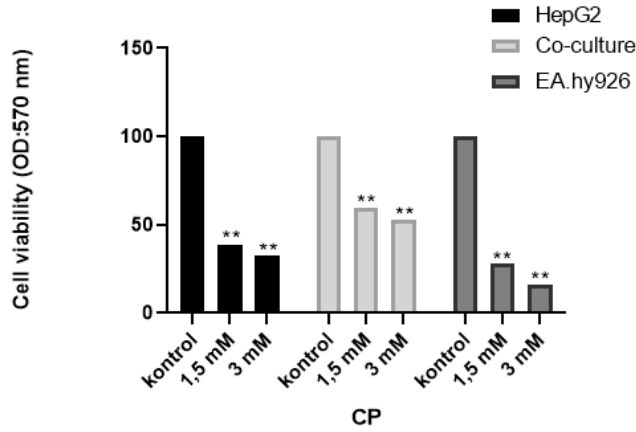
Siklofosamid ilacının EA.hy926, HepG2 hücreleride sitotoksik etkisini değerlendirmek için 24 saat boyunca MTT canlılık analizi gerçekleştirildi. Hücre canlılığına bağlı olarak oluşan renk değişimleri 570 nm’de okutuldu. Hücreler belirlenen doz aralıklarında (1, 10, 50, 100, 500 µM) Siklofosamid ilacı ile 24 saat

inkübe edildi. Yapılan çalışmanın verileri Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Çalışmanın sonucunda karaciğer kanser hücrelerine uyguladığımız en yüksek dozun HepG2 hücreleri için IC50 değerine diğer dozlara göre daha yakın sonuç verdiği görüldü (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. Siklofosfamid'in HepG2 (sol) ve EA.hy926 (sağ) hücrelerine 24 saatlik etkisinin incelenmesi.

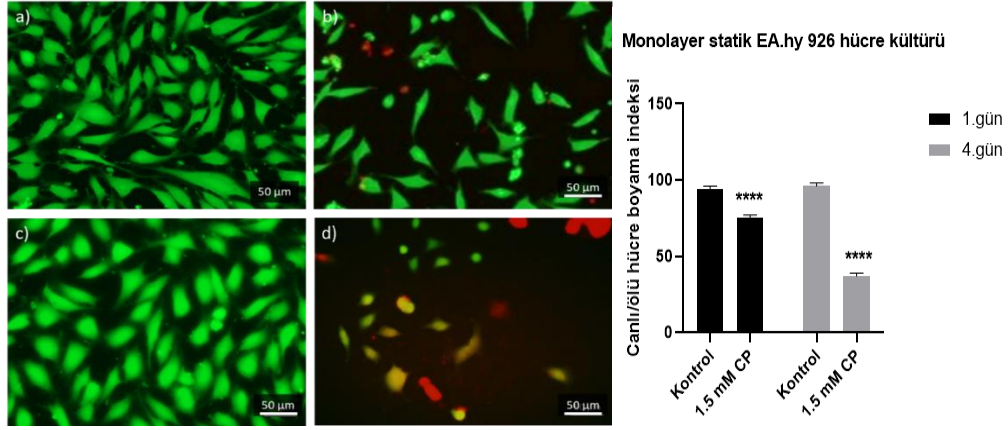
Bu sebeple, karaciğer kanser hücrelerinin daha az canlılık gösterdiği dozu belirlemek için doz aralıklarını genişleterek 1.5 ve 3mM CP konsantrasyonlarından oluşan MTT analizi gerçekleştirildi. MTT analiz sonucunda kanser hücrelerinin canlılığını azaltan dozun 3mM olduğu belirlendi. 3mM CP konsantrasyonuna göre çip kurulumu gerçekleştirildikten sonra Canlı/Ölü boyama sırasında deney gruplarında (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'da 3B dinamik kültür deney grupları) hücrelerin öldüğü tespitine dayalı olarak çalışma sırasında uygulanması için 1.5mM dozun kullanılması anlamlı bulundu (**p<0.001).



Şekil 4.5. Siklofosfamid'in konsantrasyonlarının HepG2, EA.HY 926 ve İkili kültür hücrelerinde 24 saatlik MTT analizi sonrası canlılık verileri. (n=3. **p<0.001).

4.1.3. Canlı/Ölü boyama ile hücre karakterizasyonu

EA.hy 926 hücreleriyle Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.'te belirtilen hücre gruplarına 1.5 Mm olacak şekilde 24 ve 96 saat süreyle siklofosfamid ilacı uygulanmıştır. Hücrelerin canlı/ölü analiz sonucundaki durumları ZEISS Axio Observer D1 zıt faz mikroskopta floresan görüntülenerek 24 saat sonucunda ilacın endotel hücrelerinin canlılığını kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %20 oranında, 96 saat sonucunda ise %70 oranında azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

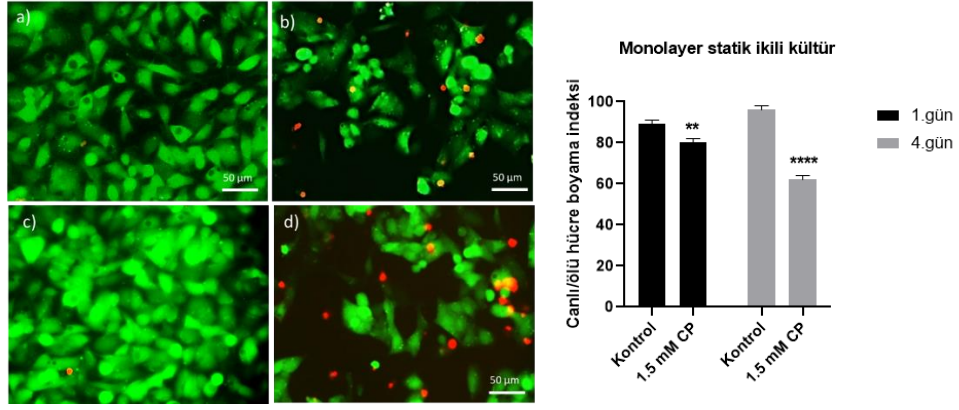


i)

ii)

Şekil 4.6. i) Canlı /Ölü boyama işaretleme yöntemi ile monolayer statik kültürü yapılan EA.hy 926 hücre kültürüne CP uygulandıktan ve CP uygulanmadıktan sonra çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri. CP uygulandıktan 24 saat sonra (b) ve 96 saat sonra (d) ikili hücre kültürünün görüntüleri . Ölçek çubuğu:50 µm. ii) 1. ve 4. gün monolayer statik kültür sırasında Canlı/Ölü boyama analizi ile ilaç uygulanmış ve kontrol grupları arasında EA.hy 926 hücrelerinin canlılık oranında azalma gözlemlendi. (n=3, ****p<0.0001).

EA.hy 926 hücreleri ve HepG2 hücrelerinden oluşan Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.'te belirtilen hücre gruplarına 3 mM olacak şekilde 24 ve 96 saat süreyle siklofosfamid ilacı uygulanmıştır. Hücrelerin Canlı/Ölü analiz sonucundaki durumları ZEISS Axio Observer D1 zıt faz mikroskopta floresan görüntülenmiştir (Şekil 4.6).

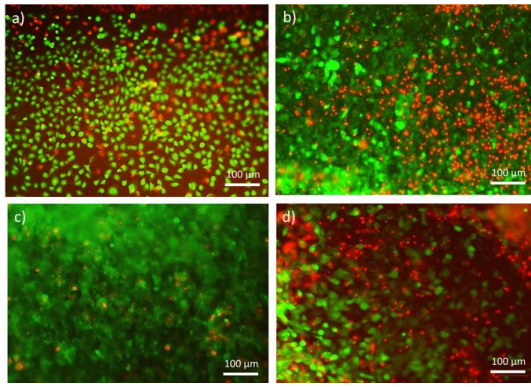


i)

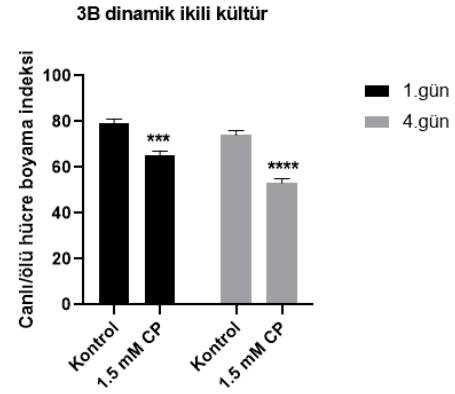
ii)

Şekil 4.7. i) Canlı /Ölü boyama işaretleme yöntemi ile monolayer statik kültürü yapılan İkili hücre kültürüne CP uygulandıktan ve CP uygulanmadıktan sonra çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri. CP uygulanmamış ikili hücre kültürünün 24 saat(a) sonra alınmış ve 96 saat(c) görüntüleri. CP uygulandıktan 24 saat sonra (b) ve 96 saat sonra (d) ikili hücre kültürünün görüntüleri. Ölçek çubuğu: 50 µm **ii)** 1. ve 4. gün monolayer statik kültür sırasında Canlı/Ölü boyama analizi ile ilaç uygulanmış ve kontrol grupları arasında hücrelerin canlılık oranında azalma gözlemlendi. (n=3, **p<0.01, ****p<0.0001).

EA.hy 926 hücreleri ve HepG2 hücreleri ile oluşan Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.'te belirtilen ikili hücre gruplarına 1.5 mM CP 24 ve 96 saat süreyle siklofosfamid ilacı uygulanmıştır. Hücrelerin Canlı/Ölü analiz sonucundaki durumları ZEISS Axio Observer D1 zıt faz mikroskopta floresan görüntülenmiştir (Şekil 4.7).



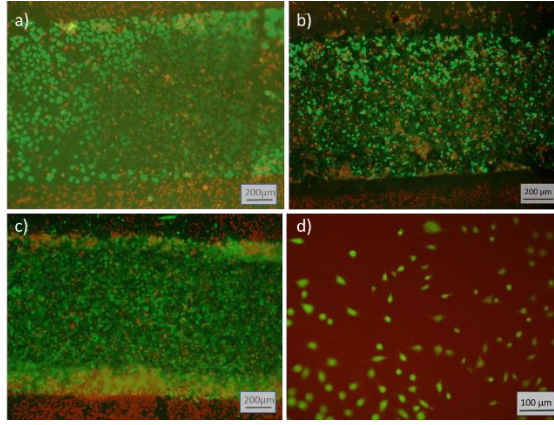
i)



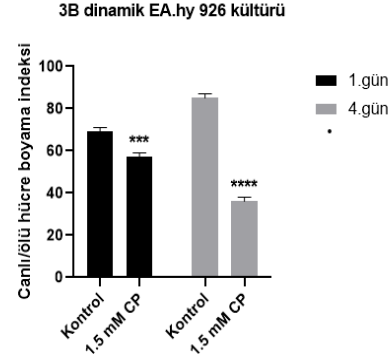
ii)

Şekil 4.8. i) Canlı /Ölü boyama işaretleme yöntemi ile 3B dinamik kültürü yapılan İkili hücre kültürüne CP uygulandıktan ve CP uygulanmadıktan sonra çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri. CP uygulanmamış ikili hücre kültürünün 24 saat(a) sonra alınmış ve 96 saat(c) görüntüleri. CP uygulandıktan 24 saat sonra (b) ve 96 saat sonra (d) ikili hücre kültürünün görüntüleri. Ölçek çubuğu:100 µm. **ii)** 1. ve 4. gün 3B dinamik kültürde Canlı/Ölü boyama analizi ile ilaç uygulanmış ve kontrol grupları arasında hücrelerin canlılık oranında azalma gözlemlendi. (n=3. ***p<0.001 ****p<0.0001).

Mikroakışkan çipin alt kanalını kaplayan EA.hy 926 hücrelerine 1.5 mM CP 24 ve 96 saat süreyle siklofosfamid ilacı uygulanmıştır. Hücrelerin Canlı/Ölü analiz sonucundaki durumları ZEISS Axio Observer D1 zıt faz mikroskopta floresan görüntülenmiştir (Şekil 4.8).



i)

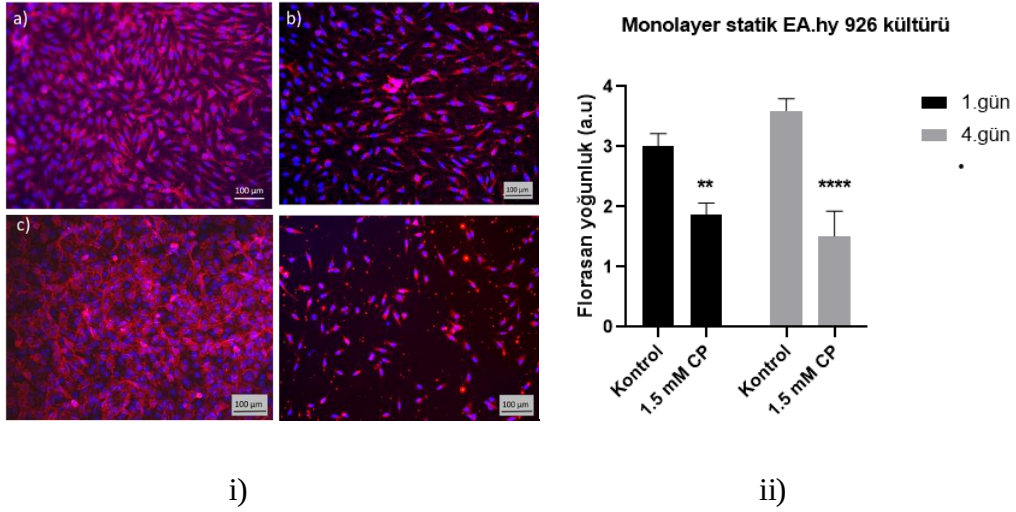


ii)

Şekil 4.9. i) Canlı /Ölü boyama işaretleme yöntemi ile 3B dinamik kültürü yapılan EA.hy 926 hücre kültürüne CP uygulandıktan ve CP uygulanmadıktan sonra çekilmiş floresan mikroskop görüntüleri. CP uygulanmamış ikili hücre kültürünün 24 saat(a) sonra alınmış ve 96 saat(c) görüntüleri. CP uygulandıktan 24 saat sonra (b) ve 96 saat sonra (d) ikili hücre kültürünün görüntüleri . Ölçek çubuğu: a,b,c :200 µm,d:100µm . **ii)** 1. ve 4. gün 3B dinamik kültür sırasında Canlı/Ölü boyama analizi ile ilaç uygulanmış ve kontrol grupları arasında EA.hy 926 hücrelerinin canlılık oranında azalma, 1.ve 4. kontrol grupları arasında ise artış gözlemlendi. (n=3. ***p<0.001 ****p<0.0001).

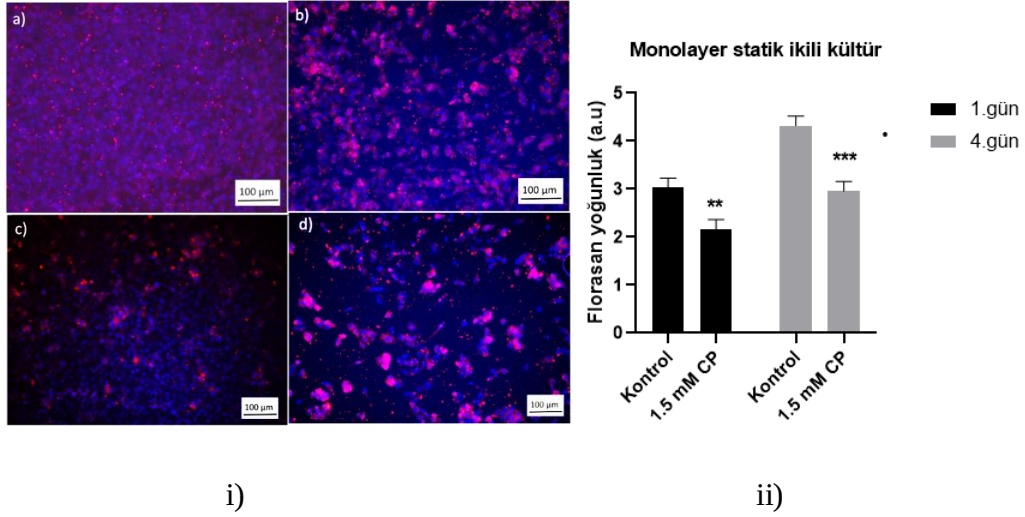
4.1.4. İF işaretleme ile hücre karakterizasyonu

Önce monolayer statik kültürde sadece EA.hy926, EA.hy 926 ve HepG2 hücrelerinden oluşan ikili kültürlerde yapılan deneyler sonucu belirlenen dozlarda siklofosfamid, ilacının hücrelere olan etkisini göstermek için CD31 belirtecinin immunfloresan boyama yöntemi ile boyaması yapılmıştır. 24 saat ve 96 saat sonrasında boyaması yapılan kontrol gruplarında hücrelerin sayılarındaki artıştan dolayı hücre morfolojilerinin yuvarlak görünüme sahip olduğu görüldü. 24 saat ilaca maruz bırakılmış deney gruplarda ise hücre sayılarının azalması ile birlikte morfolojilerinin de değişerek iğsi görünüme sahip oldukları belirlendi (Şekil 4.9 b). 96 saat ilaca maruz bırakılmış deney gruplarda hücre sayılarında belirli azalmanın yanı sıra hücre morfolojilerinin Şekil 4.9. b' grubundaki gibi iğsi görünüme benzemediği rapor edilmiştir.



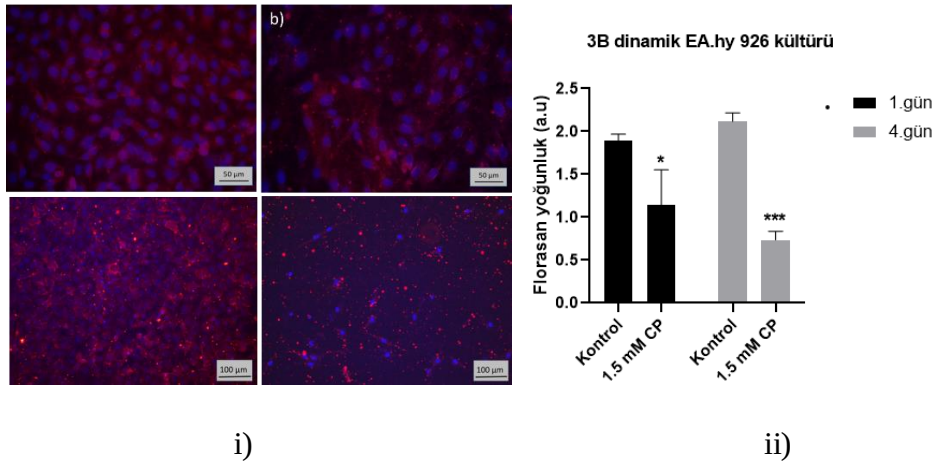
Şekil 4.10. i) Monolayer statik kültürde EA.hy 926 hücrelerine CP uygulandıktan sonra CD31 ile immunofloresan işaretleme ile floresan mikroskopta alınmış görüntüleri. 24 saat sonra kontrol grubu EA.hy 926 hücrelerine CP (a), 24 saat boyunca 1.5mM CP'e maruz bırakılmış (b), 96 saat sonra kontrol grubu (c), 96 saat boyunca 1.5mM CP'e (d) maruz bırakılmış hücre görüntüleri. Ölçek çubuğu: 100 µm. **ii)** Monolayer statik EA.hy 926 hücre kültüründe İF boyama analizi ile 1. ve 4. gün kontrol grupları arasında proliferasyon, 1. ve 4. gün CD 31 ekspresyonunda azalma gözlemlendi. (n=3. **p<0.0001 ****p<0.0001).

Monolayer statik kültürde EA.hy 926 ve HepG2 hücrelerinden oluşan ikili kültür deney gruplarına 1.5 mM CP uygulanması sonrası CD31 belirtecinin immunfloresan boyama yöntemi ile işaretlemesi yapılmıştır. Boyamanın sonucunda ilaç uygulanmış deney gruplarında kontrol gruplarına göre CD31 ekspresyonunun daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.10).



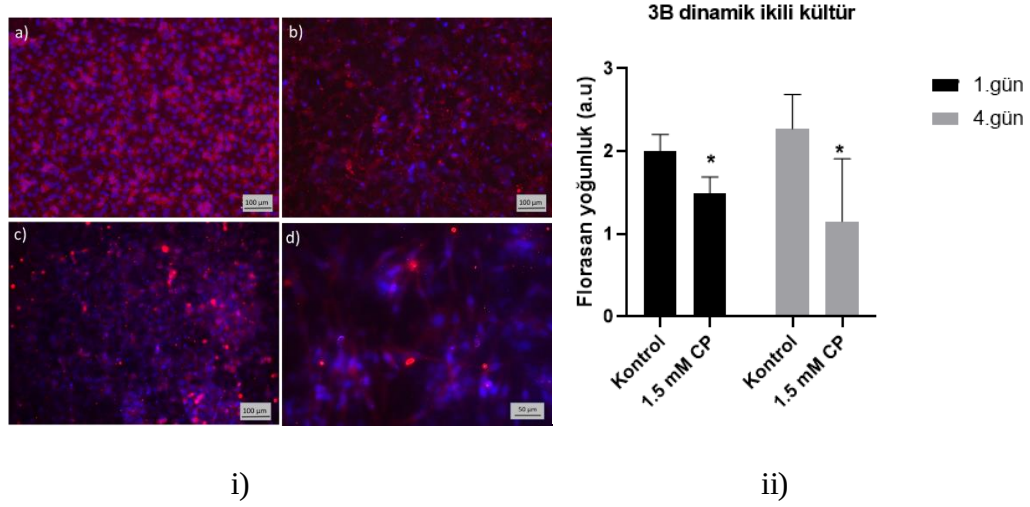
Şekil 4.11. i) Monolayer statik ikili kültür hücrelerine CP uygulandıktan sonra CD31 ile immunofloresan işaretleme ile floresan mikroskopta alınmış görüntüleri 1. 24 saat sonra kontrol grubu (a), 24 saat boyunca 1.5mM CP'e maruz bırakılmış (b), 96 saat sonra kontrol grubu (c), 96 saat boyunca 1.5mM CP'e (d) maruz bırakılmış hücre görüntüleri. Ölçek çubuğu:100 µm. **ii)** Monolayer statik ikili hücre kültüründe İF boyama analizi ile ilaç uygulanmış ve kontrol grupları arasında 4.günün sonunda hücrelerde proliferasyon ve CD31 ekspresyonunda artış gözlemlendi. (n=3. **p<0.01 ***p<0.001).

Tekli EA.hy 926 hücreleri ile çip kurulumu gerçekleştirildikten sonra membran üzerinden immunofloresan boyaması gerçekleştirilen deney gruplarının, boyama sonrasında kontrol grupları arasında hücre canlılığının arttığı sonucuna vardık (Şekil 4.11 a ve c). İlaç uygulanmış ve uygulanmamış 24 saat'lik deney grupları arasında hücre canlılığında %20 oranında fark olduğu tespitine vardık. İlaç uygulanmış ve uygulanmamış 96 saat'lik deney gruplarının verilerine göre ise %90 hücre canlılığının azaldığı belirlendi.



Şekil 4.12. i) 3B dinamik kültürde EA.hy 926 hücrelerinin CP uygulandıktan sonra CD31 ile immunofloresan işaretleme ile floresan mikroskopta alınmış görüntüleri. 24 saat sonra kontrol grubu (a), 24 saat boyunca 1.5mM CP'e maruz bırakılmış (b), 96 saat sonra kontrol grubu (c), 96 saat boyunca 1.5mM CP'e (d) maruz bırakılmış hücre görüntüleri. Ölçek çubuğu a, b:50 µm, c,d:100 µm. **ii)** 3B dinamik EAhy 926 hücre kültürde İF boyama analizi ile ilaç uygulanmış ve kontrol grupları arasında 4. Günün sonunda CD31 ekspresyonunda anlamlı azalma gözlemlendi. (n=3. *p<0.05 ***p<0.001).

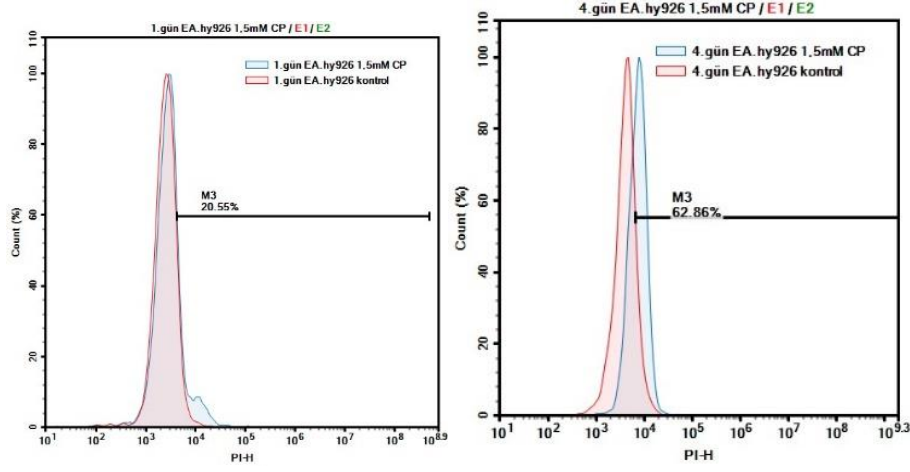
3B dinamik ikili kültür hücreleri ile çip kurulumu gerçekleştirildikten sonra membran üzerinden immunofloresan boyaması gerçekleştirilen deney gruplarında ilaç sonrasında hücrelerin ilacın dozuna karşı daha dirençli oldukları görüldü. 96 saat ilaca maruz bırakıldıktan sonra işaretleme görüntüleri alınmış ikili hücre grubunda (Şekil 4.12d) aydın bir şekilde HepG2 hücrelerinin endotel hücrelerine etkisinin olduğu ve bunun sonucunda endotel hücrelerinin tekli endotel hücreleri ile kurulan çip platformuna göre daha fazla canlılık gösterdiği sonucuna vardık.



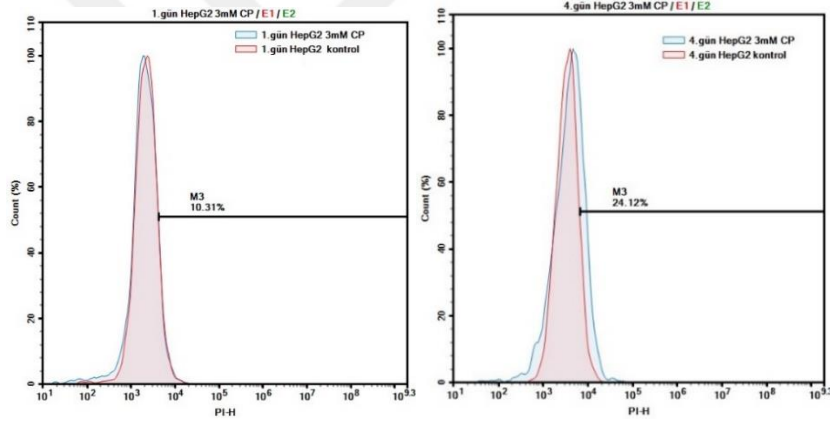
Şekil 4.13. i) 3B dinamik ikili kültür hücrelerine CP uygulandıktan sonra CD31 ile immunoflorsan işaretleme floresan mikroskop görüntüleri. 24 saat sonra kontrol grubu (a), 24 saat boyunca 1.5mM CP'e maruz bırakılmış (b), 96 saat sonra kontrol grubu (c), 96 saat boyunca 1.5mM CP'e (d) maruz bırakılmış hücre görüntüleri. Ölçek çubuğu: a, b, c:100 µm, d: 50µm. **ii)** 1. ve 4. gün 3B dinamik ikili kültürde İF boyama analizi ile ilaç uygulanmış ve kontrol grupları arasında CD31 ekspresyonunda anlamlı azalma gözlemlenmedi. (n=3. *p<0.05).

4.1.5. CD142 belirtecinin hücrelere CP uygulandıktan sonra flow sitometri ile immunofenotipik olarak verimlilik analizi

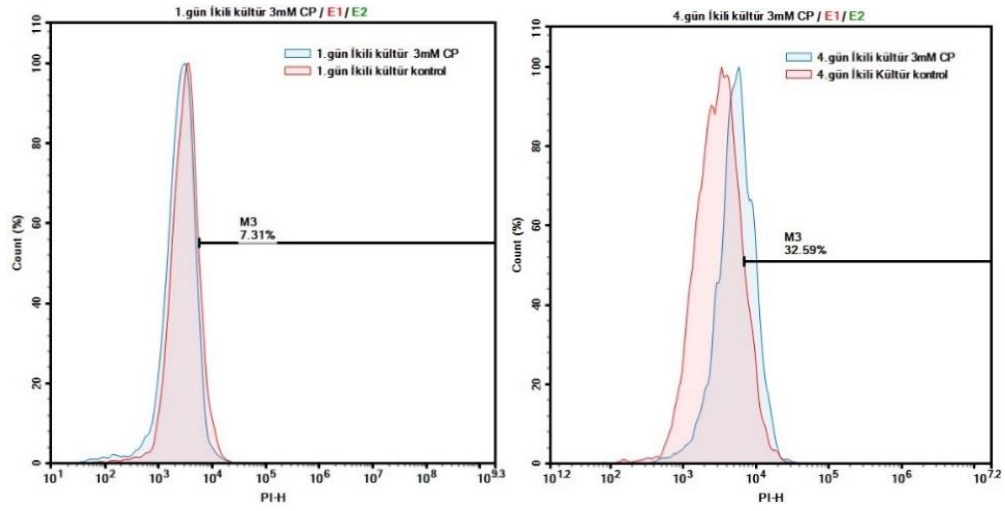
Hücrelerin immunofenotipik karakterizasyonu flow sitometri yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarını 24 saat ve 96 saat boyunca CP'e maruz bıraktıktan sonra ilacın etkisini belirlemek için flow sitometri ile immunofenotipik analiz yapılmıştır. Sonuç olarak immunofenotipik bulgularda, EA.hy 926 hücreleri üzerinde 24 saat sonucunda CD142 pozitifliği %20,5; 96 saat sonucunda ise %62,86 olduğu, HepG2 hücreleri üzerinde %10,31; 96 saat sonucunda ise %24,12 İkili hücre kültürü için 24 saat sonucunda %7,31; 96 saat sonucunda %32,59 oranında pozitiflik görüldü (Şekil 4.13-4.15).



Şekil 4.14. EA.hy 926 hücrelerinin CD142 belirtecinin 1.5mM CP uygulandıktan sonra 24 ve 96 saat sonra flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılan verimlilik analizi.



Şekil 4.15. HepG2 hücrelerinin CD142 belirtecinin 3mM CP uygulandıktan sonra 24 ve 96 saat sonra flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılan verimlilik analizi.



Şekil 4.16. HepG2 ve EA.hy926 hücrelerinden oluşan ikili kültürde CD142 belirtecinin 3 mM CP uygulandıktan 24 ve 96 saat sonra flow sitometri yöntemi kullanılarak yapılan verimlilik analizi.

5. TARTIŞMA

Karaciğer kanseri dünya çapında yüksek morbidite ve mortalite ile en yaygın ve ölümcül kanser çeşitlerinden biridir (Wang et al., 2014). Kanser tedavisine yönelik in vitro ve in vivo araştırmalar çok büyük çoğunluğu insan vücudunun işlevini ve patofizyolojisini vücuda yakın bir şekilde taklit etmekte yeterli modeller olamamaktadır. Geleneksel olarak, in vitro çalışmalar için kullanılan karaciğer modelleri, 2B tek tabakalar, organoidler ve sferoidler gibi monolayer statik 3B yöntemleri içermektedir (Lee et al., 2013). 3B modeller, mikroakışkanların dahil edilmesine izin vererek çalışmanın vaskülarize çip üzerinde karaciğer sistemlerine genişletilmesine olanak tanır. Böylelikle, çip üzerinde organ kültürü teknolojisi, doku gelişimi ve homeostaz çalışmaları için umut verici bir araç sunarak insan fizyolojisine yakın sonuçlar elde etmeye bir adım daha yaklaşmaktadır (Leung et al., 2022).

Doku mühendisliği ve mikroakışkanlarda kaydedilen ilerlemelerle birlikte, son yıllarda fizyolojik olarak ilgili bir mikroçevreyi yeniden üreten çeşitli mikroakışkan temelli modeller geliştirilmiştir (Lee et al., 2021; Moradi et al., 2020). Bu modellerin çoğu HCC hücre monokültürünü temel alsa da, giderek artan sayıda grup farklı karaciğer hücrelerinin, özellikle HCC hücrelerin ve LSEC'lerin mikroakışkan ortak kültürlerinin geliştirilmesiyle ilgilenmektedir (Du, 2017;(Ortega-Ribera et al., 2018)). Bu tür çip üzerinde karaciğer kanseri modelleri şimdiye kadar sunulmuş olsa da, Siklofosfamid uygulanarak endotelial ve HCC hücrelerinin mikroakışkan platformda ortak kültür modeli daha önce incelenmemiştir. Bu nedenle çalışmamızda, kanser tedavilerinde de uzun yıllardır kullanılan Siklofosfamid'in vücut ortamındaki damarın simüle edildiği vasküler kanal içeren 3B mikroakışkan karaciğer kanser modelinde endotel hücreleri üzerine olan etkisi incelendi.

Kemoterapi ilaçları kanserli hücelere vücudumuzun hücrelerini kaplayan kan damarları ile ulaşır (Dewhirst & Secomb, 2017). Siklofosfamid gibi kemoterapötik ilaçlar da kanser üzerinde etkili olmasına rağmen kanser hücrelerine karşı seçici değildir ve sağlıklı hücelere de etki ederek damar hücreleri de dahil olmak üzere birçok dokuda toksik etki yaratmaktadır (van den Boogaard et al., 2022). Bu amaçla, hepatosellüler karsinoma hücreleri (HepG2) ile endotel hücrelerin oluşturduğu damar sistemi ile birlikte kültüre edildiği (ikili kültür) 3B karaciğer kanser mikroakışkan çip modeli üretildi. Öncelikle membrana ECM kaplaması yapılarak vasküler sinüzoidlerdeki Disse aralığı taklit edilerek in vitro'da mikrodizayn olarak gerçek

doku mimarisine yakın inşa edildi. Hücrelerin çip platformu içerisinde hepatosit hücre içeren yüzey üst kanal ve endotel hücre içeren yüzey alt kanalda olacak şekilde, her iki hücrenin kontrol grupları için sadece besiyeri, ilaçlı gruplar için ise ilaçlı besiyeri ile sürekli perfüzyonu sağlanmıştır. Mikroakışkan çip içerisinde her iki kanal için 0,7 µl/dakika besiyeri akış hızında, 37 °C, %5 CO₂ ve nemli ortamda kültür edilmiş ve 1. ve 4. günlerde hücre canlılıkları canlı-ölü işaretleme kiti (Live or Dead™ Fixable Dead Cell Staining Kit, ATT Bioquest) ve immüno Floresan boyama yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

Kan damarını çevreleyen hücreler zarar gördüğünde, doku faktörü adı verilen bir protein reseptörü devreye girer (Mackman, 2004). Bu protein kanın pıhtılaşması, hücreler ve hücre dışı matriks arasındaki iletişimde rol oynar. Doku faktörü hücre dışı matrikste bulunan bir moleküle bağlandığında, kan kaybını azaltan bir dizi eylemi tetikler (<https://www.khanacademy.org/>). Örneğin, doku faktörü, trombositlerin zarar görmüş kan damarının duvarına yapışmasını ve pıhtılaşma faktörü üretmesini sağlar. Antikanser ilaçlarının doku faktörü ekspresyonunda doğrudan veya dolaylı etkileri olabilir. Normalde kan plazmasında dolaşan ve düşük düzeyde bulunan CD142'nin ekspresyonunun ilacın etkisinden dolayı 96 saatin sonunda CD142 eksprese eden hücre sayısının arttığını tespit ettik. (Şekil 4.13-4.15). Siklofosamid ilacı uygulanan tekli ve ikili kültür deney grupları karşılaştırıldığında, ikili hücre gruplarının ilacın toksik etkisine daha dayanıklı olduğu görüldü. Bu da hücrelerin birlikte kültüre edilmesi ilaca karşı olan direnç oluştuğunun göstergesidir. EA.hy926 hücrelerinin siklofosamidin etkisine karşı daha hassas olduğu ve hücrelerin sağ kalım oranlarının düşük olduğu görüldü. Çipte hangi dozların kullanılacağını belirlemek için statikte uygulanan dozlardan HepG2 hücrelerini IC₅₀'e düşüren ilacın 3mM konsantrasyonu belirlendi (Şekil 4.4). Ancak 3 mM doz uygulanmış hücrelerin 3B dinamik kültür sonrası yapılan canlı/ölü boyama analizi sonrasında ikili kültür ve tekli endotel hücre kültürlerinde hücreleri öldürdüğünü tespit ettik. Bu sonuçla da statikte belirlenen dozun 3B dinamik kültür çalışmaları için güvenilir veri kaynağı olmadığı sonucuna vardık. Endotel hücrelerinin tipik epitelyal karaktere sahip oldukları ve 24 saatin sonunda hücre sayılarının iki kat arttığı monolayer statik kültürde mikroskop altında inceleme sırasında görüldü (Şekil 4.1). Monolayer statik kültürde membranın iç ve dış yüzeyine ekimi yapılan hücrelerin 3B dinamik kültür sonrasında kontrol gruplarında membran üzerinden yapılan Canlı/ Ölü boyama sonrasında 96 saatin sonucunda doku

düzeyinde çoğaldıkları görüldü (Şekil 4.2). Canlı/Ölü boyama ile, CP uygulanmış ikili kültür deney gruplarında ise hem 24 hem de 96 saatin sonucunda tekli endotelial deney gruplarına göre daha az etkilendiği ortaya çıktı. Bununla karaciğer kanser hücreleri ve endotel hücrelerin birlikte kültürü sırasında bu hücrelerin kendi aralarındaki hücre-hücre etkileşimleri ile endotel hücrelerin ilacın etkisine karşı daha dirençli olduğu sonucuna vardık. Endotel hücrelerinin belirteci olan CD31'in immünofloresan boyaması sonrasında 24 saat boyunca ilaç uygulanmış endotel hücrelerinin kontrol grubu hücrelerine göre morfolojilerinin değişerek iğsi görünüme doğru değişim gösterdikleri, 96 saat boyunca CP ilacına maruz bırakılan endotel hücrelerin ise iğsi görünümünden yuvarlak bir görünüme doğru değişerek apoptoza gittiği sonucuna vardık.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda model kemoterapi ilaç olarak seçilen ve yoğunlukla kullanılan Siklofosfamid üzerine yapılan araştırmalar karaciğer kanseri hastalarına verilen tedaviler ile yakından ilgisi bulunduğundan dolayı, sağlıklı damar hücrelerinin üzerinde yapılan testlerin sonuçları karaciğer kanseri tedavisi sırasında veya sonrasında ortaya çıkabilecek olumsuz etkileri değerlendirmek ve tedavi stratejilerini optimize etmek için kullanılma potansiyeline sahiptir.

Siklofosfamid uygulanmasının hücrelerin aktivitesine etkisini, CD142 ekspresyonunun flow sitometri analizi ile incelediğimizde, 24 saatin sonucunda %8,10; 96 saatin sonunda %38,41 verimlilik gösterdiği sonucu ile HCC hücreleri ile endotelial hücrelerin ikili kültürünün Siklofosfamid'in toksik etkisine karşı birlikte daha dayanıklı olduğunu tekli endotelial hücreler ile yaptığımız flow sitometri sonuçlarında 24 saatte %20,55; 96 saatte %62,86 oranda, HepG2 hücrelerinin 24 saatte %10,31; 96 saatte %24,12 oranda CD142 eksprese eden hücre oranının olması ile belirledik. Canlı/Ölü boyama analizlerinin sonucunda, monolayer statik kültürde HepG2 hücrelerinde IC50 gösteren dozun mikroakışkan çipte, hücreleri öldürdüğü görüldü. CD31 biyobelirtecinin immüno Floresan boyama analizi sırasında CP'in endotel hücrelerinin morfolojilerini 24 saat sonucunda içi yapıda görünmesine, 96 saatin sonucunda ise yuvarlak bir görüntüye sahip olmasına sebep olduğu ortaya çıktı.

Bu sayede özellikle tedavi amaçlı kullanılan ilaçların hedef doku ve hücreler ile birlikte insan vücudunda çok önemli yere ve işlevlere sahip endotelial hücreleri üzerinde etkisi kullanılan hücre hatları ile incelenmiş oldu. Bu sonuçla da uygulanan anti-kanser ilaçların sağlıklı hücrelere toksik etki edebildiği sonucuna vardık.

Yaptığımız çalışmaların gelecek öneriler kısmında özellikle oluşturulan çip üzerinde karaciğer kanser modelinde insan vücudundaki kanser hücrelerine yakın hücre hatlarının kullanılması hatta insan karaciğer kanser dokusundan hücrelerin izole edilip kullanılması elde edilecek sonuçların önemini daha da arttıracaktır. Bununla birlikte EA.hy926 hücre hattı yerine özellikle LSEC'lerin kullanılması ile elde edilecek sonuçların insanda oluşan reaksiyonlara çok daha yakınlaşması sağlanacaktır.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aravalli, R. N., Cressman, E. N., & Steer, C. J. (2013). Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. *Archives of toxicology*, 87, 227-247.
- Baiocchi, A., Del Nonno, F., Taibi, C., Visco-Comandini, U., D'Offizi, G., Piacentini, M., & Falasca, L. (2019). Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) modifications in patients with chronic hepatitis C. *Scientific reports*, 9(1), 8760.
- Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*, 84(3), 869-901.
- Bernstein, D. (2018). Anthracycline cardiotoxicity: worrisome enough to have you quaking? In (Vol. 122, pp. 188-190): Am Heart Assoc.
- Bhatia, S. N., & Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology*, 32(8), 760-772.
- Cardinale, D., Bacchiani, G., Beggiato, M., Colombo, A., & Cipolla, C. M. (2013). Strategies to prevent and treat cardiovascular risk in cancer patients. *Seminars in oncology*.
- Chamseddine, S., LaPelusa, M., & Kaseb, A. O. (2023). Systemic Neoadjuvant and Adjuvant Therapies in the Management of Hepatocellular Carcinoma—A Narrative Review. *Cancers*, 15(13), 3508.
- Chen, C.-J., Yang, H.-I., Su, J., Jen, C.-L., You, S.-L., Lu, S.-N., Huang, G.-T., Iloeje, U. H., & Group, R.-H. S. (2006). Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *Jama*, 295(1), 65-73.
- Colagrande, S., Regini, F., Taliani, G. G., Nardi, C., & Inghilesi, A. L. (2015). Advanced hepatocellular carcinoma and sorafenib: Diagnosis, indications, clinical and radiological follow-up. *World Journal of Hepatology*, 7(8), 1041.
- Colvin, O. (1999). An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Current pharmaceutical design*, 5, 555-560.
- (Cyclophosphamide: Uses, I., Mechanism of Action | DrugBank Online).
- Dauth, S., Maoz, B. M., Sheehy, S. P., Hemphill, M. A., Murty, T., Macedonia, M. K., Greer, A. M., Budnik, B., & Parker, K. K. (2017). Neurons derived from different brain regions are inherently different in vitro: a novel multiregional brain-on-a-chip. *Journal of neurophysiology*, 117(3), 1320-1341.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Desmet, V. J. (2001). Organizational principles. The liver: biology and pathobiology.
- Devarbhavi, H., Asrani, S. K., Arab, J. P., Narthey, Y. A., Pose, E., & Kamath, P. S. (2023). Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of hepatology*.
- Dewhirst, M. W., & Secomb, T. W. (2017). Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. *Nature Reviews Cancer*, 17(12), 738-750.
- Dhesi, S., Chu, M. P., Blevins, G., Paterson, I., Larratt, L., Oudit, G. Y., & Kim, D. H. (2013). Cyclophosphamide-induced cardiomyopathy: a case report, review, and recommendations for management. *Journal of investigative medicine high impact case reports*, 1(1), 2324709613480346.
- Diabetes, N. I. o., Digestive, & Diseases, K. (2012). LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- Félétou, M. (2011). The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators.
- Ferrari, E., & Rasponi, M. (2021). Liver-Heart on chip models for drug safety. *APL bioengineering*, 5(3).
- Hamilton Vernon 1, C. J. W., Valentine Sampson K. Alia 3, Anup Kasi 4. *Anatomy, Abdomen and Pelvis: Liver*.
- Harkins, J. M., & Ahmad, B. (2020). *Anatomy, abdomen and pelvis, portal venous system (hepatic portal system)*.
- Hong, W. S., Jeon, J. Y., Kang, S. Y., Jung, Y. S., Kim, J. Y., Ahn, M. S., Kang, D. K., Kim, T. H., Yim, H. E., & An, Y.-S. (2013). Comparison of neoadjuvant adriamycin and docetaxel versus adriamycin, cyclophosphamide followed by paclitaxel in patients with operable breast cancer. *Journal of the Korean Surgical Society*, 85(1), 7-14.
- Hooser, S., Beasley, V., Waite, L., Kuhlenschmidt, M., Carmichael, W., & Haschek, W. (1991). Actin filament alterations in rat hepatocytes induced in vivo and in vitro by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary pathology*, 28(4), 259-266.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

<https://gco.iarc.fr/today/home>.

<https://www.cancer.org/cancer/types/liver-cancer/treating/chemotherapy.html>.
<https://www.cancer.org/cancer/types/liver-cancer/treating/chemotherapy.html>.

<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/liver-histology>.
<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/liver-histology>.

<https://www.khanacademy.org/>. <https://www.khanacademy.org/>.

<https://www.mayoclinic.org/>. <https://www.mayoclinic.org/>.

Huang, C. B. X., & Tu, T.-Y. (2023). Recent advances in vascularized tumor-on-a-chip. *Frontiers in Oncology*, 13, 1150332.

Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology*, 21(12), 745-754.

Huh, D., Torisawa, Y.-s., Hamilton, G. A., Kim, H. J., & Ingber, D. E. (2012). Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab on a Chip*, 12(12), 2156-2164.

Ikeda, M., Morizane, C., Ueno, M., Okusaka, T., Ishii, H., & Furuse, J. (2018). Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *Japanese journal of clinical oncology*, 48(2), 103-114.

Jang, K.-J., Otieno, M. A., Ronxhi, J., Lim, H.-K., Ewart, L., Kodella, K. R., Petropolis, D. B., Kulkarni, G., Rubins, J. E., & Conegliano, D. (2019). Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip. *Science translational medicine*, 11(517), eaax5516.

Kang, Y. B. (2015). Liver on a Chip: Engineering a Liver Sinusoid Functional Unit. Drexel University.

Kaplowitz, N. (2004). Drug-induced liver injury. *Clinical infectious diseases*, 38(Supplement_2), S44-S48.

Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., Scholl, W., Zhang, C., Rickner, H., & Richmond, C. A. (2018). Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Scientific reports*, 8(1), 2871.

Kedar Mukthinuthalapati, V. P., Sewram, V., Ndlovu, N., Kimani, S., Abdelaziz, A. O., Chiao, E. Y., & Abou-Alfa, G. K. (2021). Hepatocellular carcinoma in sub-Saharan Africa. *JCO global oncology*, 7, 756-766.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kim, D., Hwang, K. S., Seo, E. U., Seo, S., Lee, B. C., Choi, N., Choi, J., & Kim, H. N. (2022). Vascularized lung cancer model for evaluating the promoted transport of anticancer drugs and immune cells in an engineered tumor microenvironment. *Advanced Healthcare Materials*, 11(12), 2102581.
- Kim, H. J., Huh, D., Hamilton, G., & Ingber, D. E. (2012). Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow. *Lab on a Chip*, 12(12), 2165-2174.
- Kudo, M. (2023). Adjuvant Atezolizumab-Bevacizumab after Resection or Ablation for Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*, 12(3), 189-197.
- Lalor, P., Lai, W., Curbishley, S., Shetty, S., & Adams, D. (2006). Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(34), 5429.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 168(4), 670-691.
- Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H. L., Papatheodoridis, G., Zoulim, F., & Tacke, F. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*, 67(2), 370-398.
- Lauschke, V. M., Shafagh, R. Z., Hendriks, D. F., & Ingelman-Sundberg, M. (2019). . 3D primary hepatocyte culture systems for analyses of liver diseases, drug metabolism, and toxicity: emerging culture paradigms and applications. . *Biotechnology Journal*, 14(17).
- Lee, P. J., Hung, P. J., & Lee, L. P. (2007). An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture. *Biotechnology and bioengineering*, 97(5), 1340-1346.
- Lee, S.-A., Kang, E., Ju, J., Kim, D.-S., & Lee, S.-H. (2013). Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip to investigate hepatocyte–hepatic stellate cell interactions and flow effects. *Lab on a Chip*, 13(18), 3529-3537.
- Lee, S. Y., Kim, D., Lee, S. H., & Sung, J. H. (2021). Microtechnology-based in vitro models: Mimicking liver function and pathophysiology. *APL bioengineering*, 5(4).
- Lertkiatmongkol, P. (2017). The Contribution of Carbohydrate Residues to the Adhesive Properties of the Vascular Cell Adhesion Molecule, PECAM-1. The Medical College of Wisconsin.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Leung, C. M., De Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G.-A., Ko, J., Rho, H. S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N. L., & Takayama, S. (2022). A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), 33.
- Liu, Y., Sakolish, C., Chen, Z., Phan, D. T., Bender, R. H. F., Hughes, C. C., & Rusyn, I. (2020). Human in vitro vascularized micro-organ and micro-tumor models are reproducible organ-on-a-chip platforms for studies of anticancer drugs. *Toxicology*, 445, 152601.
- Liu, Y., Wei, J., Lu, J., Lei, D., Yan, S., & Li, X. (2016). Micropatterned coculture of hepatocytes on electrospun fibers as a potential in vitro model for predictive drug metabolism. *Materials Science and Engineering: C*, 63, 475-484.
- Llovet, J., Kelley, R., Villanueva, A., Singal, A., Pikarsky, E., & Roayaie, S. (2021). Finn RJNRDP. *Hepatocell Carcinoma*, 7(1), 6.
- Ma, L., Barker, J., Zhou, C., Li, W., Zhang, J., Lin, B., Foltz, G., Küblbeck, J., & Honkakoski, P. (2012). Towards personalized medicine with a three-dimensional micro-scale perfusion-based two-chamber tissue model system. *Biomaterials*, 33(17), 4353-4361.
- Mackman, N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(6), 1015-1022.
- Marrero, J. A., Fontana, R. J., Fu, S., Conjeevaram, H. S., Su, G. L., & Lok, A. S. (2005). Alcohol, tobacco and obesity are synergistic risk factors for hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 42(2), 218-224.
- McCuskey, R. S., Bethea, N. W., Wong, J., McCuskey, M. K., Abril, E. R., Wang, X., Ito, Y., & DeLeve, L. D. (2005). Ethanol bingeing exacerbates sinusoidal endothelial and parenchymal injury elicited by acetaminophen. *Journal of hepatology*, 42(3), 371-377.
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L., & London, W. T. (2015). Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clinics in liver disease*, 19(2), 223-238.
- Mereish, K. A., Bunner, D. L., Ragland, D. R., & Creasia, D. A. (1991). Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by Silymarin: biochemistry, histopathology, and lethality. *Pharmaceutical research*, 8, 273-277.
- Miller, C. P., Tsuchida, C., Zheng, Y., Himmelfarb, J., & Akilesh, S. (2018). A 3D human renal cell carcinoma-on-a-chip for the study of tumor angiogenesis. *Neoplasia*, 20(6), 610-620.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Mills, B. A., & Roberts, R. W. (1979). Cyclophosphamide-induced cardiomyopathy. A report of two cases and review of the english literature. *Cancer*, 43(6), 2223-2226.
- Mills, K. A., Chess-Williams, R., & McDermott, C. (2019). Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro. *Archives of toxicology*, 93, 3291-3303.
- Monticello, T. M., Jones, T. W., Dambach, D. M., Potter, D. M., Bolt, M. W., Liu, M., Keller, D. A., Hart, T. K., & Kadambi, V. J. (2017). Current nonclinical testing paradigm enables safe entry to First-In-Human clinical trials: The IQ consortium nonclinical to clinical translational database. *Toxicology and applied pharmacology*, 334, 100-109.
- Moradi, E., Jalili-Firoozinezhad, S., & Solati-Hashjin, M. (2020). Microfluidic organ-on-a-chip models of human liver tissue. *Acta biomaterialia*, 116, 67-83.
- Morganti, M., Carpi, A., Nicolini, A., Gorini, I., Glaviano, B., Fini, M., Giavaresi, G., Mittermayer, C., & Giardino, R. (2002). Atherosclerosis and cancer: common pathways on the vascular endothelium. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(7), 317-324.
- Newman, P. J., Berndt, M. C., Gorski, J., White, G. C., Lyman, S., Paddock, C., & Muller, W. A. (1990). PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247(4947), 1219-1222.
- Ngan Ngo, T. K., Kuo, C.-H., & Tu, T.-Y. (2023). Recent advances in microfluidic-based cancer immunotherapy-on-a-chip strategies. *Biomicrofluidics*, 17(1).
- Ogino, M. H., & Tadi, P. (2020). Cyclophosphamide.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., & Bracken, W. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 32(1), 56-67.
- Ortega-Ribera, M., Fernández-Iglesias, A., Illa, X., Moya, A., Molina, V., Maeso-Díaz, R., Fondevila, C., Peralta, C., Bosch, J., & Villa, R. (2018). Resemblance of the human liver sinusoid in a fluidic device with biomedical and pharmaceutical applications. *Biotechnology and bioengineering*, 115(10), 2585-2594.
- Özkan, A., Stolley, D., Cressman, E. N., McMillin, M., DeMorrow, S., Yankeelov, T. E., & Rylander, M. N. (2020). The influence of chronic liver diseases on hepatic vasculature: a liver-on-a-chip review. *Micromachines*, 11(5), 487.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Pasricha, R., & Sachdev, D. (2017). Biological characterization of nanofiber composites. In *Nanofiber composites for biomedical applications* (pp. 157-196). Elsevier.
- Prasad, V., & Mailankody, S. (2017). Research and development spending to bring a single cancer drug to market and revenues after approval. *JAMA internal medicine*, 177(11), 1569-1575.
- Privratsky, J. R. (2010). PECAM-1: a Multi-functional Adhesion Molecule in Inflammation. Medical College of Wisconsin.
- Privratsky, J. R., & Newman, P. J. (2014). PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell and tissue research*, 355, 607-619.
- Raza, A., & Sood, G. K. (2014). Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(15), 4115.
- Sakaguchi, T. F., Sadler, K. C., Crosnier, C., & Stainier, D. Y. (2008). Endothelial signals modulate hepatocyte apicobasal polarization in zebrafish. *Current Biology*, 18(20), 1565-1571.
- Schroer, A. K., Shotwell, M. S., Sidorov, V. Y., Wikswo, J. P., & Merryman, W. D. (2017). I-Wire Heart-on-a-Chip II: Biomechanical analysis of contractile, three-dimensional cardiomyocyte tissue constructs. *Acta biomaterialia*, 48, 79-87.
- Shannon, A. H., Ruff, S. M., & Pawlik, T. M. (2022). Expert Insights on Current Treatments for Hepatocellular Carcinoma: Clinical and Molecular Approaches and Bottlenecks to Progress. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 1247-1261.
- Shiga, T., & Hiraide, M. (2020). Cardiotoxicities of 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines. *Current treatment options in oncology*, 21, 1-21.
- Singal, A. G., Lampertico, P., & Nahon, P. (2020). Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *Journal of hepatology*, 72(2), 250-261.
- Sørensen, K. K., Simon-Santamaria, J., McCuskey, R. S., & Smedsrød, B. (2011). Liver sinusoidal endothelial cells. *Comprehensive Physiology*, 5(4), 1751-1774.
- Strazzabosco, M., Spirli, C., & Okolicsanyi, L. (2000). Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 15(3), 244-253.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Sun, Q.-H., DeLisser, H. M., Zukowski, M. M., Paddock, C., Albelda, S. M., & Newman, P. J. (1996). Individually Distinct Ig Homology Domains in PECAM-1 Regulate Homophilic Binding and Modulate Receptor Affinity (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(19), 11090-11098.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Tatosian, D. A., & Shuler, M. L. (2009). A novel system for evaluation of drug mixtures for potential efficacy in treating multidrug resistant cancers. *Biotechnology and bioengineering*, 103(1), 187-198.
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(10), 836-847.
- Timm, K. N., Ball, V., Miller, J. J., Savic, D., West, J. A., Griffin, J. L., & Tyler, D. J. (2022). Metabolic Effects of Doxorubicin on the Rat Liver Assessed With Hyperpolarized MRI and Metabolomics. *Frontiers in Physiology*, 12, 782745.
- Urbanczyk, M., Zbinden, A., & Schenke-Layland, K. (2022). Organ-specific endothelial cell heterogeneity and its impact on regenerative medicine and biomedical engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*, 186, 114323.
- Vairappan, B. (2015). Endothelial dysfunction in cirrhosis: Role of inflammation and oxidative stress. *World Journal of Hepatology*, 7(3), 443.
- van den Boogaard, W. M., Komninos, D. S., & Vermeij, W. P. (2022). Chemotherapy side-effects: not all DNA damage is equal. *Cancers*, 14(3), 627.
- Vunjak-Novakovic, G., Bhatia, S., Chen, C., & Hirschi, K. (2013). HeLiVa platform: integrated heart-liver-vascular systems for drug testing in human health and disease. *Stem cell research & therapy*, 4(1), 1-6.
- Wang, F.-S., Fan, J.-G., Zhang, Z., Gao, B., & Wang, H.-Y. (2014). The global burden of liver disease: the major impact of China. *Hepatology*, 60(6), 2099-2108.
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R., Carter, A., Casey, D., Charlson, F., Chen, A., Coates, M., & Coggeshall, M. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980â 2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1459-1544.
- Wei, Y., Weng, D., Li, F., Zou, X., Young, D. O., Ji, J., & Shen, P. (2008). Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. *Apoptosis*, 13, 1031-1042.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Yahoo, N., Dudek, M., Knolle, P., & Heikenwlder, M. (2023). Role of immune responses for development of NAFLD-associated liver cancer and prospects for therapeutic modulation. *Journal of hepatology*.
- Zhang, X., Karim, M., Hasan, M. M., Hooper, J., Wahab, R., Roy, S., & Al-Hilal, T. A. (2022). Cancer-on-a-Chip: Models for studying metastasis. *Cancers*, 14(3), 648.
- Zhu, A. X., Duda, D. G., Sahani, D. V., & Jain, R. K. (2011). HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nature reviews Clinical oncology*, 8(5), 292-301.
- Zhu, R. X., Seto, W.-K., Lai, C.-L., & Yuen, M.-F. (2016). Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region. *Gut and liver*, 10(3), 332.

