

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GRAFEN OKSİTİN 2-BOYUTTA ve 3-BOYUTTA BÜYÜTÜLEN KANSER  
HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Cansu Gürçan

Danışman Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Açelya Yılmaz Aktuna

Mayıs

2018

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Cansu Gürcan

İmzası

## ONAY

Yrd. Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA danışmanlığında Cansu GÜRCAN tarafından hazırlanan bu çalışma .../.../2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye:

İmza:

Üye:

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Grafen Oksitin 2-boyutta ve 3-boyutta Büyütülen Kanser Hücreleri Üzerine Etkileri

Cansu Gürcan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Yrd. Doç. Dr. Açelya Yılmaz Aktuna

Karbon tabanlı nanomalzemelerden olan grafenin keşfi ile birlikte; grafenin mekanik, elektriksel, termal ve optik olmak üzere birçok eşsiz özelliği belirlenmiştir. Grafenin bu önemli özellikleri başta nanotıp, malzeme bilimi, biyoteknoloji ve biyomedikal olmak üzere çok sayıda bilim dalı tarafından kullanılmaktadır. Bu bilim dalları tarafından uzun yıllardır günümüzün en önemli ve ölümcül hastalıklarından olan kanseri teşhis ve tedavi çalışmaları devam etmektedir. Grafen tabanlı nanomalzemeler, kanser teşhis ve tedavisinde büyük umut veren yeni bir malzeme olma adayıdır.

Bu tez çalışmasında grafen türevlerinden olan grafen oksitin (GO) kanser hücreleri üzerine olan etkisine odaklanılmıştır. Bunun için bu tez çalışmasında meme kanseri MCF7 ve glioblastoma U87 insan hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatlarından *in vitro* ortamda hem klasik kültür koşullarında uygulanan 2-boyutlu hem de tümör dokusunu kültür ortamında daha iyi taklit edebilecek 3-boyutlu kültürler kullanılmıştır. Kanser hücrelerinin GO' in farklı derişimlerinde inkübasyonu sonucunda verdiği hücresel yanıt zamana göre incelenmiştir. Hücre sayılarındaki artış, proliferasyon seviyeleri ve GO' in hücre içine alım profilleri 2-boyutta ve 3-boyutta kültür edilen hücrelerde farklılık göstermiştir. Kanser hücre hatlarının GO' e verdiği tepkiler; kanser biyolojisini anlamaya ve yeni tedaviler geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

2018, 82 sayfa

**Anahtar kelimeler:** grafen oksit, tümör sferoid, 3-boyutlu kültür

## **ABSTRACT**

MSc Thesis

The Effects of Graphene Okside on Cancer Cells Cultered in 2D and 3D Environment

Cansu Gürcan

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Asst. Prof. Dr. AÇELYA YILMAZER AKTUNA

With the discovery of the graphene which is among carbon-based nanomaterials; many unique properties of graphene, including mechanical, electrical, thermal and optical, have been identified. These important features of graphene are used by a large number of scientists, especially in nanomedicine, material science, biotechnology and biomedical science. These scientists continued to diagnose and treat cancer, one of the most important and deadly diseases of our time for many years. Grafen as a nanomaterial is a new candidate that gives great promise in cancer diagnosis and treatment.

In this thesis, graphene oxide (GO), one of the graphene derivatives, is used on cancer cell lines. For this purpose, two different cancer cell lines, human breast cancer MCF7 and human glioblastoma U87 cell lines, were used in this thesis study. Both classical 2-dimensional and, 3-dimensional cultures, which can better mimic tumors were established from these cell lines in vitro. The cellular responses to GO treatment were analyzed at different material concentration and time points. Increase in cell numbers, proliferation rates and cellular uptake profile of GO were identified and compared between cell cultered as 2D or 3D. Responses of cencer cells to GO; will help understand cancer biology and develop new therapies.

2018, 82 pages

**Keywords:** graphene okside, tumour spheroid, 3D culter

## TEŞEKKÜR

Kariyerimin ilk adımlarından olan yüksek lisans eğitimimi Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü' nün öğrencisi olarak yapmaktan onur duyuyorum. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel bilgi birikimini bizlerle paylaşan çok değerleri hocalarım ve meslek arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca gerek hayat tecrübelerini gerekse çok kıymetli bilgi birikimi ve deneyimlerini paylaşan; bana yol gösteren ve destekleyen danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA hocama sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarken kendisi gibi vizyon sahibi bir bilim insanının öğrencisi olmaktan gurur duyduğumu belirtmek isterim.

Yüksek lisans eğitimimde 315S102 numaralı Flag-Era projesi kapsamında tez çalışmam için maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu' na, ayrıca tez çalışmam sırasında malzeme ve ekipmanlarından faydalandığım Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü' ne teşekkür ederim.

Aynı ekipte birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum; tez çalışmam boyunca yardım ve katkılarından dolayı Dr. Hadiseh TAHERİ' ye ve diğer ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tez çalışmam için TEM mikroskobu ve ultra ince kesitlerin elde edilmesinde katkı sağlayan Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Asuman ÖZEN ve Dr. Ahmet CEYLAN hocama teşekkürlerimi iletirim. Tez çalışmam içerisinde kullandığım grafen oksit materyalinin temini için Manchester Üniversitesi Ulusal Grafen Enstitüsü üyesi Prof. Kostas Kostarelos' a teşekkür ederim.

Hayatları boyunca tüm emek ve sevgilerini benim için harcayan çok değerli annem Meryem GÜRCAN, babam Fikret GÜRCAN' a saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarken hayatımın en değerlilerinden olan ve her anımı paylaştığım çok kıymetli kardeşim Ceyda GÜRCAN' a sevgi ve teşekkürlerimi iletirim.

İyi ve kötü tüm anlarımda saygı ve sabır ile beni destekleyen, hiçbir yardımı benden esirgemeyen, bilgisiyle ufkumu açan sevgili Fatih KARATEPE' ye teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ONAY</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. GRAFEN NEDİR?</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. GRAFENİN MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ</b> .....	<b>3</b>
<b>2.3. GRAFENİN İŞLEVSELLEŞTİRİLMESİ</b> .....	<b>4</b>
2.3.1. KOVALENT DEĞİŞİKLİKLER .....	<b>5</b>
2.3.2. KOVALENT OLMAYAN DEĞİŞİKLİKLER .....	<b>5</b>
<b>2.4. GRAFENİN ÜRETİMİ</b> .....	<b>5</b>
<b>2.5. GRAFEN TABANLI NANOMALZEMELERİN NANOBİYOTEKNOLOJİ VE BİYOMEDİKAL ALANDA KULLANIMI</b> .....	<b>6</b>
2.5.1. İLAÇ SALINIMINDA GRAFENİN KULLANILMASI .....	<b>6</b>
2.5.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE GRAFENİN KULLANILMASI .....	<b>7</b>
2.5.3. BİYOSENSÖR OLARAK GRAFENİN KULLANILMASI.....	<b>8</b>
<b>2.6. GRAFEN VE KANSER</b> .....	<b>8</b>

2.6.1. İLAÇ VE GEN TAŞINMASI .....	9
2.6.2. FOTOTERMAL TERAPİ .....	10
2.6.3. FOTODİNAMİK TERAPİ .....	11
<b>2.7. GEREKÇE VE AMAÇ .....</b>	<b>13</b>
<b><u>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b><u>14</u></b>
<b>3.1. MATERYAL .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. YÖNTEM.....</b>	<b>15</b>
3.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ .....	15
3.2.1.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması.....	15
3.2.1.2. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Hücre Sayımı.....	16
3.2.1.3. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi.....	17
3.2.1.4. Kanser Hücre Hatlarından 2-Boyutlu Kültür Elde Edilmesi .....	18
3.2.1.5. Kanser Hücre Hatlarından 3-Boyutlu Tümör Sferoid Oluşturulması.....	19
3.2.1.6. 2-Boyutlu Kültürü Elde Edilen Kanser Hücre Hatlarına sGO Verilmesi.....	20
3.2.1.7. 3-Boyutlu Kültürü Elde Edilen Kanser Hücre Hatlarına sGO Verilmesi.....	21
3.2.1.8. sGO Verilen 2-Boyutlu Kültürden Hücre Sayımı ve Hücre Canlılık Testi .....	21
3.2.1.9. sGO Verilen 3-Boyutlu Tümör Sferoid Kültüründen Hücre Sayımı ve Hücre Canlılık Testi .....	22
3.2.2. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU.....	23
3.2.2.1. RNA İzolasyonu .....	23
3.2.2.2. cDNA Sentezi .....	24
3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) .....	24
3.2.3. HİSTOLOJİK ANALİZLER .....	25
3.2.3.1. İmmünofloresan Boyamalar .....	26
3.2.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Görüntüsü .....	28
3.2.3.3. Toluen Mavisini Boyaması.....	28
3.2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	28



<b><u>4. ARASTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b><u>29</u></b>
4.1. KANSER HÜCRE HATLARINDAN ELDE EDİLEN 2-BOYUTLU KÜLTÜRÜN GÖRÜNTÜLENMESİ.....	29
4.2. 2-BOYUTLU KÜLTÜRLERDEN HÜCRE SAYIMI .....	30
4.3. 2-BOYUTLU KÜLTÜRLERDEN ALAMAR BLUE İLE CANLILIK TESTİ YAPILMASI .....	33
4.4. KANSER HÜCRE HATLARINDAN ELDE EDİLEN 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİN GÖRÜNTÜLENMESİ VE YARIÇAPLARININ ÖLÇÜLMESİ....	34
4.5. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERDEN HÜCRE SAYIMI .....	38
4.6. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİNİN ALAMAR BLUE İLE CANLILIK TESTİ .....	39
4.7. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİN TOLUEN MAVİSİ İLE BOYAMA GÖRÜNTÜLERİ.....	41
4.8. GO MUAMELESİNİN 2- VE 3-BOYUTLU KÜLTÜRLERDEKİ PROLİFERASYONA ETKİSİNİN ANALİZİ.....	43
4.9. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİN TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOP (TEM) GÖRÜNTÜLERİ .....	46
4.10. GO MUAMELESİNİN 2- VE 3-BOYUTLU KÜLTÜRLERDEKİ HÜCRE DIŞI MATRİKSE OLAN ETKİSİNİN ANALİZİ .....	47
4.11. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİN HÜCRE DIŞI MATRİKS PROTEİNLERİNİN FLORESAN MİKROSKOP İLE BELİRLENMESİ.....	51
<b><u>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>	<b><u>53</u></b>
5.1. TARTIŞMA .....	53
5.2. SONUÇ.....	55
<b><u>KAYNAKLAR.....</u></b>	<b><u>57</u></b>
<b><u>EKLER .....</u></b>	<b><u>62</u></b>
<b><u>ÖZGEÇMİŞ .....</u></b>	<b><u>63</u></b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Grafitten tek tabakalı grafen eldesi .....	3
Şekil 2.2. Grafenin moleküler özellikleri .....	4
Şekil 3.1. MCF7 ve U87 hücre hattına ait ters ışık mikroskop görüntüsü (10X).....	19
Şekil 3.2. Sferoidlerin doku dondurma solüsyonu (OCT) ile dondurulma aşaması.....	26
Şekil 4.1. MCF7 hücre hattının sGO' e maruz kalmış 2-boyutlu kültür görüntüleri. MCF7 hücre hattına sGO' in iki farklı derişimde verilmesinin ardından 1 ve 2 gün sonunda ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (10X).....	29
Şekil 4.2. U87 hücre hattının sGO' e maruz kalmış 2-boyutlu kültür görüntüleri. U87 hücre hattına sGO' in iki farklı derişimde verilmesinin ardından 2, 4, 6 ve 7 gün sonunda ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (10X).....	30
Şekil 4.3. MCF7 ve U87 hücre hattının 2-boyutlu kültürünün sGO muamesinden sonraki hücre sayısı grafiği. İki farklı sGO derişimi ile muamele edilmiş. (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattının hücre sayımı yapılmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır $p<0.05$ .....	32
Şekil 4.4. MCF7 ve U87 hücre hattının 2-boyutlu kültürünün sGO muamesesinden sonraki canlılık testi analizi. İki farklı sGO derişimi ile muamele edilmiş (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattının canlılık testi yapılmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır $p<0.05$ .....	34
Şekil 4.5. MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid görüntüleri. MCF7 hücre hattına sGO iki farklı derişimde verilmesinin ardından 2, 4, 6 ve 10'uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (10X).....	35
Şekil 4.6. MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid yarıçap analizleri. MCF7 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlere sGO iki farklı derişimde verilmesinin ardından; 2, 4, 6 ve 10'uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında yarıçapları ölçülmüştür ( $\mu\text{m}$ ).....	36

Şekil 4.7. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid görüntüleri. U87 hücre hattına sGO iki farklı derişimde verilmesinin ardından 2, 4, 6 ve 10'uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (10X).....	37
Şekil 4.8. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid yarıçap analizleri. U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlere sGO iki farklı derişimde verilmesinin ardından; 2, 4, 6 ve 10'uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında yarıçapları ölçülmüştür ( $\mu\text{m}$ ).....	38
Şekil 4.9. MCF7 ve U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid kültürünün sGO muamelesinden sonraki hücre sayısı analizi. (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattından elde edilen tümör sferoidlerin sGO muamelesinden sonraki hücre sayısı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.....	39
Şekil 4.10. MCF7 ve U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin sGO muamelesinden 10 gün sonraki canlılık testi analizi. (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerine sGO muamelesinden 10 gün sonra canlılık testi yapılmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır $p < 0.05$ .....	41
Şekil 4.11. MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonra ultra ince kesitlerinin tolüen mavisi ile boyanma görüntüleri.....	42
Şekil 4.12. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonra ultra ince kesitlerinin tolüen mavisi ile boyanma görüntüleri.....	43
Şekil 4.13. U87 hattından elde edilen 2-boyutlu kültürün sGO muamelesinden sonraki proliferasyon belirteci ile boyanan immüno Floresan görüntüsü. sGO muamelesine uğrayan hücrelerin proliferasyon belirteci olan Ki67 immüno Floresan boyaması kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.....	44
Şekil 4.14. U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin proliferasyon belirteci olan Ki67 ile boyanan immüno Floresan (IF) ve immünohistokimyasal (IHC) görüntüsü.....	45
Şekil 4.15. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonra elde edilen Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) görüntüleri .....	47

Şekil 4.16. MCF7 ve U87 hücre hattının 2-boyutlu kültürünün sGO muamelesinden sonraki eş zamanlı PCR analizi. İki farklı sGO derişimine maruz kalan (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattının eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken kontrol grubuna göre normalize edilmiştir $p<0.05$ .....	49
Şekil 4.17. MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonraki eş zamanlı PCR analizi. MCF7 hücre hattının 2 farklı sGO derişimi ile muamele edilmiş sferoidlerinin eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken kontrol grubuna göre normalize edilmiştir $p<0.05$ .....	50
Şekil 4.18. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonraki eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken kontrol grubuna göre normalize edilmiştir $p<0.05$ .....	51
Şekil 4.19. U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin immünofloresan görüntüsü.....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. İlaç taşınmasında grafenin kullanımı .....	10
Çizelge 2.2. Fototermal terapide grafenin kullanımı .....	11
Çizelge 2.3. Fotodinamik terapide grafenin kullanımı .....	12
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan materyaller .....	14
Çizelge 3.2. Hücre tipleri, pasaj numaraları ve hücre besiyeri içeriği.....	15



## SİMGELER DİZİNİ

G	Grafen
$\sigma$	Sigma
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
$\pi$	Pi
GO	Grafen Oksit
CVD	Kimyasal Buhar Birikimi
RGO	İndirgenmiş Grafen Oksit
PEI	Polietilen İmin
PEG	Polietilen Glikol
DOX	Doksorubisin
RNA	Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
PDMS	Polidimetilsiloksan
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
PDT	Fotodinamik Terapi
PTT	FototermaI Terapi
siRNA	Small İnterfering Ribonükleik Asit
dsDNA	Çift Sarmal Deoksiribonükleik Asit
miRNA	Mikro RNA
CuS	Bakır sülfür
NIR	Yakın Kızılötesi Spektrum
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Ce6	Klorin e6
MEM	Minimum Essential Medium
FBS	Fetal Bovine Serum

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
MCF7	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
U87	İnsan Glioblastoma Hücre Hattı
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
ml	Mililitre
dk	Dakika
rpm	Revolutions Per Minute
µl	Mikrolitre
mm	Milimetre
mm <sup>3</sup>	Milimetre küp
cm <sup>3</sup>	Santimetre küp
DMSO	Dimetil Sülfoksit
g	Gram
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
OCT	Doku Dondurma Solüsyonu
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	Diamidino-2-Phenylindole
sGO	Small Grafen Oksit
DIC	Diferansiyal İnterferans Kontrast
ATCC	American Type Culture Collection
cDNA	Komplementer DNA

µm

Mikrometre

IF

İmmünofloresan

IHC

İmmünohistokimyasal





## 1. GİRİŞ

Doğanın ve organik yapıların temel yapıtaşı olan karbon elementi doğada çok farklı formlarda bulunmaktadır. Karbon atomları arasındaki kovalent bağlanmadaki değişiklikler, karbon allotropları olarak adlandırılan doğal olarak oluşan farklı malzemelere yol açar. Karbon allotroplarından olan grafitin, tek atom kalınlığındaki tabakasından oluşmuş, iki boyutlu,  $sp^2$  hibritleşmesi yapmış, hegzagonal yapısına grafen denir (1).

Grafenin keşfinden bu yana, grafen ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Grafen malzemesinin eşsiz özelliklerinden dolayı çeşitli bilimsel alanların ilgisini çekmektedir. Grafenin optik, elektronik, mekanik, termal ve manyetik özellikleri sayesinde malzeme biliminden, kimya ve fizik alanına çok çeşitli bilim dallarının dikkatini çekmektedir. Grafen malzemesinin fonksiyonel gruplarla işlevselleştirilmesi nanotıp, biyomedikal ve nanaoteknoloji alanlarında yeni yaklaşımlar sağlamaktadır. Fonksiyonlaştırılan grafen; biyosensör, ilaç taşıyıcı, antimikrobiyal olarak kullanılmakla birlikte fotodinamik terapide, doku mühendisliğinde ve görüntüleme sistemlerinde de kullanılmaktadır.

Son yıllarda özellikle biyomedikal, nanotıp, biyoteknoloji ve nanoteknoloji alanlarında grafen çalışmaları ivme kazanmıştır. Bu alanların en yoğun çalışma konularından biri olan kanser alanında grafenin eşsiz özelliklerinden faydalanılmaktadır. Kanser hastalığının teşhis ve tedavisinde geleneksel yöntemlerden farklı olarak çok farklı tekniklerle grafen ve grafen türevleri kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında iki farklı kanser hücre hattı kullanılarak 2-boyutlu ve 3-boyutlu kültürler elde edilmiştir ve bu kültürler üzerinde grafenin türevlerinden olan grafen oksitin (GO) etkisi araştırılmıştır. Çalışmada klasik olarak kullanılan monolayer yani 2-boyutta büyütülen kültürlerin yanı sıra tümör dokusunu daha iyi taklit edecek 3-boyutta sferoidler oluşturulmuştur. GO' in hem 3-boyutlu hemde 2-boyutlu kültür üzerinde etkileri araştırılmıştır.

GO' in 2-boyutlu ve 3-boyutlu kültür üzerine etkilerini incelerken, sGO' in hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine odaklanılmıştır. Burdan elde edilen sonuçlar ışığında histolojik analizler ile grafenin 2 farklı kültür üzerindeki morfolojik değişimleri incelenmiştir. Üç boyutlu kültürlerden elde edilen ultra ince kesitlerin transmisyon elektron mikroskop (TEM) altında görüntüleri alınarak histolojik değişiklikler desteklenmiştir. Gözlemlenen

değişiklikleri desteklemek amacıyla hem gen hem de protein ifade seviyeleri analiz edilmiştir.

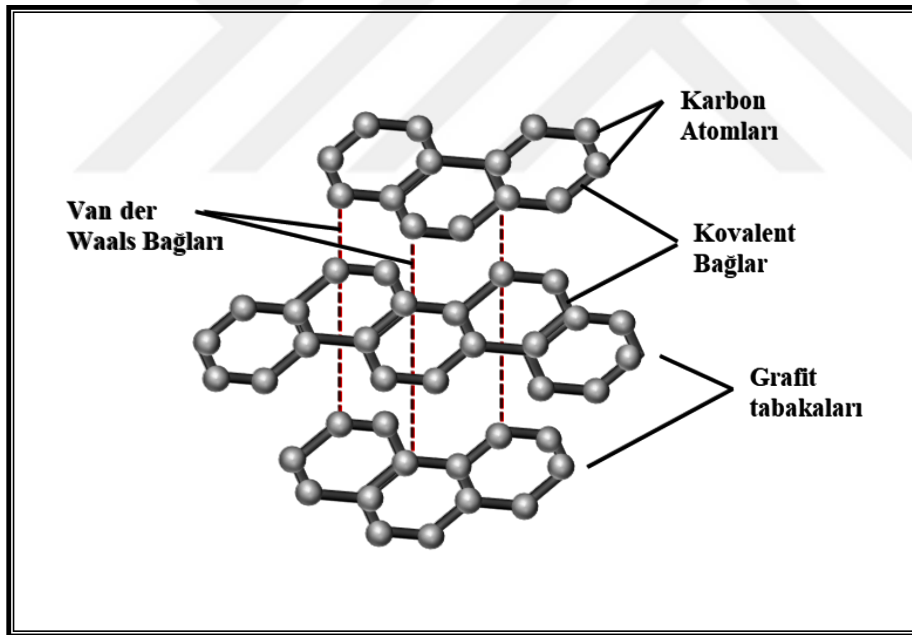
Bu tez çalışmasından elde edilen veriler GO' in farklı kültür modelleri üzerinde nasıl etki gösterdiğini anlamamıza olanak sağlamıştır. GO' in kanser hücreleri ile olan ilişkisi, kanser biyolojisini daha iyi anlamamıza ve yorumlamamıza katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. GRAFEN NEDİR?

Karbon, doğada en çok bulunan elementlerden biridir ve organik yapıların temel yapıtaşını oluşturur. Karbon elementinin doğada çok farklı formları bulunmaktadır. Karbon atomları arasındaki kovalent bağlanmadaki değişiklikler, karbon allotropları olarak adlandırılan doğal olarak oluşan farklı malzemelere yol açar. Karbon allotroplarından olan grafitin, tek atom kalınlığındaki tabakasından oluşmuş, iki boyutlu,  $sp^2$  hibritleşmesi yapmış, hegzagonal yapısına grafen (G) denir (1). Grafitten elde edilen tekli grafen tabakalarının varlığı teorik olarak bilim dünyasında tartışılmıştır (2). Dahası iki boyutlu atomik olarak ince kristal malzemelerin varlığı fiziksel olarak imkansız kabul edilmiştir (3). Atomik yapıda, iki boyutlu tek bir grafen tabakası; Novoselov ve Geim tarafından 2004 yılında ‘Scotch Tape’ metodu ile izole edilmiştir (Şekil 2.1) (4). Novoselov ve Geim yeni bir karbon allotropunu keşfetmeleri ile 2010 yılında Nobel Ödülüne layık görülmüşlerdir (5,6).



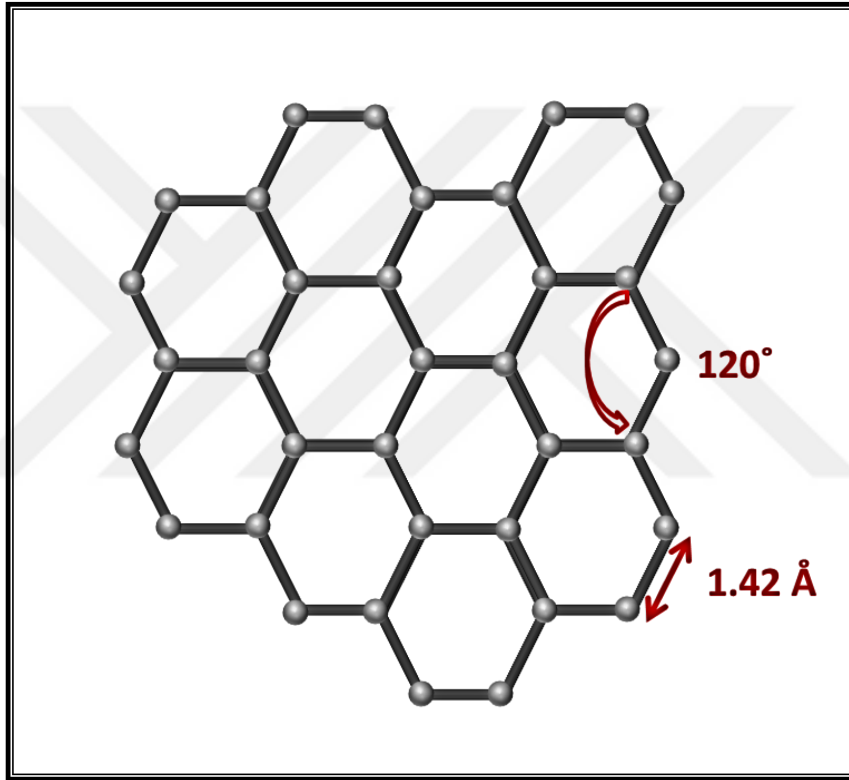
Şekil 2.1. Grafitten tek tabakalı grafen eldesi

### 2.2. GRAFENİN MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ

Karbon allotroplarından biri olan grafen; bal peteği şeklinde adlandırılan hegzagonal bir yapıya sahiptir. Altı karbon atomunun bir araya gelmesi ile oluşan halkasal yapı iki boyutludur, tek bir atom kalınlığındadır ve karbon atomları  $sp^2$  hibritleşmesi yapar (1,7). Halkayı oluşturan her bir karbon atomu aynı tabakada bulunan diğer üç karbon atomu ile

sigma ( $\sigma$ ) bağı yapar ve son kalan bağı ise diğer tabakalarda bulunan karbon atomları ile Van der Waals bağı yapar. İki karbon atomu arasındaki bağı açısı  $120^\circ$  iken bağı uzunluğu ise  $1,42 \text{ \AA}$ 'dur (Şekil 2.2) (1).

Grafenin karbon atomları arasındaki kovalent bağlanma ve tek atom kalınlığındaki katmanda bulunan karbon atomlarının basit düzeni grafene eşsiz özellikler katmaktadır. Benzersiz özelliklere sahip olan grafenin özel yapısı; optik, mekanik, yüksek ısı iletkenliği, şeffaflık (% 97.9), yüksek kararlılık, elektronik, görünür ve kızılötesi yerlerde iyi ışık emilimi sağlamaktadır (8-10).



Şekil 2.2. Grafenin moleküler özellikleri

### 2.3. GRAFENİN İŞLEVSELLEŞTİRİLMESİ

Grafenin keşfinden bu yana, grafen ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır ve grafen malzemesinin eşsiz özelliklerinden dolayı çeşitli bilimsel alanların ilgisini çekmektedir. Sağlıktan enerjiye savunma sanayinden kompozit teknolojilere malzeme biliminden kimya ve fizik alanına birçok farklı alanda grafen ve türevleri kullanılmaktadır. Biyomedikal, nanotıp, biyoteknoloji gibi alanlarda da grafen çalışmalarının ivmesi artmaktadır.

Eşsiz özelliklere sahip grafenin canlı sistemlerde kullanılabilmesi için bazı değişiklikler yapılması gerekmektedir. Grafen malzemesi oksijene sahip hidrofilik grupları bulundurmaması nedeniyle hidrofobik bir yapıya sahiptir. Grafen tabakaları arasındaki  $\pi - \pi$  etkileşimi bu tabakaların su içerisinde dağılımını engeller ve kümeleşmelere neden olur (11).

Canlı sistemlerle etkileşimi çalışılan grafenin suda dağılamaması ve hidrofobik bir yapıya sahip olması; grafen malzemesinin uygulanmasını olumsuz hale getirir. Bu nedenle grafen materyalinin işlevselleştirilmesi gerekmektedir. Grafenin yapısındaki eksiklikleri ortadan kaldırmak için, genellikle sudaki dağılımını arttıran yeni manyetik, optik ve elektriksel özellikler getiren aktif işlevsel gruplar eklenmektedir (12). Bu aktif işlevsel gruplar kovalent ve kovalent olmayan değişiklikler ile eklenmektedir.

### **2.3.1. KOVALENT DEĞİŞİKLİKLER**

Grafeni işlevselleştirmek için en çok kullanılan yöntemlerden biri kovalent değişikliklerdir ve bu değişiklikler aktif çift bağların ve oksijene sahip grupların eklenmesi ile elde edilir. Grafenin işlevselleştirilebilmesi için çok miktarda epoksi, karboksil ve hidroksi grupları kovalent değişiklikler için kullanılabilir (13). Stankovich ve arkadaşları (14) kovalent değişiklikler kullanarak ilk olarak grafen oksiti (GO) modifiye etmişlerdir.

### **2.3.2. KOVALENT OLMAYAN DEĞİŞİKLİKLER**

Grafenin işlevselleştirilebilmesi için kovalent olmayan yöntemlerde kullanılmaktadır. Hidrojen bağları,  $\pi - \pi$  etkileşimleri, iyonik bağlar, Van der Waals kuvvetleri bunlardan bazılarıdır. Kovalent olmayan değişikliklerde grafenin yapı ve özelliklerini mümkün olduğunca düzenlemektedir. Grafen ve grafen oksiti değiştirmek için,  $\pi - \pi$  etkileşimleri sıklıkla kullanılmıştır; Stankovich ve arkadaşları ilk kovalent olmayan değişiklik olarak  $\pi - \pi$  etkileşimlerini kullanmıştır (1). Bu yöntem kovalent olmayan değişikliklerin en verimli yöntemidir.

## **2.4. GRAFENİN ÜRETİMİ**

Son yıllarda araştırmacılar tarafından eşsiz özelliklere sahip grafen ve grafen oksitin büyük miktarlarda üretimi amaçlanmaktadır. Grafen üretimi iki ana başlık altında toplanabilir. Üretim yöntemlerinden ilki yukarıdan aşağıya (top-down) organik sentetik yaklaşımlardır.

Mekanik bölünme ve redoks gibi teknikler bu yöntemde kullanılmaktadır. Hammadde olarak doğal grafit karbon kaynağı olarak kullanılmakta böylece grafen az veya tek tabakalı şekilde üretilmektedir (15). Novoselov ve Geim 2004'te yaptıkları çalışmada mekanik bölünme tekniğini kullanmışlardır. Bu yöntem ile grafitin pul pul dökülmesi sağlanmış ve tek tabakalı grafen elde edilmiştir (4).

Üretim yöntemlerinden ikincisi ise aşağıdan yukarıya (bottom-up) organik sentetik yaklaşımlardır. Organik sentez ve kimyasal buhar birikimi (CVD) teknikleri bu yöntem altında yer almaktadır. Başlangıç ürünü olarak küçük karbon bileşikleri kullanılmaktadır. Son ürün olarak çok tabakalı grafen elde edilmektedir (1).

## **2.5. GRAFEN TABANLI NANOMALZEMELERİN NANOBİYOTEKNOLOJİ VE BİYOMEDİKAL ALANDA KULLANIMI**

Grafen tabanlı malzemeler; manyetik, optik, termal, mekanik ve elektronik özelliklerinden dolayı birçok bilim dalının ilgisini çekmektedir (16). Grafenin diğer özelliklerinden olan suda iyi çözünbilmesi, biyouyumlu olması, foksiyonlaştırarak istenilen çalışmaya göre düzenlenebilmesi, geniş yüzey alanı ve çok farklı kimyasal özelliklerinden dolayı ise canlı sistemlerde kullanımını kolaylaştırmaktadır. Bu sebeple nanobiyoteknoloji ve biyomedikal alanda grafen tabanlı malzemeler sık sık kullanılmaktadır (17,18).

### **2.5.1. İLAÇ SALINIMINDA GRAFENİN KULLANILMASI**

Grafen tabanlı malzemeler; çok yönlü, doğrudan uygulanabilen, çok fonksiyonlu, çalışmanın gerekliliğine göre tasarlanabilmesi ile ilaç salınımında önemli bir yere sahiptir (16). Grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO) suda daha iyi dağılım gösterdiği için ilaç salınımında grafene tercih edilmektedir (19). İlaç salınımı için grafen oksitin (GO) tercih edilmesinin en büyük nedenlerinden biri oksijenli grupları yüzeyinde bulundurmasıdır. Bu oksijenli gruplar sayesinde daha kolay taşıma, daha zengin yüzey alanına, sulu ortamda daha iyi çözünürlüğe sahip olmaktadır (17).

Grafen oksit sahip olduğu iki farklı alan sayesinde ilaç salınımını gerçekleştirmektedir. Hidrofobik alanın oluşmasını sağlayan sp<sup>2</sup> hibritleşmesi yapmış karbonlar ve hidrofilik alanın oluşmasını sağlayan oksijenli grupların bulunduğu bölgedir (19). Bu iki farklı alan hem kovalent hemde kovalent olmayan bağlanma gösterir. Grafen oksit hedefe kovalent

bağlar ile bağlanırken, ilaç molekülleri kovalent olmayan bağlarla grafen oksite bağlanır. Böylece ilaç molekülleri kolaylıkla grafen oksitten salınır (19).

Grafen tabanlı nanomalzemeler terapötik moleküllerin taşınmasında kullanılmak üzere biyoyumlu polimerler ile fonksiyonlaştırılmaktadır. Polietilenimin (PEI), kitosan, polietilen glikol (PEG) biyoyumlu polimerlerdendir (20). Fonksiyonlaştırılması polietilen glikol (PEG) ile yapılan grafene; yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarından biri olan doxorubicin (DOX) eklenmiştir. PEG-DOX yüklü grafen malzemesi B hücreli lenfoma kanseri üzerinde kullanılmıştır ve bu kanser hücrelerinin ölümü gözlenmiştir (21).

İlaç salınımı ve terapötik moleküllerin yanı sıra gen transferi için RNA ve DNA moleküllerinin taşınması için de grafen tabanlı malzemeler kullanılabilir. Bunun için grafen oksitin negatif yükünden yola çıkılarak, elektrostatik etkileşim sağlayabilecek polietilenimin (PEI) gibi pozitif yüklü polimerler grafen oksite modifiye edilir. Bu sayede negatif yüklü nükleik asitler (RNA, DNA), pozitif yüklü polimerlere tutturularak taşınması sağlanır (22).

### **2.5.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE GRAFENİN KULLANILMASI**

Grafen tabanlı nanomalzemelerin kullanılması ile oluşturulan çok boyutlu yapılar; geniş yüzey alanına ve gözenekli bir yapıya sahip olmaktadır. Bununla birlikte çok boyutlu yapıların ana maddesini oluşturan grafen ailesinin temel özelliklerinden olan hafiflik ve mekanik özellikler grafen tabanlı nanomalzemelerin doku mühendisliğinde kullanılmasının tercih sebebidir.

Doku mühendisliğinde kullanılmak üzere oluşturulan üç boyutlu grafen iskeleleri hücrelerin aslına yakın bir ortamda gelişmelerine olanak sağlamaktadır; ayrıca hücrelerin farklılaşması için bir substrat görevi görmektedir. Bu üç boyutlu iskelelerin canlı dokuları taklit etmesi ve hatta canlı dokuların yerini alacak implantlar olarak düşünülmüştür (19).

Grafen ailesinin nanoyapılarının kendi kendine inşa kapasitesi vardır. Doku mühendisliği için daha çok tercih edilen grafen oksit (GO) yapısında bulunan oksijen grupları sayesinde su ile etkileşime girdiğinde hidrojen bağı kurabilir. Bu şekilde grafen oksit tabakaları arasında bağlar oluşturur ve kendiliğinden jelleşme gerçekleşir (18). Bu özelliğin nanotıpta faydalı olacağı savunulmaktadır.

Substrat olarak grafen oksit (GO) ve polidimetilsiloksan (PDMS) kullanılan bir çalışmada; bu substratların mezenkimal kök hücrelere olan etkisi araştırılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin çoğalması, büyümesi ve farklılaşması araştırılan bu çalışmada; grafen oksit yüzeylerin diğer substrata göre hücresele çoğalmada daha etkili olduğunu göstermiştir (23). Diğer bir çalışmada; nörodejeneratif hastalıklarda kullanılmak üzere grafen türevleri içeren substratlar önerilmiştir. Nöral fonksiyonların devamlılığı elektriksel iletim sayesinde olduğundan ve grafenin yüksek elektrik iletkenliğinden yola çıkılarak düşünülen bu tasarım nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için bir fırsat olabilir (24).

### **2.5.3. BİYOSENSÖR OLARAK GRAFENİN KULLANILMASI**

Genel olarak biyosensörler iki farklı bölümden oluşur. Bunlardan biri reseptör diğeri ise dönüştürücüdür. Hedefi tanıyan kısım reseptördür ve hedef ile uyumlu bir etkileşime sahip biyoaktif bir molekülden oluşur. Hedefin tanınması sırasında oluşan kimyasal bilgiyi hesaplanabilir bir sinyale dönüştüren kısım ise dönüştürücüdür (19).

Grafen tabanlı nanomalzemeler dönüştürücü görevi görmek için biyosensörlerde kullanılabilir (25,26). İyi bir elektron alıcısı olan grafen, floresan rezonans enerji transferi (FRET) uygulamalarında önemli bir rol üstlenmektedir. Elektron alıcısı olarak grafenin kullanılması; yanlış pozitif sinyaller, maliyet, hassaslık gibi kısıtlamaları büyük ölçüde azaltacağı düşünülmektedir (27). Bazı genetik hastalıkların (Alzheimer, kistik fibroz) erken teşhisinde, enzim aktivitelerinin (metil transferaz, nükleaz) belirlenmesinde grafen tabanlı malzemeler biyosensör olarak kullanılabilir (28-31).

### **2.6. GRAFEN VE KANSER**

Kanser, günümüzde başlıca ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde 2012 yılında kanserden kaynaklanan 8,2 milyon ölüm gerçekleşmiştir. Dahası 2020 yılına kadar her yıl 15 ila 17 milyon arasında yeni kanser vakası olacağı tahmin edilmektedir (32). Kanser tedavisinde cerrahi yöntemlerden farklı olarak, diğer tedavilerin tümü kanser hücrelerine karşı mekanik veya farmakolojik bir öldürme eylemine dayanır. Bununla birlikte bu tedavilerde sağlıklı hücreler yan etkilerden zarar görmektedir. Nanoteknoloji ise kanser hücrelerine daha spesifik, etkili ve sağlıklı hücreler üzerine istenmeyen yan etkileri azaltmak için en iyi tercihlerden biridir. Nanoteknoloji sayesinde kanserli bölgeyi tanıma ve sadece o bölgeye spesifik ilaç salınımı yapmak mümkün



olabilir. Dahası yenilikçi tedavilerin geliştirilmesi bakımından, nanomalzemeler bir tanı aracı olarak görüntüleme için kullanılabilir. Aynı zamanda, kanser terapisi için ilaçların salınımını teşvik etmek ve kontrol etmek için kullanılabilir. Son yıllarda, özellikleri nedeniyle kanser tedavisi için potansiyel terapötik uygulamalarda kullanılacak çok sayıda nanomalzeme araştırılmıştır (33). Yeni sayılabilecek nanomateryallerden biri olan grafen; elektronik, optik, termal ve mekanik özellikler de dahil olmak üzere eşsiz fiziko-kimyasal özellikleri sayesinde pek çok potansiyel uygulama için bilim çevrelerinde ve kamuoyunda büyük ilgi görmektedir (34,35). Son zamanlarda grafen ve grafen oksit (GO); ilaç verme, tanılama, doku mühendisliği ve gen transfeksiyonu gibi giderek artan sayıda tıbbi uygulamada kullanılmak üzere araştırılmaktadır (22,36,37). Bu tez çalışması için yapılan literatür araştırmasında, grafen ve grafen tabanlı malzemelerin kanser tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere 3 ana başlığa ayrıldığı gözlenmiştir. Bunlar; ilaç ve gen taşınması, fotodinamik terapi (PDT) ve fototermal terapidir (PTT).

### **2.6.1. İLAÇ VE GEN TAŞINMASI**

Son yıllarda grafen tabanlı nanomalzemelerin biyolojik ve biyomedikal alanda kullanımı artmıştır. Bu artışın sebebi grafen ve türevlerinin (GO, rGO) yüksek biyouyumluluğudur. Canlı sistemlerde uyumluluğun yanı sıra grafen, geniş yüzey alanına sahiptir ve bu sayede yüzeyinde bulunan her bir atom yüksek miktarda ilaç ve gen yükleme kapasitesine sahiptir (38,39).

İlaç dağılımı çalışmaları grafenin ilk uygulamalarından biridir (40). Farklı bağlanma yöntemleri ile ilaç moleküllerini grafen üzerine yüklemek için farklı yaklaşımlar kullanılmıştır. Birçok çalışmada grafen ve grafen oksitin (GO) biyouyumluluk ve fizyolojik stabilitesini arttırmak için polietilen glikol (PEG) kullanılmıştır ve sonrasında kovalent olmayan etkileşim yoluyla antikanser ilaçları grafen yüzeyine yüklenmiştir (39). Yapılan bir çalışmada grafen oksit PEG ile işlevselleştirilmiştir ardından GO-PEG yüzeyine transferrin ve bir antikanser ilacı olan yaygın olarak kullanılan doksorubisin (DOX) yüklenmiştir. Beyin tümörlerini hedeflemek için kullanılan bu yöntem ile beyin tümörlerinde verimli ve güçlü bir sitotoksiste sağlanmıştır (41). Grafen geniş yüzey alanına sahip olduğu için aynı anda iki veya daha fazla antikanser ilacı kombine edilerek grafen oksit (GO) üzerine yüklenmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. İlaç taşınmasında grafenin kullanımı

Uygulama Şekli	Kanser Türü	Yüklenen İlaç Molekülleri	Grafen Türü	Referans
İlaç taşınması	Burkitt's Lenfoma	Doksorubisin, Rituxan	nGO-PEG	(21)
İlaç Taşınması	Meme Kanseri	Doksorubisin, Kamptotesin	nGO-Folik Asit	(36)
İlaç Taşınması	Karaciğer Kanseri	Doksorubisin, Elsinochrome A	rGO	(42)
İlaç Taşınması	Servikal Kanser	Doksorubisin, Kurkumin, Kamptotesin, Paklitaksel	NGs	(43)

İşlevselleştirilen grafene iki veya daha fazla kanser ilacı yüklenerek kanser tedavisinde kullanımı için yapılmış çalışmalar mevcuttur (Çizelge 2.1).

Grafen tabanlı materyaller küçük gen (siRNA, oligonükleotid, dsDNA) taşıyıcı olarak gen tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanser de dahil olmak üzere gen ile ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (44). Yapılan bir çalışmada meme kanseri hücrelerine adriamisin ve miRNA-21 (anti-miR-21) eş zamanlı olarak GO aracılığı ile verilmiştir. Bu çalışma ile kemoterapötik ilaçların ve siRNA'nın bir taşıyıcısı olarak GO ile tedavinin, antikanser ilaçların kemosensitivitesini yeniden düzenleyen ilaca dirençli kanserlerin tedavisi için elverişli olduğunu göstermişlerdir (45).

## 2.6.2. FOTOTERMAL TERAPİ

Fototermal terapide (PTT) ışık absorpsiyonundan ısı üretmek için ışığa duyarlaştırıcı maddeler kullanılır. Işığa duyarlaştırıcı maddeler kanser hücreleri içine alınarak gelen ışık ile birlikte ısınır ve yanarak kanser hücrelerinin ölmesi gerçekleştirilir. Sağlıklı hücrelerin spesifik olmayan ısınmasını önlemek için, ışığa duyarlaştırıcı maddelerin kanser hücrelerini seçici bir alım sergilemelidir. Bu sayede sağlıklı hücreler ısınmadan etkilenmezler (40). Grafenin güçlü optik absorpsiyon özelliği sayesinde PTT' de kullanımı

artmıştır. Yapılan bir çalışmada PEG ile fonksiyonlaştırılmış GO eş zamanlı olarak hem ilaç yüklenmiş hemde PTT’ de kullanılmıştır. Servikal kanser üzerine yapılan bu çalışmada; GO-PEG üzerine bakır sülfür (CuS) nanopartikülleri eklenmiştir ve yüksek dozda DOX depolanmıştır. CuS sayesinde servikal tümör üzerinde fototermal dönüşüm gerçekleşmiştir ve bu tümörlerin ablasyonu sağlanmıştır. Ayrıca yüklenen DOX sayesinde hücrelerdeki ölümün arttığı gözlenmiştir (46). Grafenin yüksek absorban özelliğinden faydalanılarak kanser terapisi için birçok çalışma yapılmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Fototermal terapide grafenin kullanımı

Uygulama Şekli	Kanser Türü	Grafen Türü ve Kullanılan Işığa Duyarlaştırıcı	Referans
PTT ve ilaç taşınması	Meme Kanseri	GO-Ag	(47)
PTT	Servikal Kanser	GO-IONPs-Au-PEG	(48)
PTT	Beyin Kanseri	Nano-rGO-PEG ve RGD	(49)
PTT ve Görüntüleme	Meme Kanseri	GO ve GO-AuNS	(50)

### 2.6.3. FOTODİNAMİK TERAPİ

Fotodinamik terapi (PDT); tekli oksijen, serbest radikal veya peroksitlerin yakın kızılötesi (NIR) spektrumu ile ışınlanmasıyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi ile sitotoksositeye dayanan bir kanser terapi yöntemidir (40). Kemoterapi veya radyoterapiyle karşılaştırıldığında, PDT nispeten daha az yan etki gösterir ve tümöre özel öldürmeyi artırır (51). Yapılan bir çalışmada klorin e6 (Ce6) adlı ışığa duyarlaştırıcı kullanılarak PDT deneyi tasarlanmıştır. Bu çalışmada mide kanseri hücrelerine GO’ e modifiye edilmiş Ce6 (GO-Ce6) verilmiştir. Tümör hücrelerinde GO-Ce6 birikmesi sonucu ışınlama ile birlikte mide kanseri hücreleri üzerinde verimli bir fotodinamik etki oluşmuştur (52).

Diğer çalışmalarda da gösterildiği gibi yüksek optik özellikleri ve yakın kızılötesi ışığı iyi absorbe etme özellikleri, grafenin farklı kanser terapilerinde kullanmasını sağlamaktadır.

Geniş yüzey alanı ve farklı bağlanmalara olanak tanıyan grafen, aynı anda birden fazla kanser terapi yöntemi için kullanılabilir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Fotodinamik terapide grafenin kullanımı

Uygulama Şekli	Kanser Türü	Yüklenen İlaç Molekülleri	Grafen Türü	Referans
İlaç Taşınması ve PDT	Cilt kanseri	Doksorubisin, Klorin e6	GO	(53)
İlaç Taşınması ve PDT	Akciğer Kanseri	Kamptotesin, Hypocrellin A	rGO	(54)
PDT ve Görüntüleme	Servikal Kanser	-	NGs-QDs	(55)
PDT	Meme Kanseri	-	GO-PEG	(56)

Grafen tabanlı nanomalzemeler kanser teşhis veya tedavisinde tek başına kullanılmasından çok teranostik bir yaklaşımla kullanılmaktadır. Çizelge 2.3’ de gösterildiği gibi tedavi edici ajanlar (ilaçlar) grafen ve türevlerine modifiye edilmekte ve ardından PDT veya PTT gibi terapötik yöntemlerde kullanılmaktadır.

## 2.7. GEREKÇE VE AMAÇ

Grafen ve türevlerinin eşsiz özelliklerinin bilim dünyasının dikkatini çekmesiyle farklı araştırma alanlarında kullanılmaktadır. Yapılan literatür taramasında nanotıp, nanoteknoloji, biyomedikal ve biyoteknoloji alanlarında grafen türevlerinin bu önemli özelliklerinden faydalanılarak birçok çalışma yapılmaktadır. Günümüzde en çok rastlanılan ve ölüm oranı yüksek olan hastalıklardan olan kanser, yine üzerinde en çok çalışma yapılan alanlardan biridir. Grafenin özelliklerinin kanser teşhis ve tedavisinde kullanılabilmesi bilim dünyasına yeni bir bakış açısı ve çalışma alanı getirmiştir.

Tez çalışması için yapılan literatür taramasında; geleneksel 2-boyutlu kültürlerin yanı sıra *in vitro* ortamda elde edilen 3-boyutlu kültürlerin canlı sistemleri ve tümör dokularını çok daha iyi taklit ettikleri ve *in vivo* çalışmalara geçmeden önce yapılabilecek ön çalışmalardan olduğu savunulmaktadır. Üç boyutlu kültürler sayesinde *in vivo* çalışmalar öncesinde daha verimli ve gerçeğe daha yakın sonuçlar elde edilmektedir (57).

Yapılan bu tez çalışmasında bu bilgiler gerekçe olarak kullanılmıştır ve iki farklı kanser hücre hattından hem 2-boyutlu hem de 3-boyutlu kültür oluşturulmuştur.

Bu tez çalışmasında kanser hücre hatlarından olan insan meme kanseri MCF7 ve insan glioblastoma U87 seçilmiştir. Hücre kültüründe geliştirilen bu kanser hücre hatlarından hem 2-boyutlu hem de 3-boyutlu kültürler elde edilmiştir. Elde edilen kültürlerde hücre sayılarındaki artış, proliferasyon seviyeleri ve GO' in hücre içine alımı ile ilgili bilgilerin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

Bu tez çalışmasında kullanılan materyaller Çizelge 3.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan materyaller

Materyalin Aşama	Kullanıldığı	Materyalin Adı ve Katalog Numarası
<b>Hücre Kültürü</b>		MEM (1X) Minimum Essential Medium (Cat. No.31095-029. Life Technologies), Pen Strep Penicillin Streptomycin (Cat. No. 15140-122.Gibco), FBS Fetal Bovine Serum (Cat. No. 10500-064. Gibco, Life Technologies), DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Cat. No.14190-094. LifeTechnologies), Trypsin-EDTA (1X) (Cat. No. 25300-054. Gibco), Dimethyl Sulfoxide (Cat. No. D2650. Lot. No. RNBF0698SIGMA-ALDRICH), Agar (Cat. No. A6686. SIGMA-ALDRICH), Alamar Blue™ Cell Viability Reagent (Cat. No. DAL1025 İnvitrogen), sGO (Manchester University, Nanomedicine Lab)
<b>RNA İzolasyonu</b>		Macherey-nagel NucleoSpinRNA Mini Kit (Cat. No. 740955.50), 2-Mercaptoethanol (Cat. No. 31350-010.Gibco)
<b>cDNA sentezi</b>		iScript™ cDNA Synthesis Kit (Cat. No. 170-8891. BIORAD)
<b>PCR</b>		Sso Advanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Cat. No. 172-5271. BIO-RAD)
<b>İmmünofloresan Boyama</b>		Bovine Albumin (Protease Free) (Lot. No. OK18665. BioShop), TRITON® X-100 (Cat. No. 1L22885. BioShop®), Anti-Laminin antibody (ab11575. Abcam.), Anti-Fibronectin antibody [IST-9] (ab6328. Abcam.), Anti-İntegrin beta1 antibody [EP1041Y] (ab52971. Abcam.), Anti-Collagen IV antibody [COL-94] (ab6311. Abcam.), OCT tissue freezing media (Cat. No. SHH0026. SIGMA_ALDRICH)

### 3.2. YÖNTEM

Bu tez çalışmasının materyal seçimi, hücre kültürü çalışmaları Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın desteklenmesi için Tübitak 315S102 nolu ‘Grafenin immün etkilerinin omik yöntemler ve genotoksik analizler ile karakterize edilmesi’ (G-IMMUNOMICS) başlıklı projeden faydalanılmıştır. Ayrıca sferoidlerin ultra ince kesitleri ve Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) görüntülerinin eldesi Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Laboratuvarlarında Dr. Ahmet Ceylan tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan grafen oksit (GO) Manchester Üniversitesi Nanomedicine Lab koordinatörü Prof. Kostas Kostareles tarafından temin edilmiştir ve kullanılan GO’ in karakterizasyonu Orecchioni ve ekibinin yapmış olduğu (58) çalışmada bulunmaktadır. Literatürde bulunan bu çalışmada küçük (small) grafen oksit olarak adlandırıldığı için tez boyunca sGO ifadesi kullanılmıştır.

#### 3.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

##### 3.2.1.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

Bu tez çalışmasında ATCC’ den ticari olarak temin edilmiş iki farklı kanser hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar MCF7 ( insan meme kanseri) ve U87MG (insan glioblastoma) hücre hatlarıdır. Bu iki hücre hattının pasaj numarası, kültür ortamı gibi içerikleri Çizelge 3.2’ de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Hücre tipleri, pasaj numaraları ve hücre besiyeri içeriği

Pasaj No	Hücre Hattı	Hücre Adı	Ortam İçeriği
10	MCF7	Human Breast Cancer Cells	MEM + % 10 FBS + % 1 Penisilin/Streptomisin
15	U87	Human Glioblastoma Cells	MEM + % 10 FBS + % 1 Penisilin/Streptomisin

Bu tez çalışması için, yapılan literatür araştırması sonucunda MCF7 ve U87 hücre hatlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürden elde edilen veriler doğrultusunda MCF7 ve U87 hücre hatlarının tümör yapısı oluşturmaları ve bu tez çalışmasında da 3-boyutlu kültür ile bu tümör yapıları taklit edileceğinden MCF7 ve U87 hücre hatları kullanılmıştır. MCF7 ve U87 hücre hatlarının kültür edilebilmeleri için; sterilizasyonu ultraviyole ışık ile sağlanan Laminar sınıf II kabin kullanılmıştır. MCF7 ve U87 hücre hatları için; Minimum Essential Medium (MEM) besiyeri içine % 1 penisilin streptomisin ve % 10 fetal bovin serum (FBS) eklenmesiyle besiyeri hazırlanmıştır. MCF7 ve U87 hücre hatları hazırlanan bu besiyerinde; koşulları 37 °C sıcaklığında ve % 5 CO<sub>2</sub> yoğunluğunda olan inkübatörde inkübe edilmiştir.

### **3.2.1.2. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Hücre Sayımı**

Kültür edilen hücrelerin devamlılığını sağlamak ve metabolik atıklardan uzaklaştırmak adına hücreler pasajlanmıştır. Çalışmalar için uygun olan hücre yoğunluklarının belirlenmesi için hücrelerin sayımı yapılmıştır.

İnkübatörden çıkarılan kültür kapları aspire edilerek eski besiyerinden arındırılmıştır. Daha sonra serum ve metabolik atıkları uzaklaştırmak için 10-13 mililitre (ml) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ile yıkanmıştır. Kültür kabı içinde bulunan DPBS aspire edilmiştir ve bu sayede ölü hücrelerden de kültür arındırılmıştır. Kültür kabının tüm yüzeyini kaplayacak şekilde 1,5 ml tripsin-EDTA eklenmiştir. Kültür kabı 1-2 dakika (dk) boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Bekleme süresinden sonra inkübatörden çıkartılan kültür kabı ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir. Tripsin sayesinde kültür kabına yapışan hücreler kültür kabından ayrılmıştır. Ayrılan hücreler birbirlerine yapışıp kümelenmeler oluşturduysa kültür kabına hafifçe vurup bu kümelenmelerin ayrılması sağlanmıştır. Eklenen tripsin miktarının 3 katı kadar (4,5 ml) besiyeri kültür kabının tüm yüzeyini kaplayacak şekilde ilave edilmiştir. Nazikçe pipetaj yapılarak hücrelerin besiyeri içerisinde homojen dağılması sağlanmıştır. Hücre yoğunluğuna göre belirli oranda hücre süspansiyonu kültür kapında bırakılmış kalan hücre süspansiyonu atılmıştır. Belirli oranda kültür kabına bırakılan hücre süspansiyonunun üzerine 13-14 ml besiyeri ilave edilmiştir ve kültür kabı inkübatöre kaldırılmıştır. Böylece hücrelerin pasajlanma işlemi tamamlanmıştır.



Hücrelerin sayımı için; tripsin (1,5 ml) eklenmesi ile kültür kabından ayrılan hücrelerin üzerine besiyeri (4,5 ml) eklenmiştir. Hücre süspansiyonu falkon tüpte toplanmıştır. Falkon tüpler soğutmalı santrifüjde 5 dk boyunca +4 °C' de 11.000 rpm de santrifüjlenmiştir. Pellet kısmına dokunmadan süpernatant atılmış, falkon tüpe nazikçe vurularak içinde bulunan pellet çözdürülmüştür. Falkon tüp üzerine 5 ml' ye tamamlanacak şekilde besiyeri ilave edilmiştir. Hücrelerin besiyerinde homojen şekilde dağılması için falkon tüp hafifçe sağa sola sallanmıştır. Hücre süspansiyonundan 10-15 µl alınarak hücre sayımı için hemositometre lamına koyulmuştur ve ters ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapılmıştır.

Hemositometri lamında sayım yapabilmek için 10-15 µl hücre süspansiyonundan alınır ve hemositometri lamı ve üzerini kapatan lamel arasına mikropipet yardımı ile koyulur. Ters ışık mikroskobu altında hemositometri lamından hücreler sayılır. Sayım sırasında çok daha parlak görünen hücreler ölü hücrelerdir. Hemositometri lamında 4 büyük kare alan bulunmaktadır ve her bir karenin alanı  $1 \text{ mm}^2$  dir. Hemositometri lamı ve üzerine kapatılan lamel arasında kalan boşluk ise  $0,1 \text{ mm}$  dir. Böylece lam üzerindeki her büyük karenin hacmi  $0,1 \text{ mm}^3$  dür. Hemositometri lamına hücre solüsyonu eklendikten sonra bu dört büyük karedeki hücreler sayılır ve ortalaması alınır.  $0,1 \text{ mm}^3$  hacimdeki hücre sayısını ml cinsinden hesaplamak için ( $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$ ) standardı kullanılır. Ortalama hücre sayısı 10.000 ile çarpılır ve bu şekilde 1ml içinde kaç hücre olduğu hesaplanmış olur.

### **3.2.1.3. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi**

Deneylemlerin tekrarlanması ve ilerideki çalışmalar düşünüldüğünde kültür edilen hücre hatları dondurularak yedeklenmiş ve saklanmıştır.

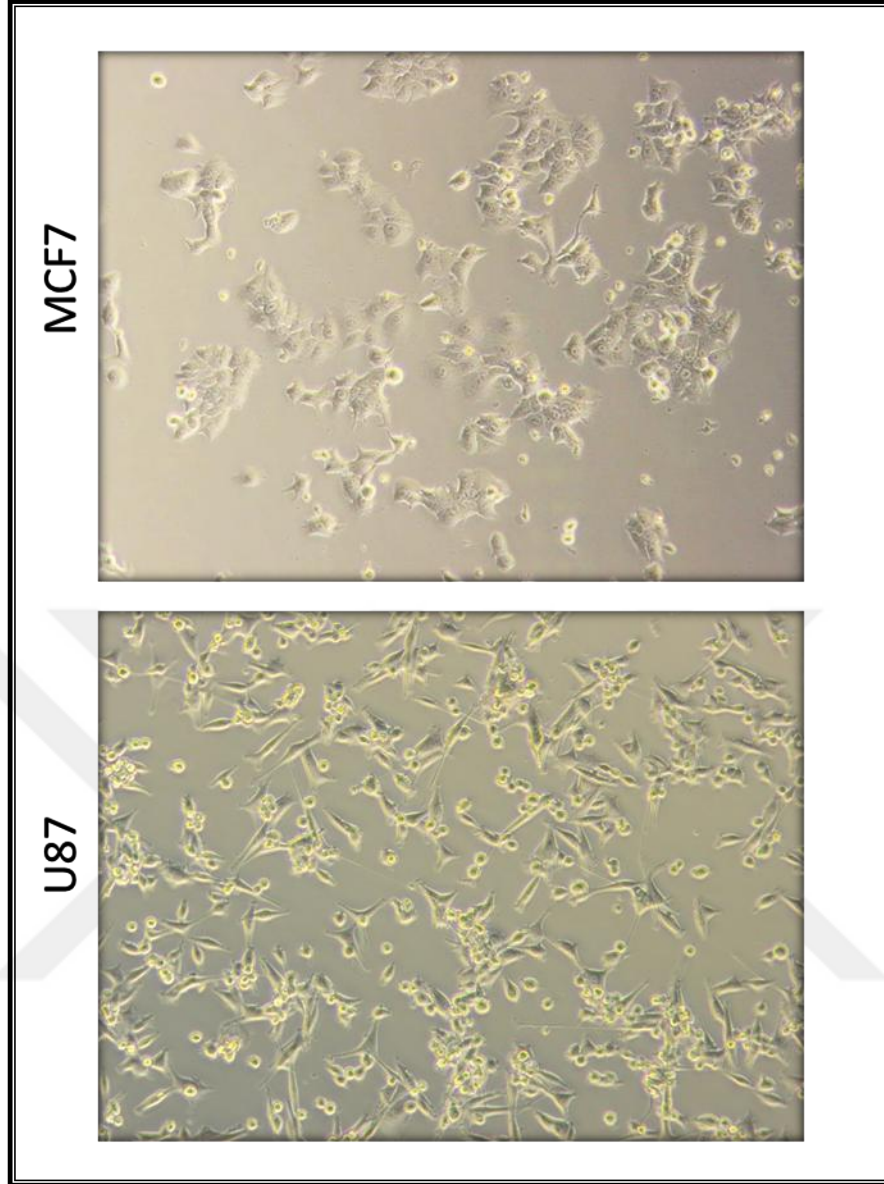
Hücrelerin dondurulması için özel bir solüsyon olan dondurma solüsyonu hazırlanmıştır. Bu dondurma solüsyonu için 9:1 oranında FBS ve DMSO kullanılmıştır (%90 FBS, %10 DMSO (dimetilsülfoksit)). Kültür kabını tamamen kaplayan hücreler aspire edilmiştir ve DPBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin tüm yüzeyine gelmesine dikkat edilerek 1,5 ml tripsin-EDTA eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Eklenen tripsinin 3 katı (4,5 ml) besiyeri eklenmiştir ve hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarılmıştır. Hücreler soğutmalı santrifüjde 5 dk boyunca +4 °C' de 11.000 rpm de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atılmış ve pellet falkon tüpe nazikçe vurularak çözülmüştür. Çözülen pelletin üzerine 3 ml dondurma solüsyonu eklenmiştir ve pipetej yaparak hücrelerin

dondurma solüsyonu içerisinde homojen dağılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu 1'er ml alınarak dondurma tüplerine eklenmiştir. Tüplerin üzerine tarih, pasaj sayısı ve araştırmacının ismi yazılmıştır. Tüpler Mr frosty kabına koyulup -80°C' ye kaldırılmıştır. Bir gün sonra tüpler -80°C' den alınıp -196°C' lik ısıya sahip olan azot tankına kaldırılmıştır. Dondurma işkemi sayesinde hücreler çoğaltılmadan dondurularak muhafaza edilmiştir.

Deneilerin tekrarlanması durumunda dondurulan hücreler çözülerek tekrar kullanılmıştır. Azot tankından çıkarılan dondurma tüpleri 37°C' lik su banyosunda 30 saniye ile 1 dakika arasında bekletilmiştir. Kültür kabına 5-6 ml besiyeri eklenmiştir. Dondurma tüpleri içinde bulunan hücre süspansiyonunun erimesinin ardından, eriyen hücre solüsyonu kültür kabındaki besiyeri üzerine aktarılmıştır. Daha sonra kültür kabı 37 °C sıcaklığında ve % 5 CO<sub>2</sub> yoğunluğunda olan inkübatörde inkübe edilmiştir. Bir gün sonunda DMSO artıklarından kurtulmak için besiyeri değiştirilmiştir. Eğer hücreler pasajlamak için hazır ise pasajlanmıştır.

#### **3.2.1.4. Kanser Hücre Hatlarından 2-Boyutlu Kültür Elde Edilmesi**

MCF7 ve U87 hücre hatlarının uygun koşullarda kültür edilmesiyle yeterli yoğunluğa gelmesi sağlanmıştır. Kültür kabının tüm yüzeyine gelecek şekilde 3 ml tripsin eklenmiştir. Tripsin eklenmesiyle kalkan hücrelerin üzerine 4,5 ml besiyeri ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Falkon tüpe hafifçe vurarak pelletin çözünmesi sağlanmıştır ve üzerine 5 ml' ye tamamlanacak şekilde besiyeri ilave edilmiştir. Her kuyu başına  $2 \times 10^4$  hücre gelecek şekilde hücreler hemositometre lamında sayılmıştır ve 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Bu plakalar 37 °C sıcaklığında ve % 5 CO<sub>2</sub> yoğunluğunda olan inkübatörde inkübe edilmiştir. Kültür kabından alınıp 24 kuyucuklu plakalara ekilen MCF7 ve U87 hücre hatlarının gelişmesi beklenmiştir. MCF7 ve U87 hücre hatlarının gelişimi hergün ters ışık mikroskobu altında gözlenmiştir ve görüntüleri alınmıştır.



Şekil 3.1. MCF7 ve U87 hücre hattına ait ters ışık mikroskop görüntüsü (10X)

### 3.2.1.5. Kanser Hücre Hatlarından 3-Boyutlu Tümör Sferoid Oluşturulması

MCF7 ve U87 hücre hatlarının 2-boyutlu kültüründen, 3-boyutlu kültür elde etmek için özel koşullar oluşturulmuştur. İki boyutlu kültürden, 3-boyutlu tümör sferoid oluşturabilmek için 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları % 1' lik agar ile kaplanmıştır. Bu agar kaplı 96 kuyucuklu plakaları hazırlamak için; 1 gram (g) agar tartılıp 100 ml distile su ( $dH_2O$ ) içinde çözdürülmüştür. Bu çözelti sterilizasyon ve agarın daha iyi çözünebilmesi için otoklavlanmıştır. Otoklavlanan agar çözeltisi yaklaşık  $50^{\circ}C$ ' ye gelene kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Soğuması sağlanan agar çözeltisi çok kanallı pipet yardımı ile 96 kuyucuklu plakalara 100' er  $\mu$ l eklenmiştir. Agar çözeltisinin daha çok soğuyarak

jelleşmesi beklenmiştir. Bu işlem sayesinde 3-boyutlu tümör sferoid oluşturabilmek için %1' lik agar kaplı 96 kuyucuklu plakalar hazırlanmıştır.

Kültür kaplarında kültür edilen MCF7 ve U87 hücre hatları tripsinlenerek (1,5 ml tripsin) kültür kabından kalkması sağanmıştır. Tripsinin 3 katı kadar besiyeri (4,5 ml) ilave edilmiştir. Hücre süspansiyonu falkon tüplere alınarak 11.000 rpm' de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılmış ve kalan pelletin çözdürülmesi için falkon tüpe hafifçe vurulmuştur. Çözülen pelletin üzerine 5 ml' ye tamamlanacak şekilde besiyeri ilave edilmiştir. Her kuyucuğa  $1 \times 10^4$  hücre gelecek şekilde hücreler hemositometre lamında sayılmıştır ve 96 kuyucuklu %1 agar kaplı plakalara ekilmiştir. MCF7 ve U87 hücre hatları %1' lik agar kaplı plakalara ekildikten sonra 37 °C sıcaklığında ve % 5 CO<sub>2</sub> yoğunluğunda olan inkübatörde inkübe edilmiştir. Agar kaplı plakalara ekilen MCF7 ve U87 hücre hatlarının 3-boyutlu tümör sferoid oluşturması beklenmiştir ve hergün ters ışık mikroskobunda gözlemlenerek görüntülenmiştir.

#### **3.2.1.6. 2-Boyutlu Kültürü Elde Edilen Kanser Hücre Hatlarına sGO Verilmesi**

İki boyutlu kültür elde etmek için, kültür kaplarından 24 kuyucuklu plakalara aktarılan MCF7 ve U87 hücre hatlarına 24 saat sonra small grafen oksit (sGO) verilmiştir. Ana stoktaki derişimi 2,5 mg/ml olan grafen oksit, 10 µg/ml ve 100 µg/ml olacak şekilde iki farklı derişimde hazırlanmış. Derişim hesabı yapılan grafen oksit ve besiyeri falcon tüp içine alınmıştır ve iyice vortekslenmiştir. İnkübatörden çıkartılan 24 kuyucuklu plakalardan besiyeri aspire edilmiştir. Ardından iki farklı derişimde hazırlanan grafen oksit çözeltisi 24 kuyucuklu plakadaki belirlenen kuyucuklara 300' er µl olacak şekilde dağıtılmıştır. MCF7 ve U87 hücre hatlarının ekildiği plakalarda belirli miktardaki kuyucuklar kontrol grubu olarak ayrılmıştır ve grafen oksit verilmemiştir. Grafen oksit verilen plakalar inkübatöre kaldırılmıştır ve 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 24 kuyucuklu plakalardan grafen oksit çözeltisi aspire edilmiştir ve her kuyuya 300' er µl yeni besiyeri eklenmiştir. Ters ışık mikroskobunda incelenen ve görüntüleri alınan hücreler tekrar inkübatöre kaldırılmıştır. Grafen oksit verilen 2-boyutlu kültür 2, 4, 6 ve 7. günlerde ters ışık mikroskobu altında gözlemlenmiş ve görüntüleri alınmıştır.

### **3.2.1.7. 3-Boyutlu Kültürü Elde Edilen Kanser Hücre Hatlarına sGO Verilmesi**

Kültür kaplarından %1 agar kaplı 96 kuyucuklu plakalara aktarılan MCF7 ve U87 hücre hatlarının 3-boyutlu tümör sferoid oluşturup oluşturmadığına ters ışık mikroskobu altında bakılmıştır. Agar kaplı 96 kuyucuklu plakalara aktarılan MCF7 ve U87 hücre hatları yaklaşık 3 gün (72 saat ) sonunda 3-boyutlu tümör sferoid oluşturmuşlardır. Üç boyutlu tümör sferoid oluşumunun ardından MCF7 ve U87 hücre hatlarına grafen oksit verilmiştir. Ana stoktaki derişimi 2,5 mg/ml olan grafen oksitten 10 µg/ml ve 100 µg/ml olacak şekilde iki farklı derişimde hazırlanmış. İki farklı derişimde hazırlanan grafen oksit ve besiyeri falkon tüp içerisine alınmıştır ve iyice vortekslenmiştir. İnkübatörden alınan 96 kuyucuklu plakalar tümör sferoidlerin yerinden kalkmamasına dikkat edilecek şekilde aspire edilmiştir. Hazırlanan 2 farklı derişimdeki grafen oksit çözeltisi 100' er µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtılmıştır. Belirli miktardaki kuyucuklardaki sferoidler kontrol grubu olarak ayrılmıştır ve grafen oksit verilmemiştir. Grafen oksit çözeltisi verilen sferoidler 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Dört saatlik inkübasyonun ardından 96 kuyucuklu plakalar inkübatörden alınmıştır. Grafen oksit çözeltisi sferoidleri yerinden kaldırmadan aspire edilmiştir. Her kuyucuğa 150' şer µl olacak şekilde yeni besiyeri eklenmiştir. Ters ışık mikroskobunda incelenen ve görüntüleri alınan 3-boyutlu tümör sferoidler tekrar inkübatöre kaldırılmıştır. Grafen oksit verilen 3-boyutlu tümör sferoidler 2, 4, 6 ve 10. günlerde ters ışık mikroskobu altında gözlemlenmiş ve görüntüleri alınmıştır.

### **3.2.1.8. sGO Verilen 2-Boyutlu Kültürden Hücre Sayımı ve Hücre Canlılık Testi**

MCF7 ve U87 kanser hücre hatlarından 2-boyutlu kültür elde edildikten sonra 2 farklı derişimde grafen oksit verilmiştir. Grafen oksitin kanser hücrelerinin sayısı üzerine ne gibi bir etki gösterdiğini anlamak için hücre sayımı yapılmıştır. Grafen oksit muamelesinden 2 gün sonra 2-boyutlu kültür tripsinlenerek (1,5 ml tripsin-EDTA) hücreler 24 kuyucuklu plakalardan kaldırılmıştır ve üzerlerine besi yeri eklenmiştir. Kontrol grubu olarak ayrılan, grafen oksit verilmeyen hücreler ile iki farklı derişimde grafen oksite maruz kalan hücreler farklı tüplere alınmıştır. Hemositometri lamına 10-15 µl alınarak MCF7 ve U87 hücre hatlarına ait olan 3' er grubun (kontrol, 10 µg/ml GO, 100 µg/ml GO) sayımı yapılmıştır.

Grafen oksit muamelesinden sonra hücrelerin canlılığını kontrol etmek adına hücre canlılık testi yapılmıştır. Hücre canlılık testinin planlanması ile birlikte kültür kabında geliştirilen hücreler 96 kuyucuklu plakalara  $1 \times 10^4$  hücre ekilmiştir ve 24 saat sonra 2 farklı derişimde

GO verilmiştir (10 µg/ml GO, 100 µg/ml GO). Ayrıca yine kontrol grubu oluşturulmuştur ve kontrol grubuna GO verilmemiştir.

Grafen oksit muamelesinden 2 gün sonra hücre canlılık testi için Alamar Blue™ Cell Viability Reagent kiti ticari olarak temin edilmiştir ve kullanılmıştır. Alamar Blue solusyonunu hazırlamak için her kuyucuk başına (10 µl alamar blue + 100 µl besiyeri) gelecek şekilde çözelti hazırlanmıştır ve iyice vortekslenmiştir. İnkübatörden çıkarılan 96 kuyucuklu plakalar aspire edilmiştir ve her kuyucuk başına 100' er µl Alamar Blue solüsyonu gelecek şekilde dağıtılmıştır. İnkübatörde 37 °C' de ve % 5 CO<sub>2</sub> yoğunluğunda 1-4 saat arasında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 96 kuyucuklu plakalardan çekilen Alamar Blue çözeltisi yeni bir 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir. Eski plaka DPBS ile yıkanmıştır ve yeni besiyeri eklenmiştir ve inkübatöre kaldırılmıştır. Yeni 96 kuyucuklu tabaklara eklenen Alamar Blue solüsyonu sonrasında 570 nm dalga boyunda Clariostar Omega mikroparka okuyucu (BMG Labtech, Almanya) ile analiz edilmiştir. Alamar Blue çözeltisinin hazırlanması, hücrelere verilmesi ve analiz aşamasına kadar ışıktan korunmuştur.

### **3.2.1.9. sGO Verilen 3-Boyutlu Tümör Sferoid Kültüründen Hücre Sayımı ve Hücre Canlılık Testi**

MCF7 ve U87 hücre hatlarının 3-boyutlu tümör sferoid oluşturmasının ardından, GO ile muamele edilmesinin hücre sayısı ve canlılığına nasıl etki ettiğini anlamak için hücre sayımı ve canlılık testi yapılmıştır.

İki farklı derişimdeki grafen oksit ile muamele edilen sferoidler ve kontrol grubundaki sferoidler her bir tüpe 8-10 sferoid gelecek şekilde alınmıştır. Tüplere alınan sferoidler 11.000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Tüplerin üzerine besiyeri eklenmiştir ve pipetaj yaparak mekanik kuvvet ile sferoidlerin parçalanması sağlanmıştır. Hemositometri lamına 10-15 µl alınarak MCF7 ve U87 hücre hatlarına ait olan 3' er sferoid grubunun (kontrol, GO 10 µg/ml, GO 100 µg/ml) hücre sayımı yapılmıştır.

Grafen oksit muamelesinden 10 gün sonra hücre canlılık testi için ticari olarak temin edilen Alamar Blue™ Cell Viability Reagent kiti kullanılmıştır. Alamar Blue solusyonunu hazırlamak için her kuyucuk başına (10 µl alamar blue + 100 µl besiyeri) gelecek şekilde çözelti hazırlanmıştır ve iyice vortekslenmiştir. Sferoidlerin hücre sayımı için

parçalanmasından sonra 96 kuyucuklu plakalara alınmıştır. Her kuyucuk için 100 µl Alamar Blue solüsyonu eklenmiştir ve 37 °C' de ve % 5 CO<sub>2</sub> yoğunluğunda 1-4 saat arasında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 96 kuyucuklu plakalardan Alamar Blue solüsyonu alınıp yeni 96 kuyucuklu plakalara eklenmiştir ve 570 nm dalga boyunda Clariostar Omega mikroparka okuyucu (BMG Labtech, Almanya) ile analiz edilmiştir. Alamar Blue çözeltisinin hazırlanması, hücrelere verilmesi ve analiz aşamasına kadar ışıktan korunmuştur.

### **3.2.2. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU**

#### **3.2.2.1. RNA İzolasyonu**

MCF7 ve U87 hücre hatlarından elde edilen 2-boyutlu ve 3-boyutlu hücre kültürlerinin RNA izolasyonu için Macherey-nagel Nucleo Spin RNA Mini Kit kullanılmıştır.

İki boyutlu kültür için, sGO muamelesinden 2 gün sonra inkübatörden çıkarılan 24 kuyucuklu plaka aspire edilmiştir. Hücreler 10 ml DPBS ile yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa 250 µl tripsin-EDTA eklenerek 37°C' de, % 5 CO<sub>2</sub> yoğunluğunda olan inkübatöre kaldırılmıştır. Plakadan ayrılan hücrelere 1.250 µl besi yeri eklenmiştir ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Hücreler hemositometri lamı ile sayılarak  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde tüplere aktarılmıştır ve 5 dk boyunca 11.000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı aspire edilmiştir. Macherey-nagel Nucleo Spin RNA Mini Kit içinden çıkan 25 ml' lik liziz solüsyonu üzerine 250 µl β-merkaptolanol eklenmiştir ve liziz solüsyonu hazır hale getirilmiştir. Tüp içinde kalan pelletin üzerine 350 µl liziz solüsyonu eklenmiştir ve tüpler -20°C' ye kaldırılmıştır. Örneklerden daha sonra Macherey-nagel Nucleo Spin RNA Mini Kit içerisinde belirlenen protokole göre RNA izolasyonu yapılmıştır. En son aşamada tüp içinde izole edilmiş RNA üzerine 50 µl nükleaz-free H<sub>2</sub>O eklenmiştir ve örnekler -20°C' ye kaldırılmıştır.

Üç boyutlu tümör sferoid kültürler için, grafen oksit muamelesinden 7 gün sonra sferoidler RNA izolasyonu için toplanmıştır. Sferoidler her bir tüpe 8-10 sferoid gelecek şekilde alınmıştır. Tüplerin üzerine 1.500 µl besiyeri eklenmiştir ve pipetaj yaparak mekanik kuvvet ile sferoidlerin parçalanması sağlanmıştır. Hücreler hemositometri lamı ile sayılarak  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde tüplere aktarılmıştır ve 11.000 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı aspire edilmiştir. Macherey-nagel Nucleo Spin RNA Mini Kit

içinden çıkan liziz solüsyonu her tüpe 350 µl gelecek şekilde eklenmiştir ve tüpler -20°C' ye kaldırılmıştır. Örneklerden daha sonra Macherey-nagel Nucleo Spin RNA Mini Kit içerisinde belirlenen protokole göre RNA izolasyonu yapılmıştır. En son aşamada tüp içinde izole edilmiş RNA üzerine 50 µl RNase-free H<sub>2</sub>O eklenmiş ve örnekler -20°C' ye kaldırılmıştır.

### **3.2.2.2. cDNA Sentezi**

MCF7 ve U87 hücre hatlarından 2-boyutlu ve 3-boyutlu kültürlerin elde edilmesinin ardından RNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen RNA' lardan cDNA sentezi için ticari olarak temin edilen iscript cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. iscript cDNA Synthesis Kit protokolüne göre RNA miktarı 1.000 nanogram (ng) olarak hesaplanmıştır. Örnek başına iscript cDNA Synthesis Kit içinde bulunan; iScript Reverse transkriptase enzimden 1 µl + iScript reaction mix' den 4 µl alınarak cDNA sentez solüsyonu hazırlanmıştır. cDNA sentez solüsyonundan 5 µl alınarak, 1.000 ng olarak hesaplanan RNA' ların üzerine eklenmiştir. BIORAD termal cyler cihazı ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi 25dk 25°C' de, 30dk 42°C' de ve 5dk 85°C' de tamamlanmıştır. Sentezlenen cDNA' lar 1:2 oranında RNase-free H<sub>2</sub>O ile seyreltilip, -20°C' de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Makrogen firması tarafından polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) için dizayn edilen primerler kullanılmıştır. Primer dizilerin detayları Ek-1'de bulunmaktadır. Ticari olarak elde edilen liyofilize primerler iyonize su ile sulandırılmıştır ve ana stok oluşturulmuştur. Son derişim 5 pmol/µl olacak şekilde stok primerler sulandırılmıştır.

PZR reaksiyonu için ticari olarak temin edilen SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix protokolüne göre reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Buna göre; herbir örnek için

- 10 µl SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix
- 1 µl İleri (Forward) Primer
- 1 µl Geri (Reverse) Primer
- 6 µl Nükleaz-free H<sub>2</sub>O kullanılmıştır.



Herbir örnek için PZR reaksiyon karışımı 18 µl olarak 96 kuyucuklu PZR plakalarına dağıtılmıştır. Üzerlerine 2 µl cDNA eklenmiştir ve toplam hacim her kuyucuk için 20 µl olmuştur. BİO-RAD termal cycler (CFX96) cihazlarında belirlenen protokole göre;

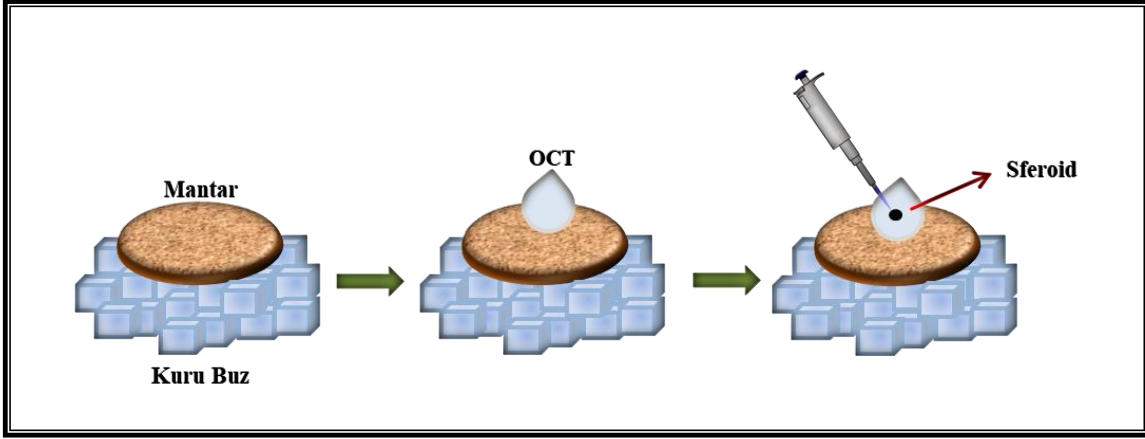
- Başlangıç denatürasyonu 95°C’ de 10 dakika
- Uzama 95°C’ de 15 saniye (40 döngü)
- Son uzama 60°C’ de 1dakika (40 döngü)

inkübe edilmiştir.

PCR reaksiyonundan sonra mRNA miktarlarının hesaplanması için  $\Delta\Delta Ct$  denklemi kullanılmıştır. Elde edilen örnekler için kontrol grubuna göre gen ifade miktarını hesaplamak için cycle threshold (ct) değeri kullanılmıştır. Örneklerin kullanılan referans gen ile aralarındaki fark hesaplanmıştır ( $\Delta Ct$ ). Daha sonra analizi yapılacak olan örneklerin  $\Delta Ct$  değeri ile kontrol grubunun  $\Delta Ct$  değeri arasındaki fark bulunmuştur ve  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  denklemi kullanılarak analizler yapılmıştır.

### **3.2.3. HİSTOLOJİK ANALİZLER**

MCF7 ve U87 kanser hücre hatlarından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin grafen oksit muamelesinden sonra histolojik analizlerinin yapılabilmesi için ultra ince kesitleri alınmıştır. Ultra ince kesitlerin elde edilebilmesi için öncelikle sferoidleri dondurma işlemi yapılmıştır. Bunun için OCT doku dondurma solüsyonu kullanılmıştır. Dondurma işlemi sırasında ortamın soğuk olmasını sağlamak adına kuru buz kullanılmıştır. Çapı 2,5 cm, kalınlığı 2 mm olan bozuk para şeklindeki mantar tabakalar kuru buz üzerine koyulmuştur ve bu mantar tabakaların üzerlerine 1’er damla OCT damlatılmıştır. Yaklaşık 30 saniye sonra donmaya başlayan OCT damlasının içine, pipet yardımı ile alınan sferoidler koyulmuştur ve sferoidlerin OCT damlasının tam merkezine gelmesi sağlanmıştır. Bu aşamada kullanılan sferoidler, grafen oksit muamelesine uğrayan ve 7’nci gününde olan sferoidlerdir. İçerisine sferoid koyulan OCT damlaları kuru buz üzerinde tamamen donduktan sonra -80°C’ de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Sferoidlerin doku dondurma solüsyonu (OCT) ile dondurulma aşaması

OCT dondurma solüsyonu içinde dondurulan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de saklanan sferoidler ultra ince kesitlerinin alınması için Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi' ne gönderilmiştir. Burada ultra kesitleri alınarak lam üzerine sabitlenmiştir. Ultra ince kesitlerin sabitlendiği lamlar  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

### 3.2.3.1. İmmünofloresan Boyamalar

MCF7 ve U87 hücre hatlarından elde edilen, lam üzerine sabitlenmiş sferoidlerin ultra ince kesitleri  $-20^{\circ}\text{C}$ ' den çıkartılmıştır. Hidrofobik kalem yardımı ile sferoid kesitlerinin üzerine gelmeyecek şekilde kesitler halka içine alınmıştır. Bu sayede immünofloresan boyama esnasında eklenecek olan solüsyonların lam üzerinden akıp gitmemesi sağlanmıştır. Sabitlenen ve hidrofobik kalem ile halka içine alınan kesitlerin üzerine  $100' \text{ er } \mu\text{l}$  DPBS eklenmiştir ve 5 dk beklenmiştir. Spesifik olmayan bağlanmalara karşı sferoid kesitlerini bloke edecek solüsyon hazırlanmıştır. Bloke etmek için hazırlanan solüsyonda;  $100 \text{ ml}$  DPBS içine % 1 Bovine Serum Albumin (BSA) eklenmiştir ve iyice vortekslenmiştir. Ardından % 0.1 Triton X-100 eklenmiştir ve tekrar vortekslenmiştir. Kesitlerin üzerine eklenen DPBS çekilmiştir ve her kesitin üzerine yaklaşık  $100' \text{ er } \mu\text{l}$  spesifik olmayan bağlanmalara karşı hazırlanan solüsyondan eklenmiştir ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kesitler DPBS ile yıkanmıştır. Boyama için kullanılacak olan monoklonal antikolar hazırlanmıştır. Fibronektin (1:200), integrin (1:100), laminin (1:200), kollojen (1:200) antikoları belirlenen derişime göre bloke etmek için hazırlanan solüsyonda (% 98 DPBS + % 1 BSA + % 1 Triton X-100) seyreltilmiştir. Fibronektin ve integrin aynı tüpte hazırlanırken laminin ve kollojende aynı tüpte hazırlanmıştır. Yıkama işleminden sonra hazırlanan monoklonal antikolar belirlenen kesitlerin üzerine  $100' \text{ er } \mu\text{l}$

eklenmiştir ve 1 gece boyunca + 4°C’ de inkübe edilmiştir. Bir gecelik inkübasyonun ardından kesitler 3 kez DPBS ile yıkanmıştır. Bu aşamada ikincil antikor hazırlanmıştır. İkincil antikorların hazırlanmasından inkübasyon aşamasına kadar karanlık ortamda çalışılmıştır. Bunun için keçi-anti-fare Alexafluor 488 (1:500) ve Alexafluor 546 (1:400) ikincil antikorları belirtilen derişime göre bloke etmek için hazırlanan solüsyonda (% 98 DPBS + % 1 BSA + % 1 Triton X-100) seyreltilmiştir. Yıkama işleminin ardından ikincil antikorlar kesitlerin üzerine 100’ er µl eklenerek 1,5 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Kesitler inkübasyon işleminden sonra 3 kez DPBS ile yıkanmıştır. Hücre çekirdeğini boyamak için 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (1:100) oranında seyreltilerek kesitlerin üzerine eklenmiştir. Boyanan kesitler EVOS Floresan mikroskop altında incelenmiştir.

Proliferasyon belirteci olan Ki67 ile yapılan immünofloresan boyama hem 2-boyutlu hemde 3-boyutlu kültürler üzerinde yapılmıştır. Üç boyutlu tümör sferoidlerin Ki67 ile boyanması yukarıda belirtilen protokol ile aynı şekilde yapılmıştır. Ultra ince kesitleri alınan sferoidler önce bloklama solüsyonu eklenmiş daha sonra birincil antikor olan Ki67 (1:400) belirtilen derişimde eklenmiştir. Bir gecelik inkübasyonun ardından ikincil antikor olan Alexafluor 546 (1:400) eklenmiştir ve çekirdek boyası olan DAPI ile de boyanarak floresan mikroskop altında görüntüleri alınmıştır.

İki boyutlu kültürlerin Ki67 ile immünofloresan boyamasının yapılabilmesi için önce hücreler 24 kuyucuklu plakalara sabitlenmiştir. Bu sabitleme işlemi için önce hücreler üzerinde bulunan besiyeri aspire edilmiştir. Daha sonra 3 kez DPBS ile hücreler yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından -20°C’ de muhafaza etilen soğuk metanolden her kuyucuğa 300’ er µl eklenmiştir ve 24 kuyucuklu kültür plakaları -20°C’ de 15 dk bekletilmiştir. Eklenen metanol aspire edilmiştir ve kuyucukların dibinde kalan metanolün kuruması beklenmiştir. Kuruduktan sonra 24 kuyucuklu hücre kültür plakaları -20°C’ de saklanmıştır. Bu şekilde hücreler kültür plakasına sabitlenmiştir.

Sabitleme işleminden sonra 2-boyutlu kültür proliferasyon belirteci olan Ki67 ile boyanmıştır. Boyanma işlemi yukarıda ayrıntılı olarak verildiği gibi önce spesifik olmayan bağlanmalara karşı bloke edici solüsyon eklenmiştir. Daha sonra yıkanmış ve birincil antikor olan Ki67 eklenmiştir. Bir gecelik inkübasyondan sonra ikincil antikor olan

Alexafluor 546 (1:400) eklenmiştir ve çekirdek boyası olan DAPI ile de boyanarak floresan mikroskop altında görüntüleri alınmıştır.

### **3.2.3.2. Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) Görüntüsü**

Grafen oksit muamelesine uğrayan ve 7'nci gününde olan sferoidlerin ultra ince kesitleri alındıktan sonra, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nde Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM) kullanılarak görüntüler alınmıştır.

### **3.2.3.3. Toluen Mavisi Boyaması**

Grafen oksit muamelesine uğrayan ve 7'nci günde dondurularak ultra ince kesitleri alınan sferoidlerin, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nde tolüen mavisi boyaması yapılmıştır.

### **3.2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

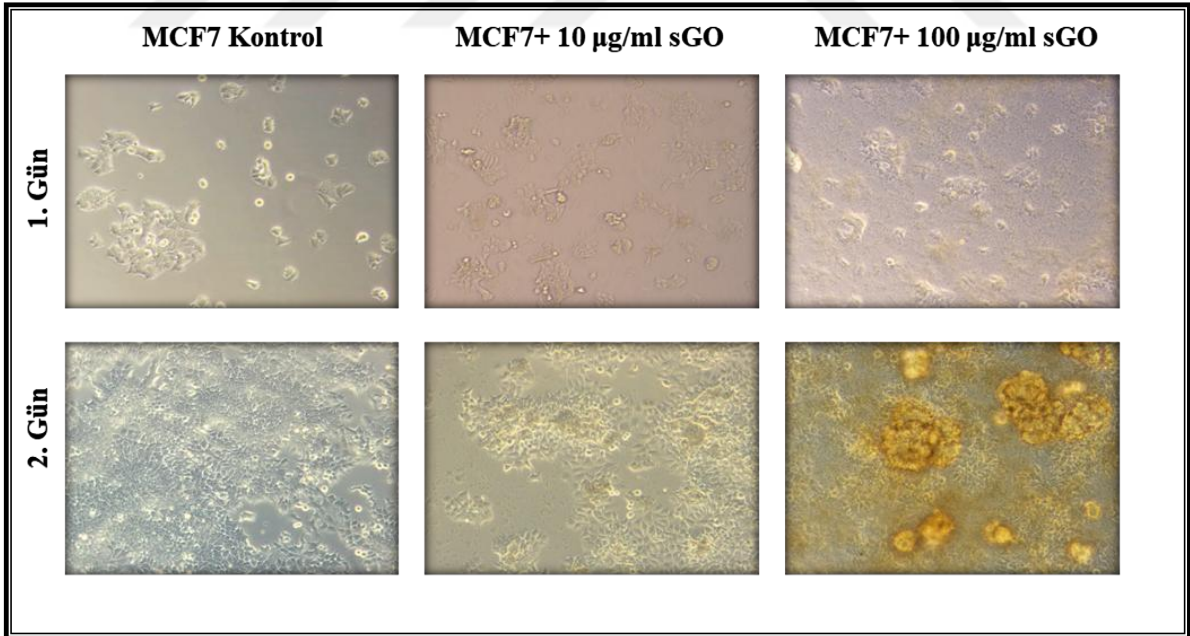
Bu tez çalışmasındaki istatistiksel analizler Anova Two Way Tukey' in ikili karşılaştırma ve varyans analizi SPSS yazılımının 25 sürümü (build number 1.0.0.1012) kullanılarak yapılmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. KANSER HÜCRE HATLARINDAN ELDE EDİLEN 2-BOYUTLU KÜLTÜRÜN GÖRÜNTÜLENMESİ

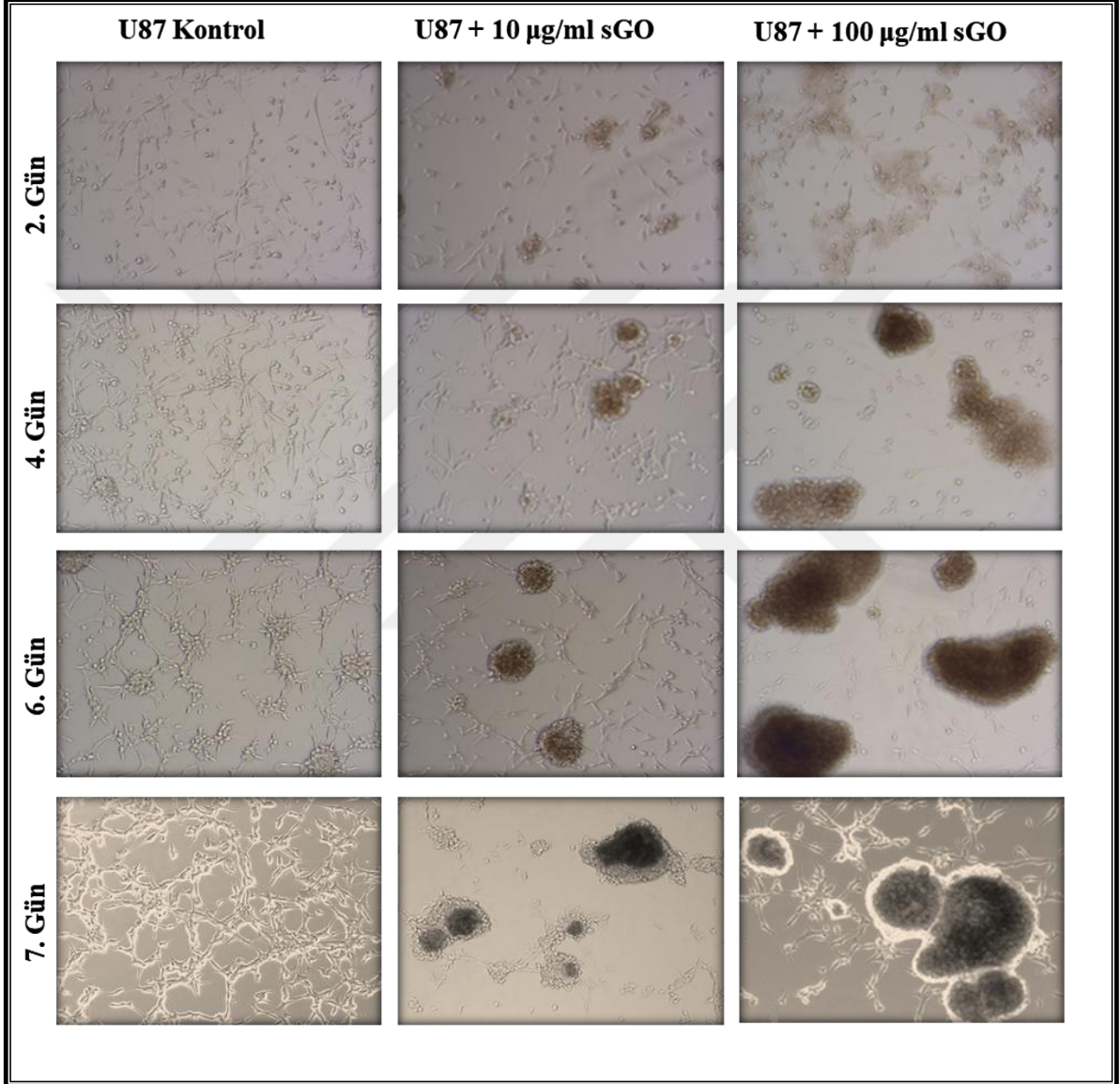
MCF7 ve U87 kanser hücre hatları; Minimum Essential Medium (MEM) besiyeri içine % 1 penisilin streptomisin ve % 10 fetal bovin serum (FBS) bulunan besiyerinde kültür edilmiştir. Koşulları 37 °C sıcaklığında ve % 5 CO<sub>2</sub> yoğunluğunda olan inkübatörde inkübe edilerek 2-boyutlu kültür elde edilmiştir. İki boyutlu kültürün eldesinden sonra iki farklı derişimde sGO ile muamele edilmiştir (10 µg/ml sGO, 100 µg/ml sGO). sGO muamelesinden sonra 2, 4, 6 ve 7' inci günlerde ters ışık mikroskobu altında görüntüleri alınmıştır.

sGO muamelesine uğrayan 2-boyutlu MCF7 hücre kültüründe 2 gün sonunda sGO derişiminin artması ile birlikte hücrelerin birbirine yaklaştığı ve kümelenmeler oluşturduğu gözlenmiştir. Kültür kabını 2' inci gün sonunda tamamen kapladığı için 4, 6 ve 7' nci günlerde ışık mikroskobu altında görüntüsü alınamamıştır. MCF7 hücre hattının sadece 1 ve 2' inci gün sonunda ters ışık mikroskobu altında görüntüleri alınmıştır. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MCF7 hücre hattının sGO' e maruz kalmış 2-boyutlu kültür görüntüleri. MCF7 hücre hattına sGO' in iki farklı derişimde verilmesinin ardından 1 ve 2 gün sonunda ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (10X)

U87 hücre hattından elde edilen 2-boyutlu kültürün sGO muamelesinden sonra, sGO derişiminin artması ile birlikte bu hücre hattında da zamana bağlı olarak hücrelerin biraraya gelerek kümelenmeye başladığı gözlemlenmiştir. Yüksek sGO derişiminin (100 µg/ml sGO) olduğu kuyucuklarda hücrelerin diğer derişim grubuna (10 µg/ml sGO) göre daha fazla kümelenme gösterdiği gözlemlenmiştir (şekil 4.2).



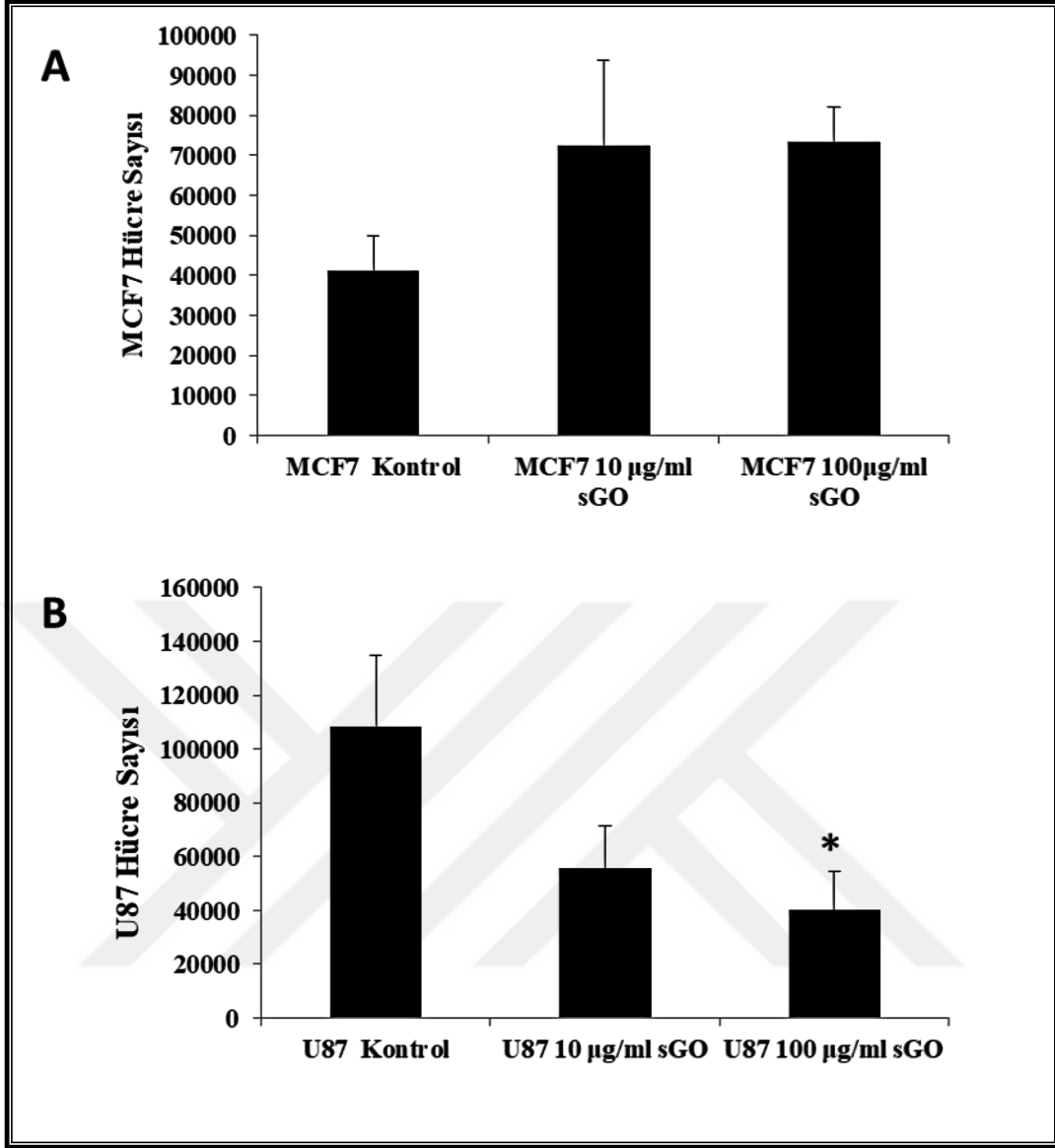
şekil 4.2. U87 hücre hattının sGO' e maruz kalmış 2-boyutlu kültür görüntüleri. U87 hücre hattına sGO' in iki farklı derişimde verilmesinin ardından 2, 4, 6 ve 7 gün sonunda ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (10X)

#### 4.2. 2-BOYUTLU KÜLTÜRLERDEN HÜCRE SAYIMI

İki boyutlu kültürü elde edilen MCF7 ve U87 hücre hatlarına, iki farklı derişimde sGO verilmesinin ardından, sGO' in hücre sayısına ne gibi bir etkisinin olduğunu belirlemek

için hücrelerin sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı için sGO muamelesinden sonra geçen 2 günlük örnekler kullanılmıştır. Örnekler hücre sayımı için tripsinlenerek 24 kuyucuklu plakalardan kaldırılmış ve besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu halinde hazırlanmıştır. Hücre süspansiyonundan 10-15 µl alınarak hücre sayımı için hemositometre lamına koyulmuştur ve ters ışık mikroskobu altında canlı hücre sayımı yapılmıştır.

MCF7 hücre hattından elde edilen 2-boyutlu kültüre 2 farklı derişimde sGO ile muamele edilmiştir. sGO muamelesinden 2 gün sonra hücreler toplanmış ve sayımı yapılmıştır. Yapılan hücre sayımı sonucunda; sGO ile muamele edilmiş MCF7 hücrelerinin sayısının kontrol grubuna göre az miktarda artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Fakat yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu artışın anlamlı bir artış olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.3A).



Şekil 4.3. MCF7 ve U87 hücre hattının 2-boyutlu kültürünün sGO muamesinden sonraki hücre sayısı grafiği. İki farklı sGO derişimi ile muamele edilmiş. (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattının hücre sayımı yapılmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır  $p < 0.05$

U87 hücre hattından elde edilen 2-boyutlu kültürler de MCF7 hücreleri gibi muamele edilmiş ve hücre sayımı yapılmıştır. Yapılan hücre sayımı sonucunda; sGO derişiminin artması ile hücre sayısının kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın yapılan istatistiksel analizler sonucunda anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3B).

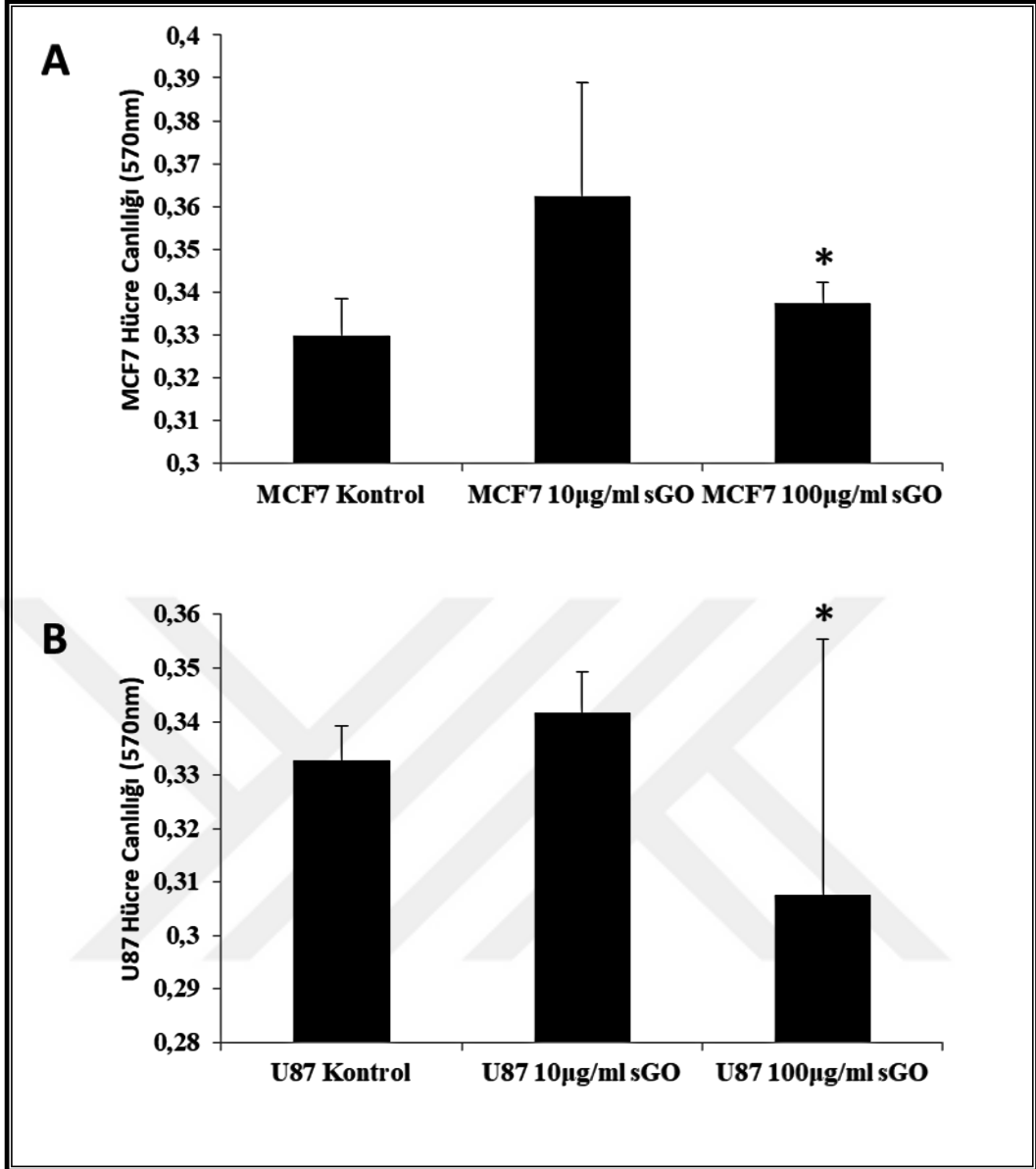


### **4.3. 2-BOYUTLU KÜLTÜRLERDEN ALAMAR BLUE İLE CANLILIK TESTİ YAPILMASI**

U87 ve MCF7 hücre hatlarından elde edilen 2-boyutlu kültürlerle 2 farklı derişimde sGO ile muamele edilmiştir. sGO' in hücre canlılığının artışı üzerine ne gibi etkilerinin olduğunu belirlemek için canlılık testi yapılmıştır. Bu canlılık testi için Alamar Blue™ Cell Viability Reagent kiti kullanılmıştır. Canlılık testi için sGO muamelesinden sonra 3' üncü günde ki hücreler kullanılmıştır. Bu hücreler Alamar Blue™ Cell Viability Reagent kitinde belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra 570 nm dalga boyunda Clariostar Omega mikropkaya okuyucu ile analiz edilmiştir.

MCF7 hücre hattının 2 farklı sGO derişimi ile muamele edilmesinden sonra 3' üncü günde alınan örnekler kit protokolüne göre hazırlanmıştır ve 570 nm dalga boyunda okutularak analizi yapılmıştır. Yapılan canlılık testi analizlerine göre; sGO muamelesine uğrayan grupların kontrol grubuna göre belirgin bir artış gözlemlenmemiştir. Ayrıca 100 µg/ml sGO verilen gruptaki hücrelerin canlılığı 10 µg/ml sGO verilen gruba göre anlamlı bir azalma göstermişti (Şekil 4.4A).

U87 hücre hattının sGO muamelesinden sonra yapılan canlılık testinin analizlerine göre; en yüksek derişimde verilen sGO' in (100 µg/ml sGO) hücreleri diğer derişime göre (10 µg/ml sGO) daha çok etkilediği ve canlılığı azalttığı gözlemlenmiştir. En yüksek derişim olan 100 µg/ml sGO grubundaki hücre canlılığı 10 µg/ml sGO grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.4B).



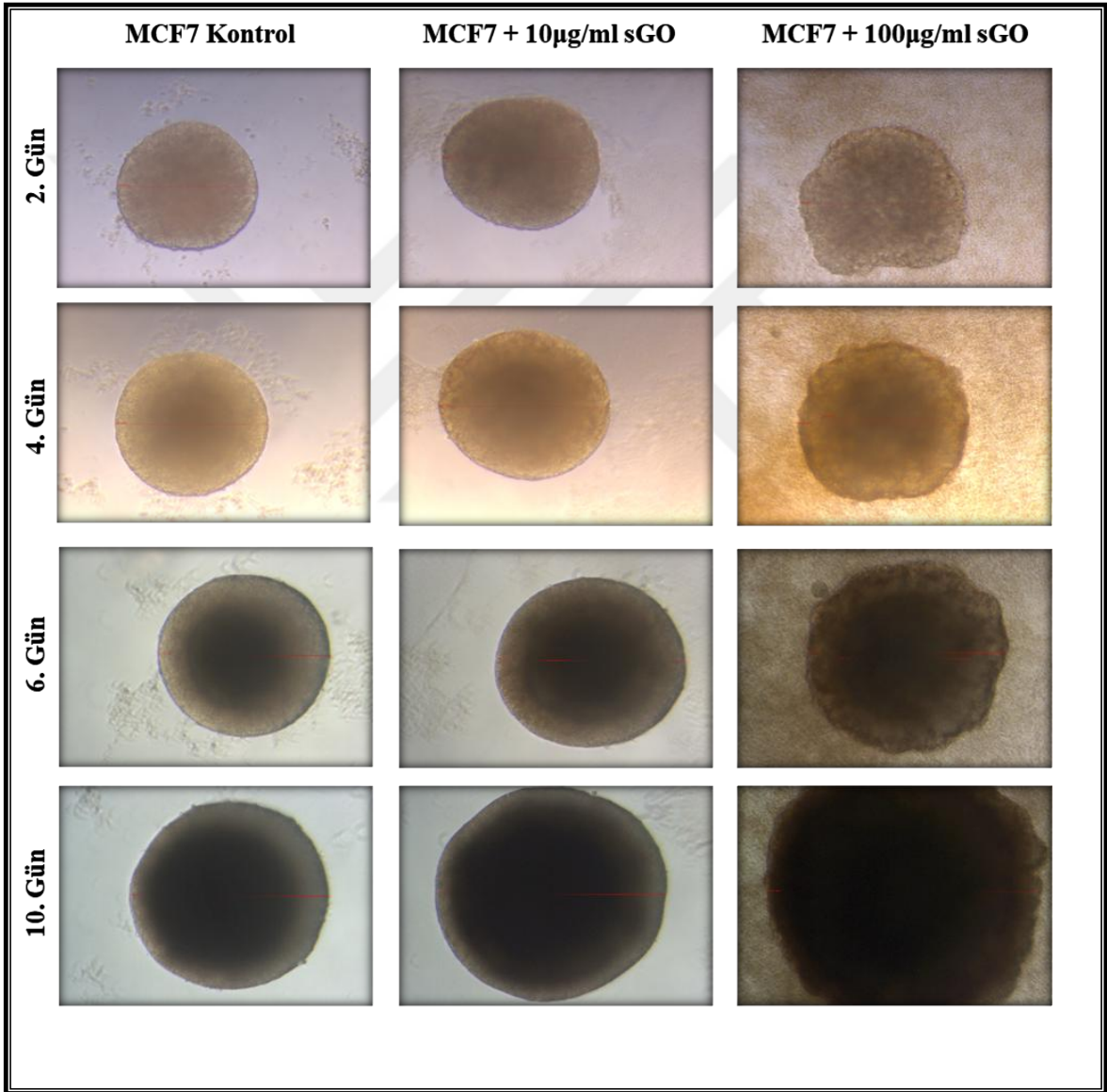
Şekil 4.4. MCF7 ve U87 hücre hattının 2-boyutlu kültürünün sGO muamelesinden sonraki canlılık testi analizi. İki farklı sGO derişimi ile muamele edilmiş (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattının canlılık testi yapılmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır  $p < 0.05$

#### 4.4. KANSER HÜCRE HATLARINDAN ELDE EDİLEN 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİN GÖRÜNTÜLENMESİ VE YARIÇAPLARININ ÖLÇÜLMESİ

MCF7 ve U87 hücre hatlarından 3-boyutlu tümör sferoid elde etmek için öncelikle 2-boyutlu kültürleri elde edilmiştir. Daha sonra 2-boyutlu kültürler % 1 agar kaplı 96 kuyucuklu tabaklara ekilmiştir ve 3 gün (72 saat) içerisinde 3-boyutlu tümör sferoid oluşurması beklenmiştir. Tümör sferoidlerin oluşumundan sonra 2 farklı derişimde sGO ile muamele edilmiştir. sGO muamelesinden 2, 4, 6 ve 10' uncu günlerde ters ışık

mikroskobu altında görüntüleri alınmıştır ve sferoidlerin bu günlerde yarıçapları ölçülmüştür.

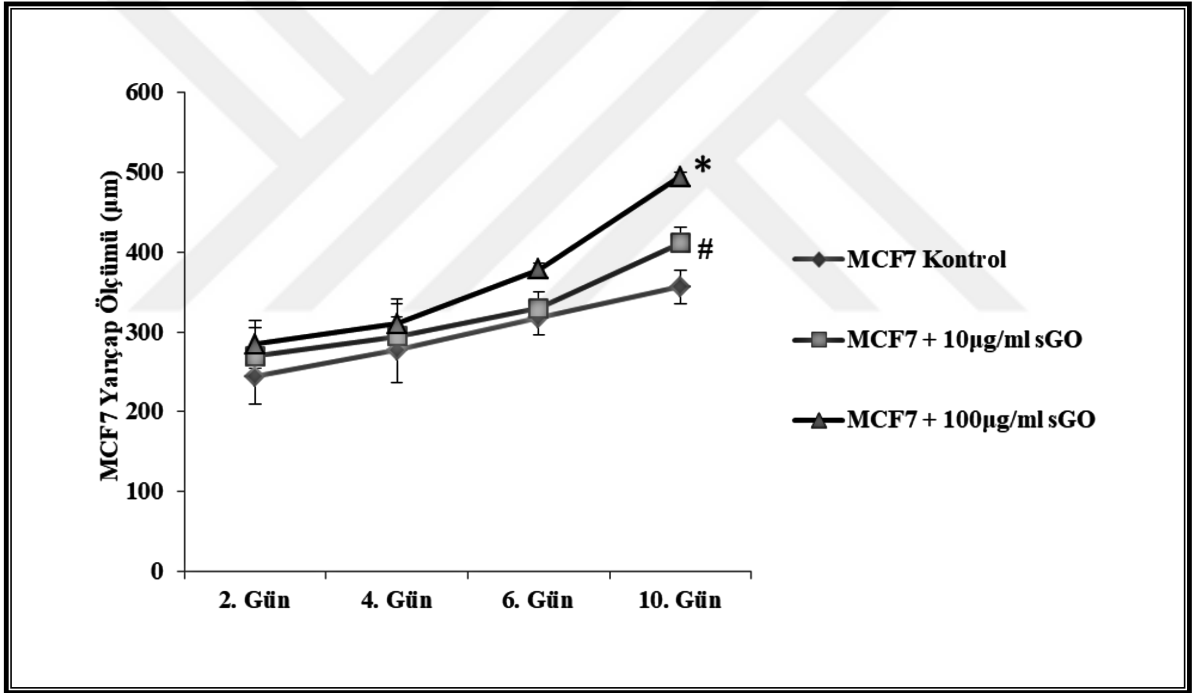
MCF7 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin sGO muamelesinden sonra 2, 4, 6 ve 10' uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.5' de görüldüğü gibi kontrol grubuna ait sferoidlerin 2-10 gün arasında büyüdüğü gözlenirken, sGO ile muamele edilen sferoidlerin sGO derişimi arttıkça kontrol grubuna göre daha çok büyüdüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.5. MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid görüntüleri. MCF7 hücre hattına sGO iki farklı derişimde verilmesinin ardından 2, 4, 6 ve 10' uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (10X)

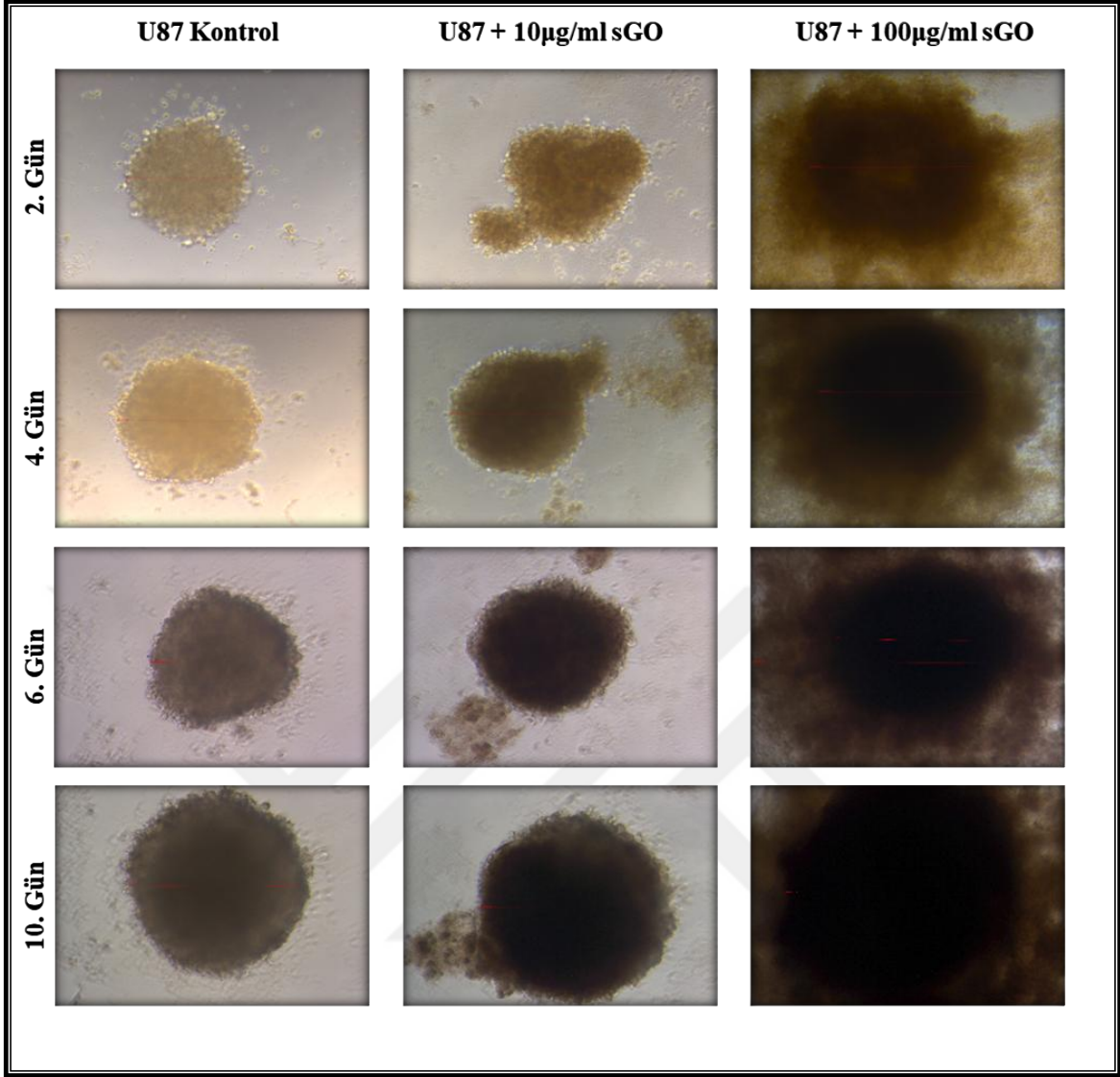
MCF7 hücre hattının 3-boyutlu sferoidleri ters ışık mikroskobu altında görüntülenirken aynı zamanda yarıçapları Zeiss Zen Yazılımı yardımı ile  $\mu\text{m}$  cinsinden ölçülmüştür. Sferoidlerin mikroskop altındaki incelemelerde büyüdüğü gözlemi (Şekil 4.6), sferoidlerin yarıçapları ölçülerek kaydedilmiştir. Görsel olarak büyüdüğü belirlenen sferoidlerin, yarıçap analizleri sonucuna göre de büyüdüğü yarıçap analizleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 4.6).

GO derişiminin artmasıyla kontrole göre sferoid yarıçapları da artış göstermiştir. En yüksek derişim olan 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sGO verilen gruptaki sferoidlerde en yüksek yarıçaplar ölçülmüştür ve sGO derişimine bağılı olarak 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sGO ve 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sGO grubundaki sferoidler kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında yarıçaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid yarıçap analizleri. MCF7 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlere sGO iki farklı derişimde verilmesinin ardından; 2, 4, 6 ve 10'uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında yarıçapları ölçülmüştür ( $\mu\text{m}$ )

U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin de sGO muamelesinden sonra 2, 4, 6 ve 10'uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında görüntüleri alınmıştır. U87 hücre hattından oluşan sferoidlerin MCF7 hücre hattından oluşan sferoidlere göre daha dağınık bir yapıda olduğu gözlenmiştir. Ters ışık mikroskobu altında gözlenen U87 sferoidlerinin 2-10 gün arasında büyüdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).

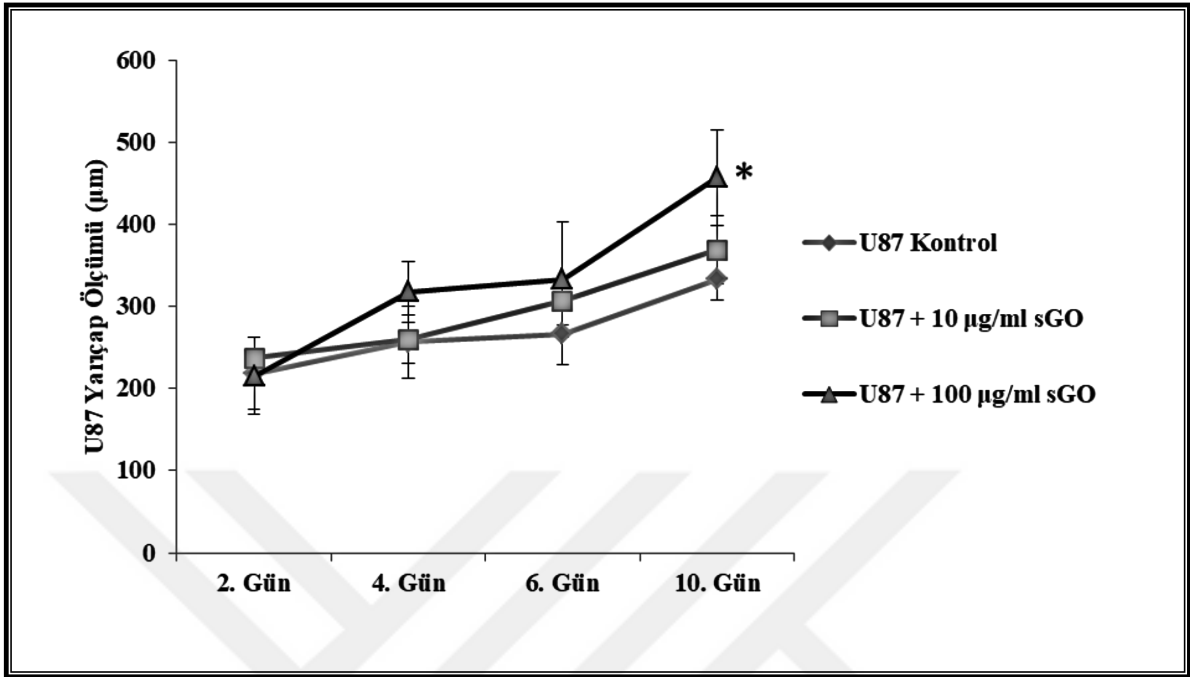


Şekil 4.7. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid görüntüleri. U87 hücre hattına sGO iki farklı derişimde verilmesinin ardından 2, 4, 6 ve 10'uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (10X)

U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidler ters ışık mikroskobu altında görüntülenirken aynı zamanda bu tümör sferoidlerin yarıçapları ölçülerek kaydedilmiştir. Bu yarıçap ölçümlerinin analizlerinin sonucu; sferoidlerin büyüdüğü gözlemini kanıtlar niteliktedir (Şekil 4.8).

En yüksek yarıçap ölçümü en yüksek derişim olan 100 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidlerde gözlenmiştir. İkinci derişim olan 10 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidler ise kontrol grubu ile kıyaslandığında yarıçap ölçümü 100 µg/ml grubu kadar olmasa da kontrol grubuna göre daha büyük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8). Ayrıca sadece 100

$\mu\text{g/ml}$  sGO verilen gruptaki sferoidlerin yarıçapları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış sergilemektedir (Şekil 4.8).



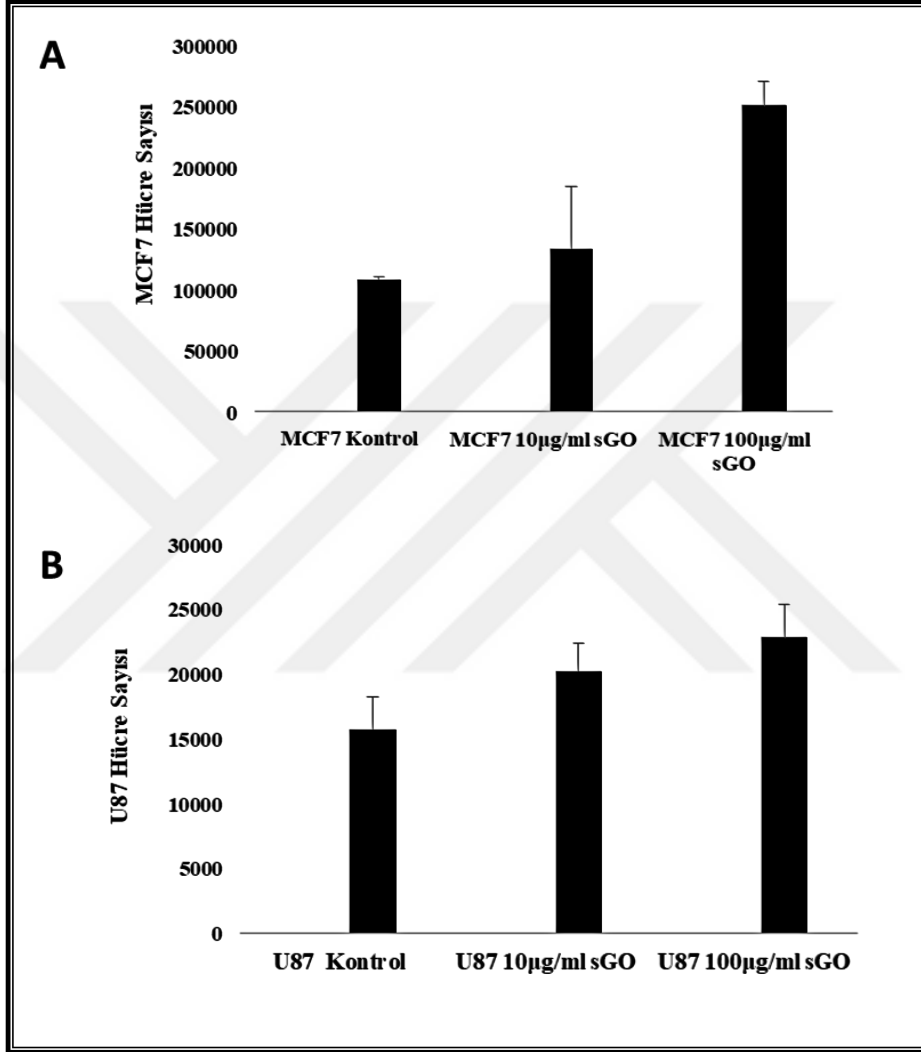
Şekil 4.8. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid yarıçap analizleri. U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlere sGO iki farklı derişimde verilmesinin ardından; 2, 4, 6 ve 10'uncu günlerde ters ışık mikroskobu altında yarıçapları ölçülmüştür ( $\mu\text{m}$ )

#### 4.5. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERDEN HÜCRE SAYIMI

MCF7 ve U87 hücre hatlarından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlere iki farklı derişimde sGO verilmiştir. sGO' in sferoidleri oluşturan hücre sayısı üzerine etkisini belirlemek için hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımında sGO muamelesi sonrasında 10' uncu gündeki sferoidler kullanılmıştır. Sferoidler hem enzimatik (% 0.05 Tripsin-EDTA) hem de fiziksel kuvvet uygulanarak çözüldükten sonra hemositometri lamına alınarak sayılmıştır ve analizi yapılmıştır.

sGO ile muamele edilen MCF7 sferoidlerinin hücre sayımı yapıldığında sGO' e maruz kalan sferoidleri oluşturan hücrelerin sayısında artış gözlenmiştir. Özellikle 100  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen gruptaki sferoidlerin hücrelerinin sayısı; kontrol grubu ile kıyaslandığında hücre sayısında belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9A). Fakat bu artışın yapılan istatistiksel analiz sonucunda anlamlı bir artış olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.9A).

U87 hücre hattından elde edilen ve sGO ile muamele edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin hücre sayımı yapıldığında; sGO' e maruz kalan hücrelerin kontrol grubuna göre hücre sayısında bir artış gözlenmiştir. En büyük artış 100 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidlerin hücrelerinin sayısında gözlenmiştir fakat bu artış anlamlı olmadığı istatistiksel olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9B).



Şekil 4.9. MCF7 ve U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoid kültürünün sGO muamelesinden sonraki hücre sayısı analizi. (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattından elde edilen tümör sferoidlerin sGO muamelesinden sonraki hücre sayısı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır

#### 4.6. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİNİN ALAMAR BLUE İLE CANLILIK TESTİ

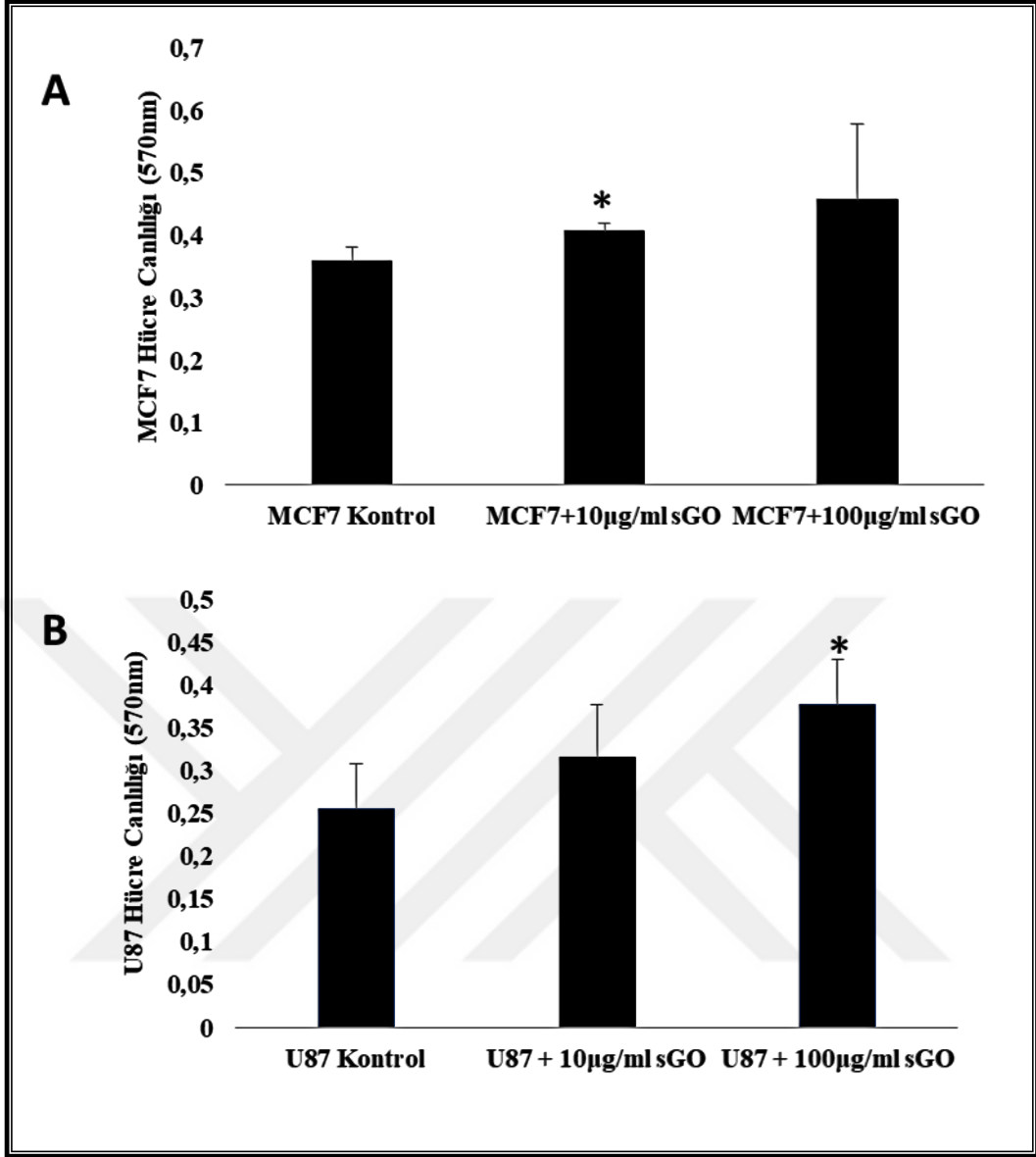
MCF7 ve U87 hücre hatlarından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlere sGO muamelesinden sonra; sGO' in sferoidleri oluşturan hücrelerin canlılığı üzerine ne gibi bir

etkisinin olduğunu belirlemek için canlılık testi yapılmıştır. Bu canlılık testi için Alamar Blue™ Cell Viability Reagent kiti kullanılmıştır. Tümör sferoidler sGO muamelesinden 10 gün sonunda toplamış ve kit protokolüne göre hazırlanmıştır ve 570 nm dalga boyunda Clariostar Omega mikropilaka okuyucu ile analiz edilmiştir.

MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidleri sGO muamelesinden sonra yapılan canlılık testine göre; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında sGO ile muamele edilen gruplarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 µg/ml sGO verilen grupta artış gözlemlenmiştir ve istatistiksel olarak değerlendirilen bu artış anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.10A).

U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerine sGO muamelesinden sonra 10' uncu günde canlılık testi yapılmıştır. sGO derişiminin artması ile birlikte hücre canlılığının kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 100 µg/ml sGO verilen grubun artış gösterdiği gözlemlenmiştir ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.10B).



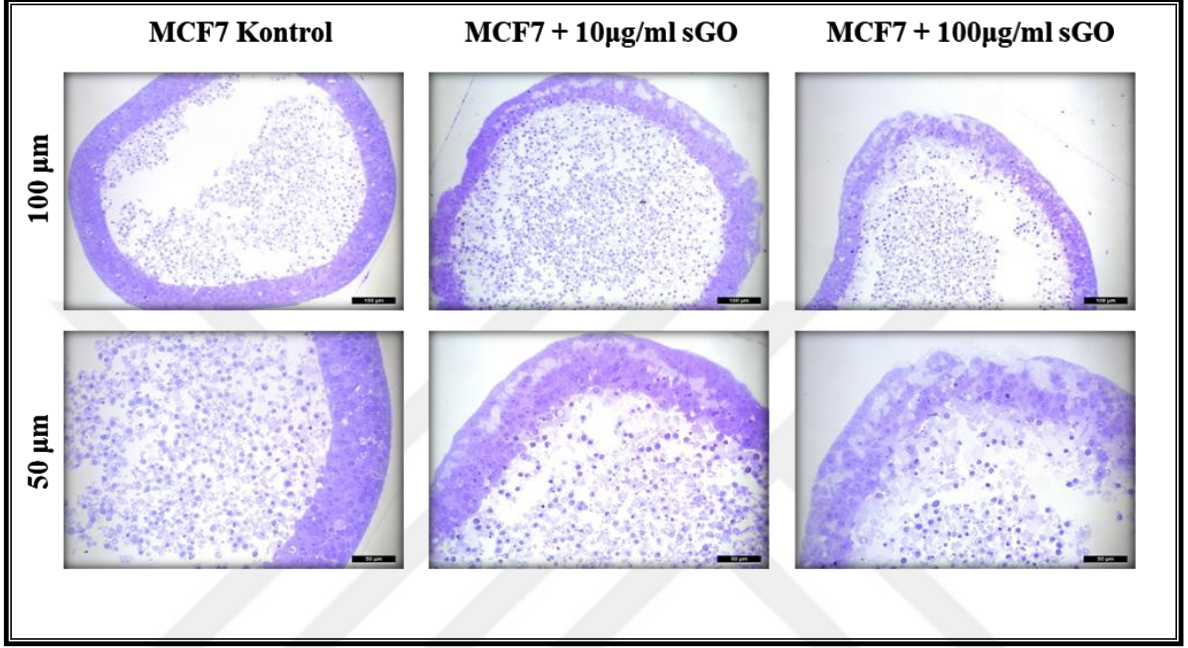


Şekil 4.10. MCF7 ve U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin sGO muamelesinden 10 gün sonraki canlılık testi analizi. (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerine sGO muamelesinden 10 gün sonra canlılık testi yapılmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır  $p < 0.05$

#### 4.7. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİN TOLUEN MAVİSİ İLE BOYAMA GÖRÜNTÜLERİ

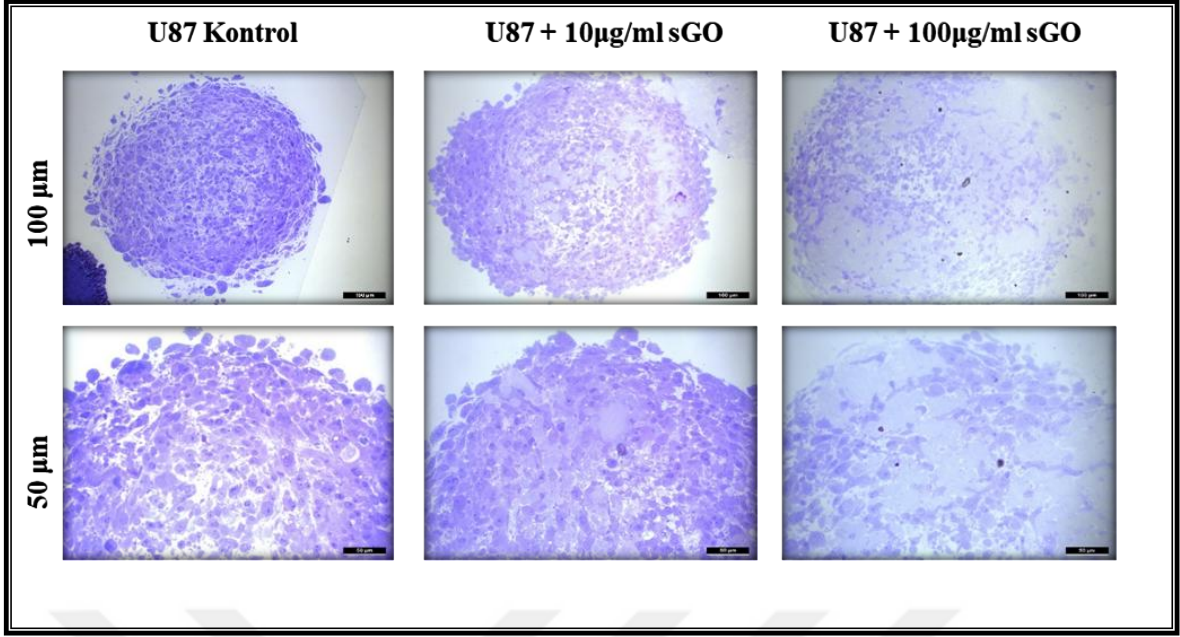
MCF7 ve U87 hücre hatlarından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlere 2 farklı derişimde sGO verilmesinden 7 gün sonra sferoidler toplanmıştır. Sferoidlerin ultra ince kesitleri alındıktan sonra toluen mavisi ile boyanmıştır. Bu sayede sGO muamelesinin neden olduğu sferoid çap artışını daha iyi gözlemlemenin yolu sağlanmıştır.

MCF7 hücre hattından elde edilen sferoidlerin ultra ince kesitleri tolüen mavisi ile boyanmıştır. Şekil 4.11’ de görüldüğü gibi MCF7 hücre hattından oluşan sferoidler bir dış kabuk oluşturmuştur. sGO ile muamele edilen sferoidlerin dış kabukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu dış kabuklarda boşluk olduğu gözlemlenmiştir. sGO derişiminin artması ile dış kabukta oluşan boşluklarda da artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonra ultra ince kesitlerinin tolüen mavisi ile boyanma görüntüleri

U87 hücre hattına ait olan sferoidlerden alınan kesitlerin boyanmasının ardından; Şekil 4.12’ de görüldüğü gibi sferoidlerde bazı değişiklikler meydana gelmiştir. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında sGO’ e maruz kalan sferoidlerin içinde boşluklar gözlenmiştir. Bu gözlenen boşluklar sGO derişiminin artması ile birlikte 100 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidlerde daha çok gözlenmektedir (Şekil 4.12).



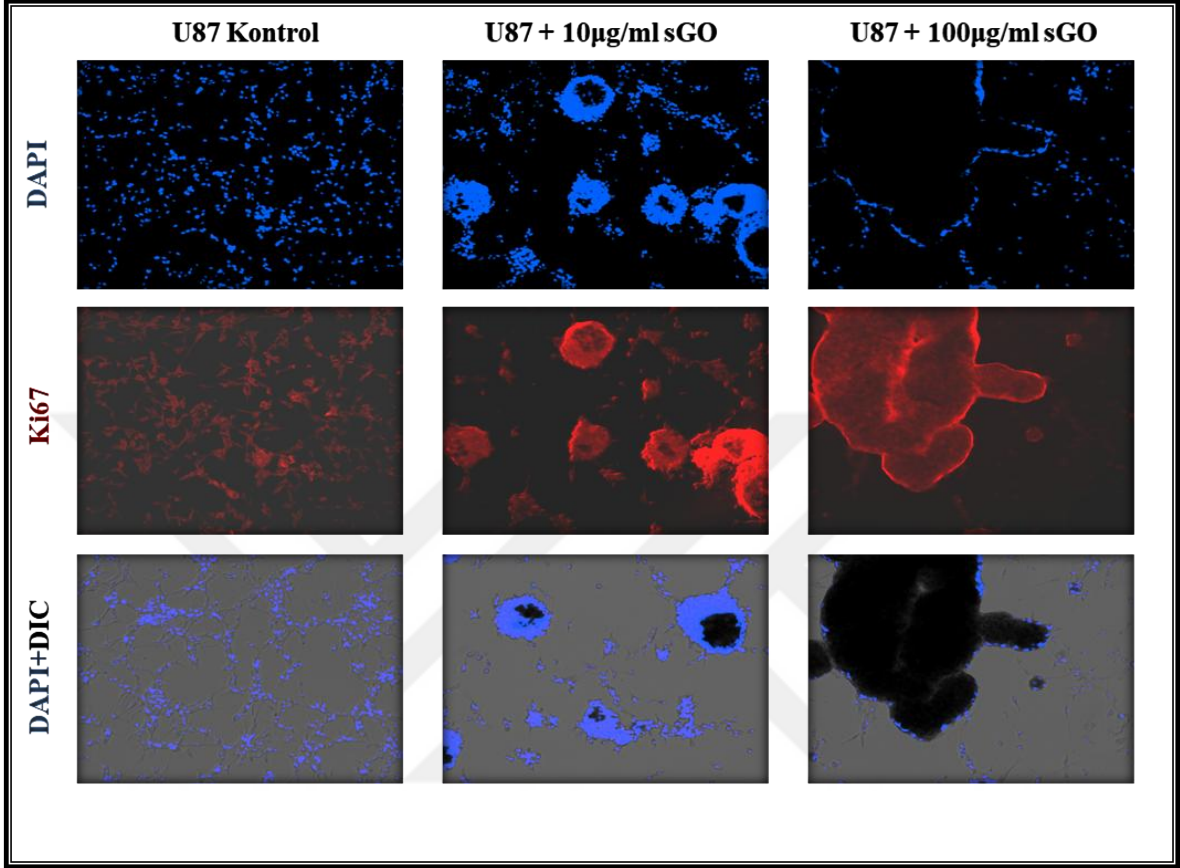
Şekil 4.12. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonra ultra ince kesitlerinin tolüen mavisi ile boyanma görüntüleri

#### 4.8. GO MUAMELESİNİN 2- VE 3-BOYUTLU KÜLTÜRLERDEKİ PROLİFERASYONA ETKİSİNİN ANALİZİ

U87 hücre hattından elde edilen 2-boyutlu kültüre sGO muamelesinden sonra hücreler 7' inci gününde soğuk metanol ile 24 kuyucuklu kültür plakalarına sabitlenmiştir ve  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilmiştir. Daha sonra DPBS ile yıkanmış ve proliferasyon belirteci olan Ki67 (1:400) antikoruna bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından DPBS ile yıkandıktan sonra ikincil antikor olan Alexafluor 546 (1:400) ile oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edilmiştir. Tekrar DPBS ile yıkamanın ardından DAPI (1:10000) ile hücre çekirdekleri boyanmıştır.

U87 hücre hattının 2-boyutlu kültürüne sGO muamelesinden sonra yapılan immüno Floresan boyamada Ki67 proliferasyon belirteciye bakılmıştır. Hücre çekirdekleri mavi renkte olan DAPI ile boyanırken proliferasyonun olduğu bölgeler Ki67 ile kırmızıya boyanmıştır. Ayrıca Floresan mikroskopun diferansiyel interferans kontrast (DIC) bölümüyle boyama yapmadan görüntü alınmıştır ve DAPI boyamasından elde edilen görüntü ile birleştirilmiştir (Şekil 4.13). sGO derişiminin artmasına bağlı olarak kümelenmelerin arttığı immüno Floresan boyamada da gözlenmiştir. Şekil 4.13' de görüldüğü üzere sGO derişimine bağlı kümelenmelerin arttığı yerlerde sadece kümelenmenin dışında kalan hücreler boyanmıştır, grafen varlığı 2-boyuttaki kültürlerde

DAPI ve/ veya Ki67 sinyallerini baskılamıştır. Bu kümelenmelerin dışında kalan bölgelerde sGO derişiminin artması ile birlikte proliferasyonda azalma gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. U87 hattından elde edilen 2-boyutlu kültürün sGO muamelesinden sonraki proliferasyon belirteci ile boyanan immünofloresan görüntüsü. sGO muamelesine uğrayan hücrelerin proliferasyon belirteci olan Ki67 immünofloresan boyaması kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır

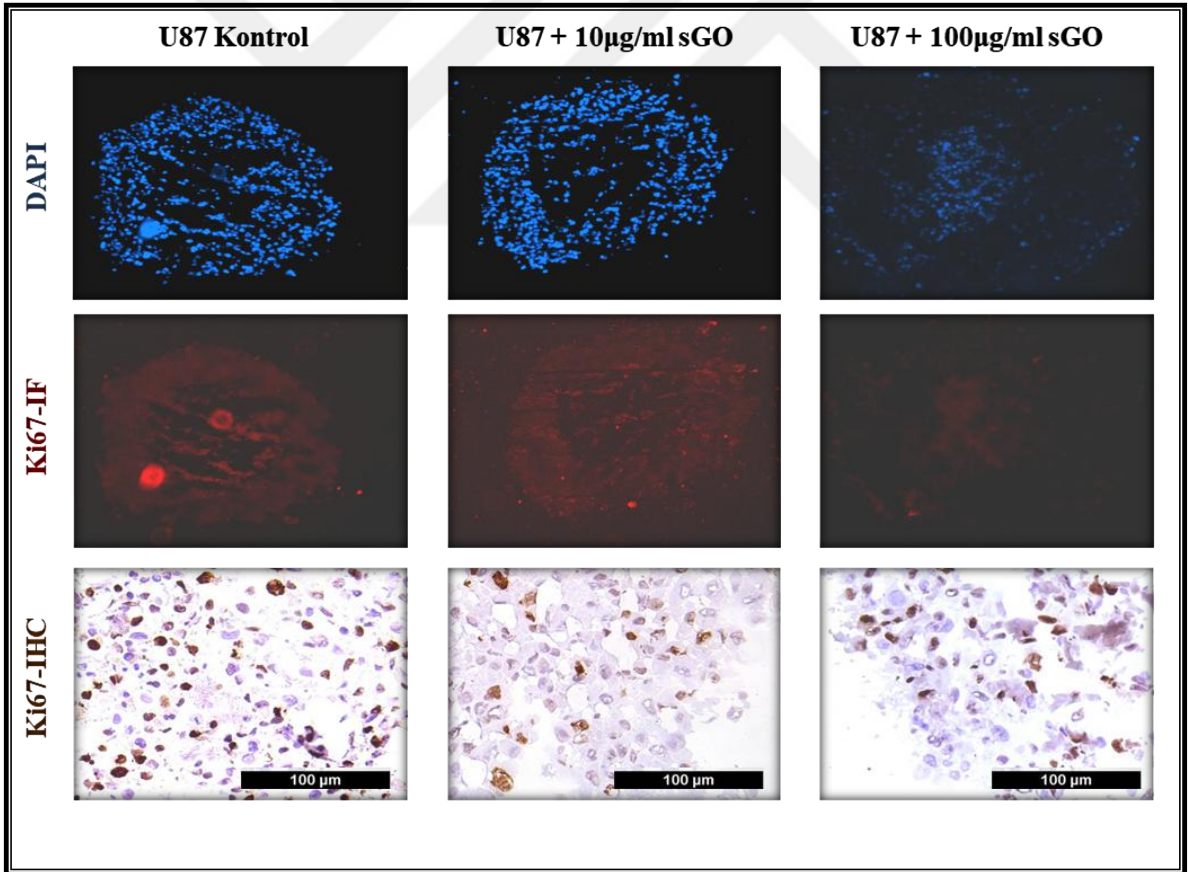
sGO muamelesinin sferoid çaplarındaki neden olduğu artışı daha iyi anlamak üzere ultra ince kesitleri alınan sferoidlerde proliferasyon analizi yapılmıştır. Ultra ince kesitleri alınan sferoidler proliferasyonu belirteci olan Ki67 ile hem immünofloresan hemde immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Ultra ince kesitlerin alınmasındaki zorluklardan dolayı bu kısımda sadece bir kanser hattı seçilmiştir.

Şekil 4.14' de görüldüğü gibi hücre çekirdekleri DAPI ile maviye boyanmıştır. Proliferasyon belirteci olan Ki67' nin immünofloresan (IF) görüntüsünde hücreler kırmızıya boyanmıştır; Ki67' nin immünohistokimyasal (IHC) görüntüsünde ise hücreler kahverengine boyanmıştır.

Ki67' nin immünofloresan (IF) görüntüsüne bakıldığında sGO derişiminin artmasına bağlı olarak; sGO ile muamele edilmiş sferoidler kontrol grubuna göre kıyaslandığında proliferasyonunda azalma olduğu gözlemlenmiştir. Proliferasyonun 100 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidlerde en az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14).

Ki67' nin immünohistokimyasal (IHC) görüntüsünde ise; sGO verilen sferoid gruplarının kontrol grubu ile kıyaslandığında proliferasyonunda azalma olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek derişim olan 100 µg/ml sGO ile muamele edilen sferoidlerde proliferasyonun diğer gruplara göre en az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14).

Proliferasyon belirteci olan Ki67 boyamasının hem immünofloresan hemde immünohistokimyasal boyama yapılarak bakılması ile aynı sonuçlar alınmıştır. sGO ile muamele edilen sferoidlerde proliferasyonun iki yöntem ile analiz edilmesi ve aynı sonuçların elde edilmesi proliferasyonun azaldığını kanıtlanmıştır (Şekil 4.14).

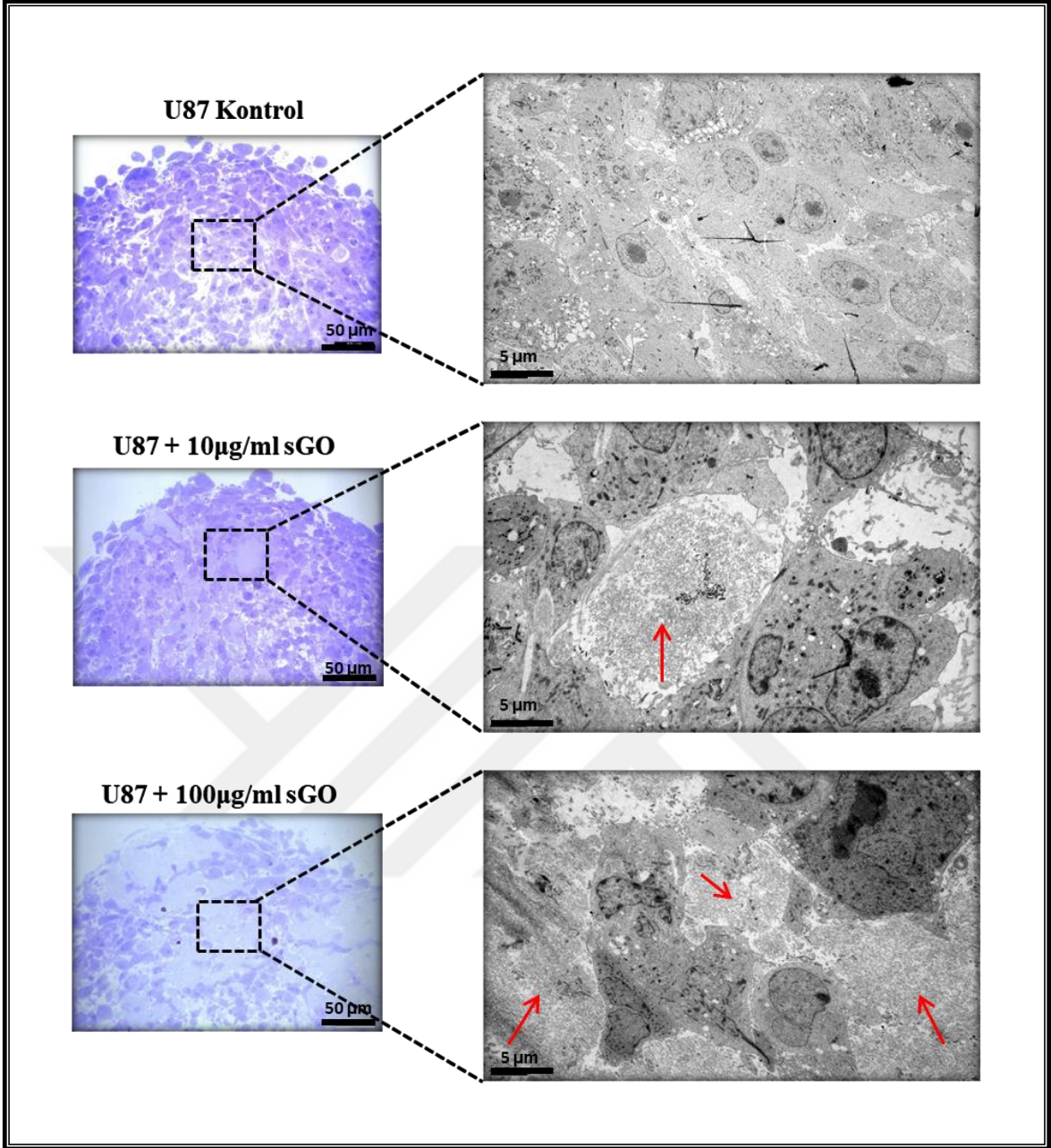


Şekil 4.14. U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin proliferasyon belirteci olan Ki67 ile boyanan immünofloresan (IF) ve immünohistokimyasal (IHC) görüntüsü

#### **4.9. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİN TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOP (TEM) GÖRÜNTÜLERİ**

Ultra ince kesitleri toluen mavisi ile boyanan sferoidlerin Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) görüntüleri Prof. Dr. Asuman ÖZEN ve Dr. Ahmet CEYLAN tarafından elde edilmiştir. şekil 4.11 ve şekil 4.12’ de görüldüğü gibi toluen mavisine boyanan kesitlerde sGO derişiminin artması ile birlikte boşluklar görülmektedir. Bu boşluklardan kontrol grubunda bulunmamaktadır.

TEM görüntülerinin elde edilmesi ve incelenmesi ile birlikte; toluen mavisi boyaması yapılan kesitlerdeki boşlukların hücre içine alınan sGO olduğu belirlenmiştir. şekil 4.15’ deki şekilde kırmızı ok ile işaretlenen yerlerde sGO olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hücreler arası boşluğu dolduran sGO hücre dışı matriks elemanlarından olan kolojen benzeri yapılar göstermektedir.



Şekil 4.15. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonra elde edilen Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) görüntüleri

#### 4.10. GO MUAMELESİNİN 2- VE 3-BOYUTLU KÜLTÜRLERDEKİ HÜCRE DIŞI MATRİKSE OLAN ETKİSİNİN ANALİZİ

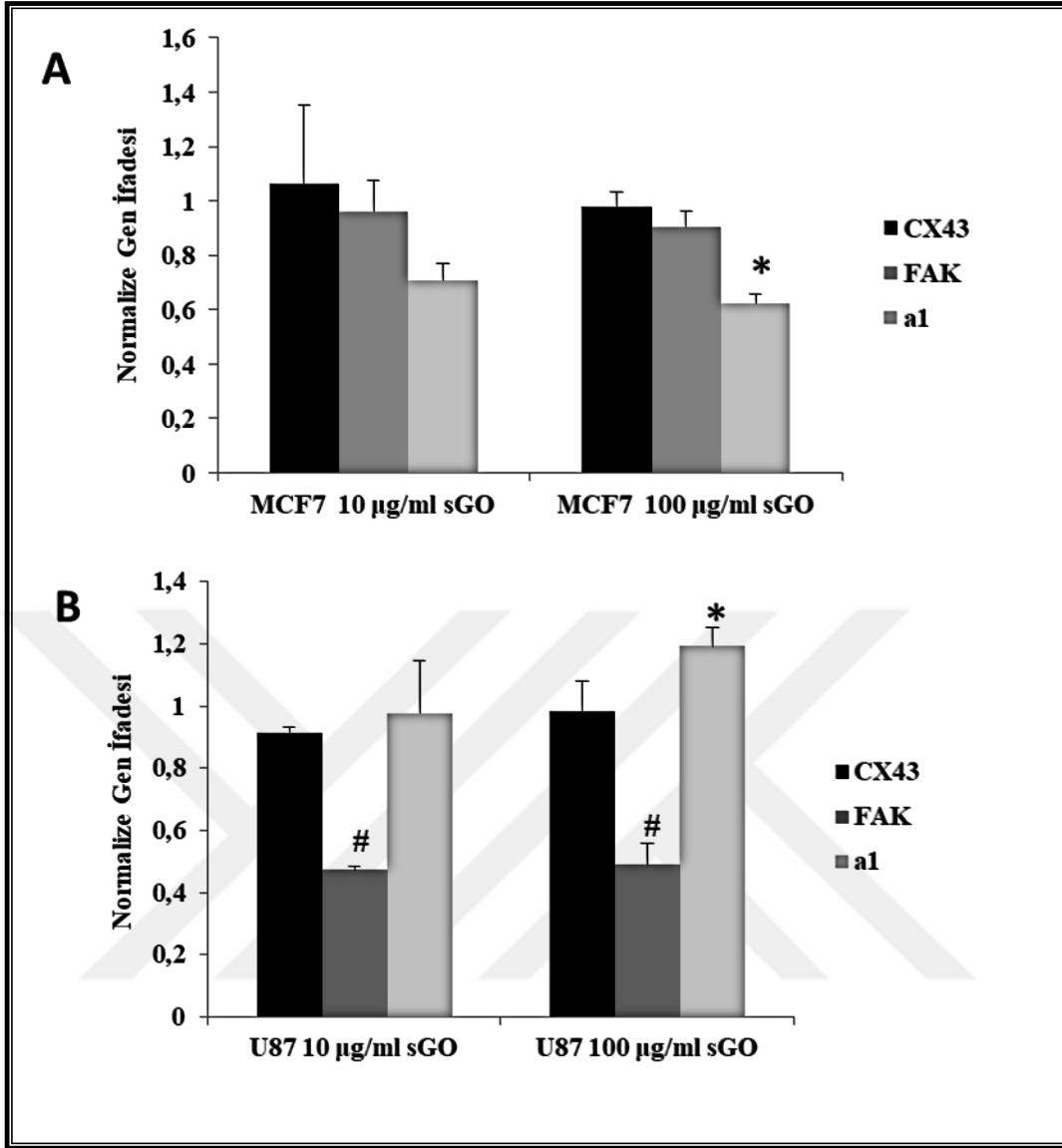
Üç boyutta büyütülen tümör sferoidlerinin ultra ince kesitlerinin TEM görüntülemesinde gözlemlenen hücre dışı matriks bileşenlerinin gözlemlenmesi nedeni ile hem 2- hem 3- boyuttaki kültürlerde GO muamelesinin farklı hücre dışı matriks bileşenlerinin ifadesine olan etkisine bakılmıştır.

U87 ve MCF7 hücre hatlarından elde edilen 2-boyutlu kültürler sGO muamelesinden sonra 7' inci günde alınan örneklerle eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Eş zamanlı PCR analizi için sGO muamelesine uğramış 2-boyutlu kültürden RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezlenmiştir. cDNA' lar kullanılarak hücre dışı matriks protein genleri olan *CX43*,  *$\alpha 1$*  genleri ve hücresel adhezyon geni olan *FAK* için eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Referans gen olarak *MAPK1* seçilmiştir. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken MCF7 ve U87 kontrol grubuna göre normalize edilmiştir.

MCF7 hücre hattının eş zamanlı PCR sonuçlarına göre; 10  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen gruptaki hücrelerde *CX43* geninin ifadesinde çok az miktarda artış gözlenirken, *FAK* ve  *$\alpha 1$*  genlerinin ifadesinde azalma gözlenmiştir. 100  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen gruptaki hücrelerde ise *CX43*, *FAK* ve  *$\alpha 1$*  genlerinin tamamının ifadesinde azalma gözlenmiştir (Şekil 4.16A). Bu gen ifadelerinin azalması istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; sadece 100  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen gruptaki  *$\alpha 1$*  genlerinin azalması anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.16A).

U87 hücre hattının eş zamanlı PCR sonuçlarına göre; 10  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen gruptaki hücrelerin *CX43*, *FAK* ve  *$\alpha 1$*  genlerinin tamamının ifadesinde azalma gözlenmiştir. Bu azalmalardan sadece *FAK* geninin azalması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 100  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen gruptaki hücrelerin ise  *$\alpha 1$*  geninin ifadesinde anlamlı bir artış gözlemlenirken; *FAK* geninin ifadesinde hem 10  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen grupta hem de 100  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.16B).



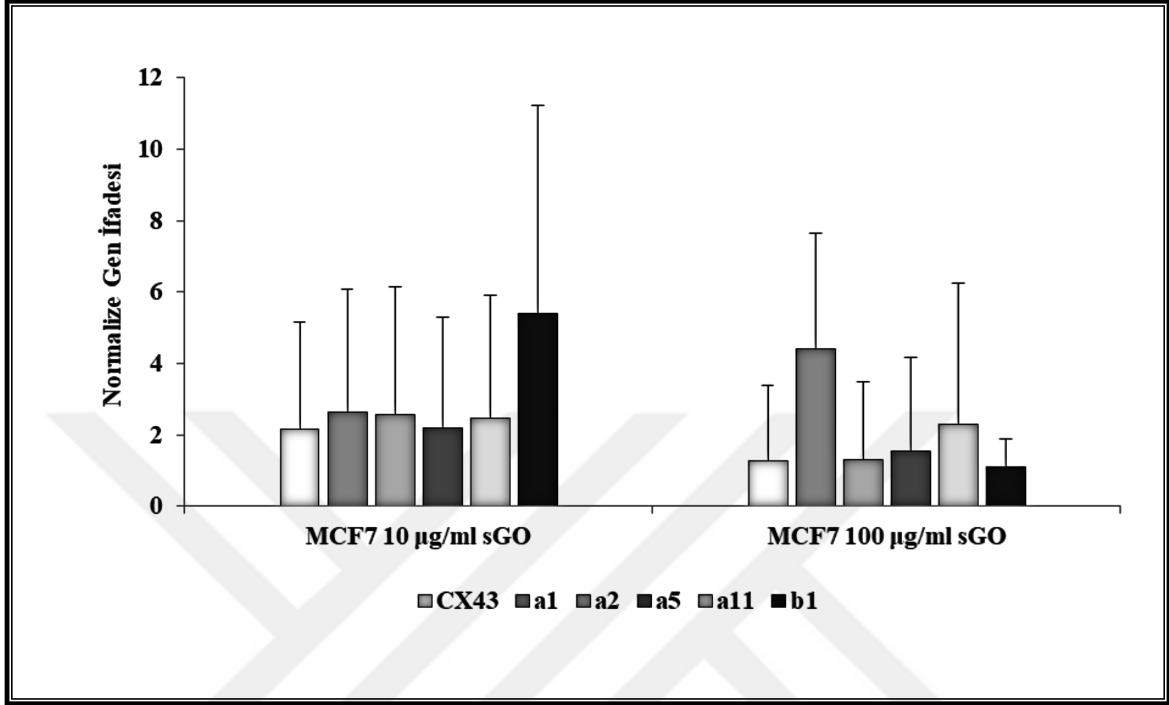


Şekil 4.16. MCF7 ve U87 hücre hattının 2-boyutlu kültürünün sGO muamelesinden sonraki eş zamanlı PCR analizi. İki farklı sGO derişimine maruz kalan (A) MCF7 ve (B) U87 hücre hattının eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken kontrol grubuna göre normalize edilmiştir  $p < 0.05$

MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerine 2 farklı derişimdeki sGO muamelesinden 7 gün sonra hücre dışı matriks protein genlerinden olan *CX43*, *a1*, *a2*, *a5*, *a11*,  *$\beta$ 1* genlerinin ifadeleri için eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Referans gen olarak *MAPK1* seçilmiştir. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken ise kontrol grubuna göre normalize edilmiştir (Şekil 4.17).

10 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidlerin *CX43*, *a1*, *a2*, *a5*, *a11*,  *$\beta$ 1* genlerinin ifadelerinin tamamında artış gözlenmiştir ve en çok  *$\beta$ 1* geninin ifadesinde artış olduğu gözlenmiştir. 100 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidlerin ise *CX43*, *a1*, *a2*, *a5*, *a11*,  *$\beta$ 1*

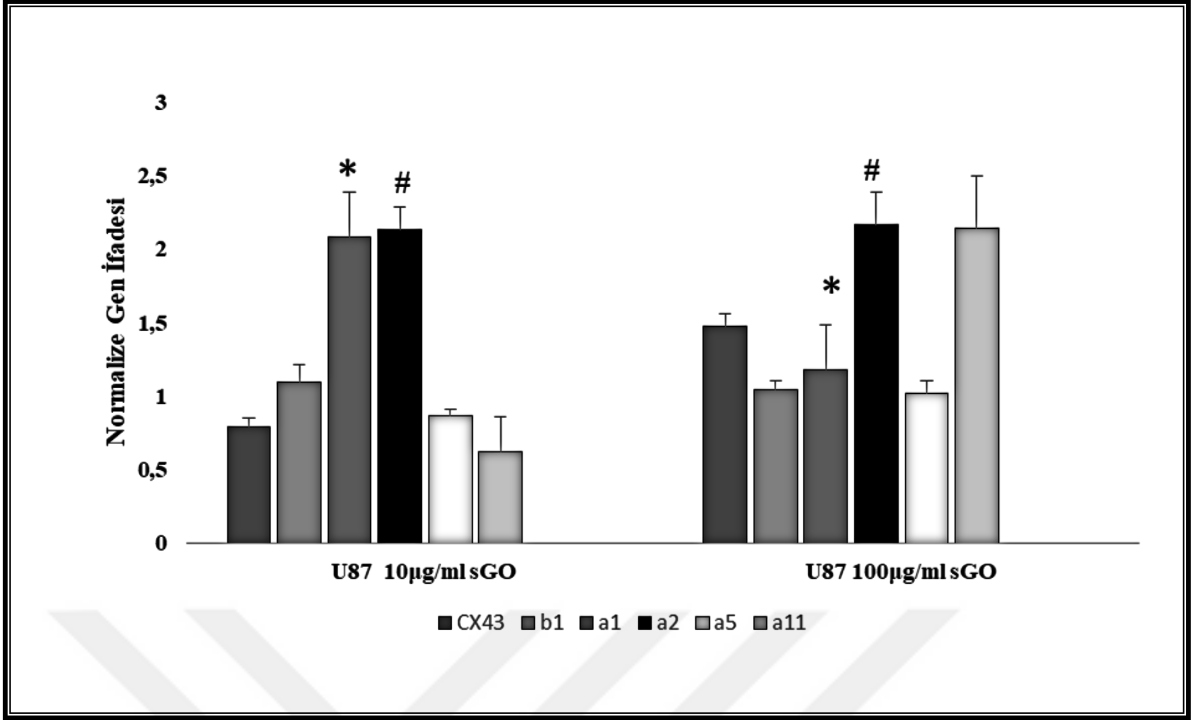
genlerinin ifadelerinin tamamında yine artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.17). Fakat hem 10 µg/ml sGO verilen grup hem de 100 µg/ml sGO verilen grupta belirlenen gen ifadesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. MCF7 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonraki eş zamanlı PCR analizi. MCF7 hücre hattının 2 farklı sGO derişimi ile muamele edilmiş sferoidlerinin eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken kontrol grubuna göre normalize edilmiştir p<0.05

U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin 2 farklı sGO derişimi ile muamelesinden 7 gün sonra sferoidler toplanmıştır ve eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Eş zamanlı PCR analizinde *CX43*, *β1*, *a1*, *a2*, *a5*, *a11* genlerinin ifadelerine bakılmıştır. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Referans gen olarak *MAPK1* seçilmiştir. (Şekil 4.18).

Derişimi 10 µg/ml sGO olan gruptaki sferoidlerin *CX43*, *a5*, *a11* genlerinin ifadelerinde azalma gözlenmiştir. *β1*, *a1* ve *a2* genlerinin ifadelerinde ise artış gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak *a1* ve *a2* genlerinin ifadesindeki artış anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.18). 100 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidlerin ise *CX43*, *β1*, *a1*, *a2*, *a5*, *a11*, genlerinin ifadelerinin tamamında artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.18). Fakat bu genlerden sadece *a1* ve *a2* genlerinin ifade artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.18).

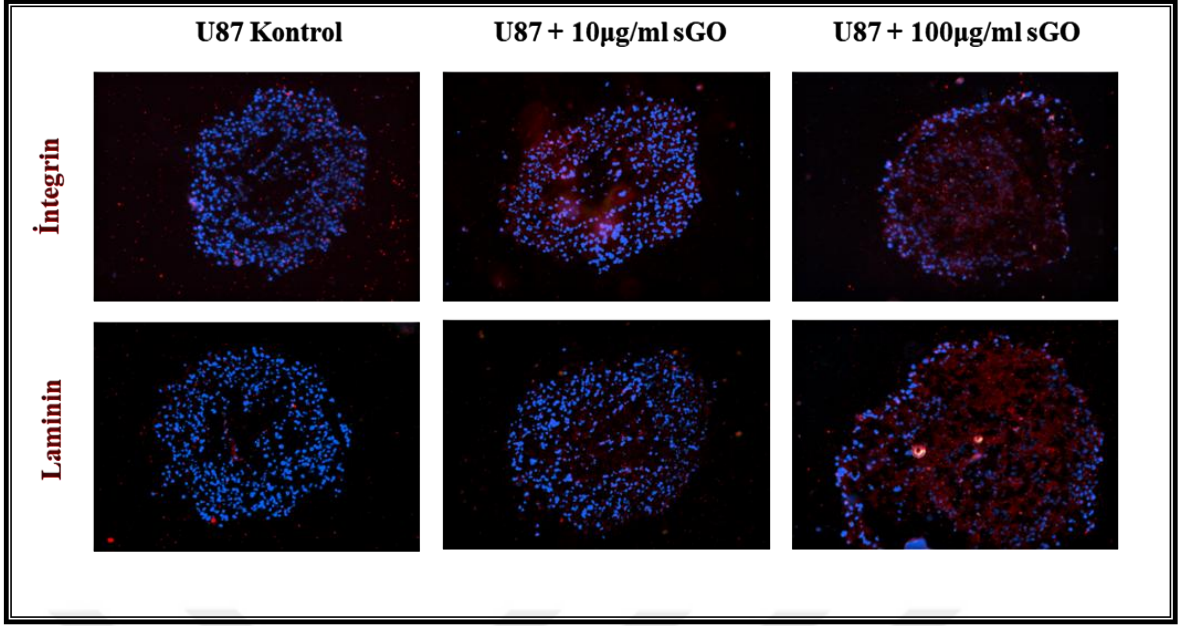


Şekil 4.18. U87 hücre hattının 3-boyutlu tümör sferoidlerinin sGO muamelesinden sonraki eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Gen ifade seviyeleri hesaplanırken kontrol grubuna göre normalize edilmiştir  $p < 0.05$

#### 4.11. 3-BOYUTLU TÜMÖR SFEROİDLERİN HÜCRE DIŞI MATRİKS PROTEİNLERİNİN FLORESAN MİKROSKOP İLE BELİRLENMESİ

Gen ifade analizlerinde gözlemlenen belirgin artışı protein seviyesinde desteklemek üzere en belirgin sonucu gösteren U87 sferoidlerinin kesitleri ile devam edilmiştir. TEM mikroskobu görüntülerinde kollajen benzeri yapıların görünmesi ve hücre dışı matriks proteinlerinin artışının gen ifade analizleri ile belirlenmesi üzerine; hücre dışı matriks proteinlerine odaklanıldı. Ultra ince kesitleri alınan U87 sferoidleri hücre dışı matriks proteinlerinden olan integrin ve laminin antikorları ile boyanmıştır.

Şekil 4.19’ de görüldüğü gibi immünofloresan görüntülerinde hücre çekirdekleri DAPI ile maviye, integrin ve laminin kırmızıya boyanmıştır. İmmünofloresan boyaması yapılan sferoidlerin sGO derişiminin artmasına bağlı olarak integrin ve lamininin ifadesinde artış gözlemlenmiştir. 100 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidlerde integrin ve laminin ifadesindeki artış kontrol grubu ve 10 µg/ml sGO verilen gruptaki sferoidler ile kıyaslandığında en yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. U87 hücre hattından elde edilen 3-boyutlu tümör sferoidlerin immünofloresan görüntüsü

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. TARTIŞMA

Grafen ve grafen türevi malzemeler sağlıktan sanayiye, biyoteknolojiden biyomedikal ve nanotıp alanına kadar birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında da grafenin türevlerinden biri olan grafen oksit (GO) kullanılmıştır ve GO' in kanser hücreleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Kanser hücre hatlarından MCF7 ve U87 seçilerek hem 2-boyutlu hem de 3-boyutlu kültürler elde edilmiştir. GO' in iki farklı derişimi 2-boyutlu ve 3-boyutlu kültürler üzerinde denenmiştir.

İki boyutlu kültüre sGO' in verilmesi sonucunda kültürdeki hücrelerin birbirine yaklaşarak kümelenme gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Bununla birlikte 3-boyutlu tümör sferoid kültürüne sGO verilmesiyle sferoidlerin kontrol grubuna göre çapının büyüdüğü gözlenmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.8).

GO' in hücre sayısı üzerine etkilerini belirlemek için GO muamelesinden sonra hücre sayımı yapılmıştır. İki boyutlu kültürde U87 hücre hattına ait hücrelerin sGO muamelesinden sonra hücre sayısında anlamlı bir azalma olduğu belirlenirken MCF7 hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.3). Üç boyutlu tümör sferoid kültüründe ise sGO muamelesinden sonra her iki hücre hattının hücre sayısında fazla olmayan bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.9). Fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.9).

İki farklı derişimde sGO verilen hücrelerin 2-boyutlu kültürüne canlılık testi Alamar Blue deneyi ile yapılmıştır ve her iki hücre hattında en yüksek derişim olan 100 µg/ml sGO verilen gruptaki hücrelerin canlılığında 10 µg/ml sGO grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.4). Üç boyutlu tümör sferoid kültürüne yapılan canlılık deneyinde iki hücre hattında da anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.10).

sGO' in hücreler üzerindeki proliferasyona ne gibi etkilerinin olduğunu belirlemek için proliferasyon belirteçlerinden olan Ki67 kullanılmıştır. İki boyutlu kültürde Ki67 proliferasyon belirteci ile yapılan boyama sonucunda immünofloresan görüntülerinde proliferasyonda azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13). Üç boyutlu kültür içinde

proliferasyon belirteci olan Ki67 hem immünofloresan hem de immünohistokimyasal boyamada kullanılmıştır. Yapılan her iki Ki67 boyamasında; sGO muamelesine uğrayan sferoidlerin proliferasyonunda kontrol grubuna göre azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14).

Üç boyutlu tümör sferoidlerden ultra ince kesitler alınarak toluen blue ile boyanmıştır. Bu boyama sonucunda sGO ile muamele edilen sferoidlerin içlerinde boşluklar olduğu ve bu boşlukların sGO derişiminin artması ile birlikte arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12). Daha sonra bu ultra ince kesitlerden Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) altında görüntüler alınmıştır ve sGO' in hücreler arası boşluğu doldurduğu ve bu alanlarda hücre dışı matriks bileşenlerinin varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).

Üç boyutlu tümör sferoidlerdeki büyümenin belirlenebilmesi için ve TEM analizlerinde gözlemlenen yapıların varlığını göstermek amacıyla hücre dışı matriks protein analizi yapılmıştır. Üç boyutlu tümör sferoid kültüründe hücre dışı matriks protein genlerinden olan *CX43*,  *$\beta 1$* ,  *$\alpha 1$* ,  *$\alpha 2$* ,  *$\alpha 5$* ,  *$\alpha 11$*  genlerinin ifadelerine eş zamanlı PCR ile bakılmıştır. MCF7 hücre hattının her iki derişiminde *CX43*,  *$\beta 1$* ,  *$\alpha 1$* ,  *$\alpha 2$* ,  *$\alpha 5$* ,  *$\alpha 11$*  genlerinin ifadesinde artış olduğu, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.17). U87 hücre hattından elde edilen sferoidlerde ise 100  $\mu\text{g/ml}$  sGO verilen gruptakilerin *CX43*,  *$\beta 1$* ,  *$\alpha 1$* ,  *$\alpha 2$* ,  *$\alpha 5$* ,  *$\alpha 11$*  genlerinin tamamının ifadesinde artış belirlenmiştir ve bu genlerden sadece  *$\alpha 1$* ,  *$\alpha 2$*  genlerinin artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18). Hücre dışı matriks protein genlerinden olan *CX43*,  *$\alpha 1$*  ve hücreyel adhezyon geni olan *FAK* geninin ifadelerine eş zamanlı PCR ile bakılmıştır. İki boyutlu kültürde MCF7 hücre hattına ait kültürde bu genlerin tamamında bir azalma gözlenirken U87 hücre hattındaki kültürde sadece  *$\alpha 1$*  ve *FAK* genlerinin ifadesinde anlamlı bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.16).

Hücre dışı matriks proteinlerinin gen ifadesinin arttığının belirlenmesinin ardından bu sonuçları destekleyen sonuçlar veren immünofloresan boyama yapılmıştır. Bu boyamada hücre dışı matriks proteinlerinden olan integrin ve laminin proteinlerine bakılmıştır. U87 hücre hattından elde edilen sferoidlere yapılan bu boyamada sGO derişiminin artması ile birlikte integrin ve laminin proteinlerinde artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19). Bu immünofloresan boyama sonucu, eş zamanlı RT-PCR ile yapılan hücre dışı matriks protein analizini desteklemiştir.

Tümörlerin karmaşıklığı göz önüne alındığında, kanserle mücadele için kemoterapi, fotodinamik terapi ve fototermal terapi gibi birçok nanomalzeme tabanlı tedavi modelleri geliştirilmiştir. Her tedavi yöntemi farklı koşullar altında araştırıldığı için hangi yöntemin daha iyi olduğu veya hangi tedavi kombinasyonunun en uygun yaklaşım olduğu henüz netlik kazanmamıştır. Bu belirsiz durumu açıklamak ve hangi nanomalzeme tabanlı tedavinin öne çıktığını belirlemek için Liu ve arkadaşları bir çalışma gerçekleştirmiştir. Yapılan bu çalışmada kemoterapi, fotodinamik terapi ve fototermal terapinin terapötik etkileri indirgenmiş grafen oksit (RGO) kullanılarak geleneksel 2-boyutlu kültür ve 3-boyutlu tümör sferoid modelinde denenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu üç tip terapinin geleneksel 2-boyutlu kültür modelinde etkili olduğu gözlenirken, sadece fototermal terapinin 3-boyutlu tümör sferoid modelinde büyük tedavi etkinliği gösterdiği belirlenmiştir (57).

Üç boyutlu tümör sferoid modelinin geleneksel 2-boyutlu kültürden daha etkili sonuçlar vermesi; *in vitro* ortamda tümör yapısını daha iyi taklit ettiği için bu sonuçların elde edildiği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile literatürdeki çalışmalar karşılaştırıldığında 3-boyutlu kültürün geleneksel 2-boyutlu kültürden farklı davrandığı görülmüştür. Buna ek olarak literatürde 3-boyutlu kültürlerin *in vivo* ortamdaki tümör yapısını daha iyi taklit ettiği ve hücre dışı matriks proteinlerini arttırdığı belirtilmiştir (57,59,60).

## 5.2. SONUÇ

MCF7 ve U87 hücre hatlarından elde edilen 2-boyutlu ve 3-boyutlu kültürlerle 2 farklı derişimde sGO verilerek, kanser hücreleri üzerinde değişik kültür ortamlarında nasıl etki edeceği araştırılmıştır.

Bu araştırma sonuçlarına göre sGO' e maruz kalan 2-boyutlu kültür ortamındaki hücreler ya birbirine yaklaşarak kümelenmeler oluşturmuş yada 3-boyutlu kültürden elde edilen sferoidlerde büyüme gözlenmiştir. Bu büyüme artışı ve kümelenmelerin proliferasyondan kaynaklanmadığı ortaya çıkarılmıştır.

Proliferasyonun azalmasına rağmen sferoidlerde olan büyümenin nedeni yapılan literatür taramasında benzer bir çalışma ile belirlendi. Yapılan bu çalışmada grafenin hücre dışı matriks proteinlerini arttırdığı vurgulanmaktadır (59). Tez çalışmasını destekler nitelikteki

bu çalışmadan faydalanılarak hücre dışı matriks proteinlerinin sferoidlerin büyümesine neden olabileceği düşünülmüştür.

Ultra ince kesitleri alınarak toluen blue ile boyanan sferoid kesitlerinde görülen boşlukların grafenin hücre içine alındığını ve hücre dışı matriks proteinlerini arttırdığı fikrini desteklemiştir. Ayrıca TEM görüntüleri bunu kanıtlar niteliktedir. Histolojik analizlerin yanısıra yapılan hücre dışı matriks proteinlerinin belirlenmesi için eş zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Park ve ekibinin yaptığı çalışmada (59) hücre dışı matriks proteini geni olan *CX43* kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında *CX43* geninin yanısıra literatürde çok sık geçen *β1*, *α1*, *α2*, *α5*, *α11* genlerinin ifadeleride incelenmiştir. Özellikle sferoidlerde bu hücre dışı matriks proteini genlerinden olan *CX43*, *β1*, *α1*, *α2*, *α5*, *α11* genlerinin ifadelerinde artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca immünofloresan boyama ile integrin ve laminin proteinlerinin ifadelerine bakılmıştır ve eş zamanlı PCR sonuçlarını destekler nitelikte olan sonuçlar elde edilmiştir. sGO derişiminin artmasına bağılı olarak integrin ve laminin proteinlerinin ifadesinde artış olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında elde edilen veriler ışığında sGO' e maruz kalan 3-boyutlu tümör sferoidlerin hücre dışı matriks proteinlerini arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile birlikte grafen tabanlı biyomalzemelerin özellikle GO' in ileride yapılacak olan çalışmalarda kanser biyolojisini daha iyi anlamak ve kanser terapisinde grafen veya grafen türevlerinin ne gibi etkileri olduğunu belirlemek adına katkı sağlayacağı öngörülmektedir.



## KAYNAKLAR

1. Zhang Q, Wu Z, Li N, et al. Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity and application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;77:1363-1375.
2. Slonczewski JC, Weiss PR. Band Structure of Graphite. *Physical Review.* 1958;109(2):272-279.
3. Venables JA, Spiller GDT, Hanbucken M. Nucleation and growth of thin films. *Reports on Progress in Physics.* 1984;47(4):399.
4. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science.* 2004;306(5696):666-669.
5. Geim AK. Nobel Lecture: Random walk to graphene. *Reviews of Modern Physics.* 2011;83(3):851-862.
6. Novoselov KS. Graphene: materials in the Flatland (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(31):6986-7002.
7. Feng L, Wu L, Qu X. New horizons for diagnostics and therapeutic applications of graphene and graphene oxide. *Adv Mater.* 2013;25(2):168-186.
8. Hu YH, Wang H, Hu B. Thinnest Two-Dimensional Nanomaterial—Graphene for Solar Energy. *ChemSusChem.* 2010;3(7):782-796.
9. Sharma G, Kumar D, Kumar A, et al. Revolution from monometallic to trimetallic nanoparticle composites, various synthesis methods and their applications: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;71:1216-1230.
10. Hasanzadeh M, Shadjou N. What are the reasons for low use of graphene quantum dots in immunosensing of cancer biomarkers? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;71:1313-1326.
11. Liu J, Cui L, Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta biomaterialia.* 2013;9(12):9243-9257.
12. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chem Soc Rev.* 2010;39(1):228-240.
13. Lerf A, He H, Forster M, Klinowski J. Structure of Graphite Oxide Revisited. *The Journal of Physical Chemistry B.* 1998;102(23):4477-4482.
14. Stankovich S, Piner RD, Nguyen ST, Ruoff RS. Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets. *Carbon.* 2006;44(15):3342-3347.
15. Li Z, Wong SL. Functionalization of 2D transition metal dichalcogenides for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;70(Pt 2):1095-1106.

16. Krishna KV, Menard-Moyon C, Verma S, Bianco A. Graphene-based nanomaterials for nanobiotechnology and biomedical applications. *Nanomedicine (London, England)*. 2013;8(10):1669-1688.
17. Servant A, Bianco A, Prato M, Kostarelos K. Graphene for multi-functional synthetic biology: the last 'zeitgeist' in nanomedicine. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(7):1638-1649.
18. Cheng C, Li S, Thomas A, Kotov NA, Haag R. Functional Graphene Nanomaterials Based Architectures: Biointeractions, Fabrications, and Emerging Biological Applications. *Chem Rev*. 2017;117(3):1826-1914.
19. Reina G, Gonzalez-Dominguez JM, Criado A, Vazquez E, Bianco A, Prato M. Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 2017;46(15):4400-4416.
20. Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong BH, Min DH, Kostarelos K. Prospects and challenges of graphene in biomedical applications. *Adv Mater*. 2013;25(16):2258-2268.
21. Sun X, Liu Z, Welsher K, et al. Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery. *Nano research*. 2008;1(3):203-212.
22. Feng L, Zhang S, Liu Z. Graphene based gene transfection. *Nanoscale*. 2011;3(3):1252-1257.
23. Lee WC, Lim CH, Shi H, et al. Origin of enhanced stem cell growth and differentiation on graphene and graphene oxide. *ACS Nano*. 2011;5(9):7334-7341.
24. Heo C, Yoo J, Lee S, et al. The control of neural cell-to-cell interactions through non-contact electrical field stimulation using graphene electrodes. *Biomaterials*. 2011;32(1):19-27.
25. Kang P, Wang MC, Nam S. Bioelectronics with two-dimensional materials. *Microelectronic Engineering*. 2016;161(Supplement C):18-35.
26. Tiwari JN, Vij V, Kemp KC, Kim KS. Engineered Carbon-Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules. *ACS Nano*. 2016;10(1):46-80.
27. Krishna KV, Ménard-Moyon C, Verma S, Bianco A. Graphene-based nanomaterials for nanobiotechnology and biomedical applications. *Nanomedicine*. 2013;8(10):1669-1688.
28. Giovanni M, Bonanni A, Pumera M. Detection of DNA hybridization on chemically modified graphene platforms. *The Analyst*. 2012;137(3):580-583.
29. Bonanni A, Pumera M. Graphene Platform for Hairpin-DNA-Based Impedimetric Genosensing. *ACS Nano*. 2011;5(3):2356-2361.
30. Lee J, Min DH. A simple fluorometric assay for DNA exonuclease activity based on graphene oxide. *The Analyst*. 2012;137(9):2024-2026.

31. Jang H, Kim YK, Kwon HM, Yeo WS, Kim DE, Min DH. A graphene-based platform for the assay of duplex-DNA unwinding by helicase. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(33):5703-5707.
32. Lopez-Gomez M, Malmierca E, de Gorgolas M, Casado E. Cancer in developing countries: the next most preventable pandemic. The global problem of cancer. *Critical reviews in oncology/hematology.* 2013;88(1):117-122.
33. Fernandez-Fernandez A, Manchanda R, McGoron AJ. Theranostic applications of nanomaterials in cancer: drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms. *Applied biochemistry and biotechnology.* 2011;165(7-8):1628-1651.
34. Sechi G, Bedognetti D, Sgarrella F, et al. The perception of nanotechnology and nanomedicine: a worldwide social media study. *Nanomedicine (London, England).* 2014;9(10):1475-1486.
35. Orecchioni M, Bedognetti D, Sgarrella F, Marincola FM, Bianco A, Delogu LG. Impact of carbon nanotubes and graphene on immune cells. *Journal of Translational Medicine.* 2014;12(1):138.
36. Zhang L, Xia J, Zhao Q, Liu L, Zhang Z. Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany).* 2010;6(4):537-544.
37. Dinescu S, Ionita M, Pandele AM, et al. In vitro cytocompatibility evaluation of chitosan/graphene oxide 3D scaffold composites designed for bone tissue engineering. *Bio-medical materials and engineering.* 2014;24(6):2249-2256.
38. Feng L, Liu Z. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. *Nanomedicine (London, England).* 2011;6(2):317-324.
39. Sahoo NG, Bao H, Pan Y, et al. Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study. *Chemical communications (Cambridge, England).* 2011;47(18):5235-5237.
40. Orecchioni M, Cabizza R, Bianco A, Delogu LG. Graphene as cancer theranostic tool: progress and future challenges. *Theranostics.* 2015;5(7):710-723.
41. Liu G, Shen H, Mao J, et al. Transferrin modified graphene oxide for glioma-targeted drug delivery: in vitro and in vivo evaluations. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(15):6909-6914.
42. Wei G, Yan M, Dong R, et al. Covalent modification of reduced graphene oxide by means of diazonium chemistry and use as a drug-delivery system. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany).* 2012;18(46):14708-14716.
43. Maity AR, Chakraborty A, Mondal A, Jana NR. Carbohydrate coated, folate functionalized colloidal graphene as a nanocarrier for both hydrophobic and hydrophilic drugs. *Nanoscale.* 2014;6(5):2752-2758.

44. Kim H, Namgung R, Singha K, Oh IK, Kim WJ. Graphene oxide-polyethylenimine nanoconstruct as a gene delivery vector and bioimaging tool. *Bioconjugate chemistry*. 2011;22(12):2558-2567.
45. Zhi F, Dong H, Jia X, et al. Functionalized graphene oxide mediated adriamycin delivery and miR-21 gene silencing to overcome tumor multidrug resistance in vitro. *PloS one*. 2013;8(3):e60034.
46. Bai J, Liu Y, Jiang X. Multifunctional PEG-GO/CuS nanocomposites for near-infrared chemo-photothermal therapy. *Biomaterials*. 2014;35(22):5805-5813.
47. Shi J, Wang L, Zhang J, et al. A tumor-targeting near-infrared laser-triggered drug delivery system based on GO@Ag nanoparticles for chemo-photothermal therapy and X-ray imaging. *Biomaterials*. 2014;35(22):5847-5861.
48. Shi X, Gong H, Li Y, Wang C, Cheng L, Liu Z. Graphene-based magnetic plasmonic nanocomposite for dual bioimaging and photothermal therapy. *Biomaterials*. 2013;34(20):4786-4793.
49. Robinson JT, Tabakman SM, Liang Y, et al. Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy. *Journal of the American Chemical Society*. 2011;133(17):6825-6831.
50. Nergiz SZ, Gandra N, Tadepalli S, Singamaneni S. Multifunctional Hybrid Nanopatches of Graphene Oxide and Gold Nanostars for Ultraefficient Photothermal Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014;6(18):16395-16402.
51. Hu Z, Huang Y, Sun S, et al. Visible light driven photodynamic anticancer activity of graphene oxide/TiO<sub>2</sub> hybrid. *Carbon*. 2012;50(3):994-1004.
52. Huang P, Xu C, Lin J, et al. Folic Acid-conjugated Graphene Oxide loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy. *Theranostics*. 2011;1:240-250.
53. Miao W, Shim G, Lee S, Lee S, Choe YS, Oh YK. Safety and tumor tissue accumulation of pegylated graphene oxide nanosheets for co-delivery of anticancer drug and photosensitizer. *Biomaterials*. 2013;34(13):3402-3410.
54. Zhou L, Zhou L, Wei S, et al. Combination of chemotherapy and photodynamic therapy using graphene oxide as drug delivery system. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2014;135:7-16.
55. Ge J, Lan M, Zhou B, et al. A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. *Nature communications*. 2014;5:4596.
56. Rong P, Yang K, Srivastan A, et al. Photosensitizer loaded nano-graphene for multimodality imaging guided tumor photodynamic therapy. *Theranostics*. 2014;4(3):229-239.

57. Liu J, Liu K, Feng L, Liu Z, Xu L. Comparison of nanomedicine-based chemotherapy, photodynamic therapy and photothermal therapy using reduced graphene oxide for the model system. *Biomater Sci.* 2017;5(2):331-340.
58. Orecchioni M, Jasim DA, Pescatori M, et al. Molecular and Genomic Impact of Large and Small Lateral Dimension Graphene Oxide Sheets on Human Immune Cells from Healthy Donors. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(2):276-287.
59. Park J, Kim YS, Ryu S, et al. Graphene Potentiates the Myocardial Repair Efficacy of Mesenchymal Stem Cells by Stimulating the Expression of Angiogenic Growth Factors and Gap Junction Protein. *Advanced Functional Materials.* 2015;25(17):2590-2600.
60. Park J, Park S, Ryu S, et al. Graphene-regulated cardiomyogenic differentiation process of mesenchymal stem cells by enhancing the expression of extracellular matrix proteins and cell signaling molecules. *Adv Healthc Mater.* 2014;3(2):176-181.



## EKLER

### EK-1 PCR İÇİN KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ

Genin Adı	Primer Dizisi	Firma Adı
MAPK1-F MAPK1-R	5' -TCC CAA ATG CTG ACT CCA AAG- 3' (21mer) 5' -CAT GTC GAA CTT GAA TGG TGC- 3' (21 mer)	Macrogen
CX43-F CX43-R	5' -TCT GAG TGC CTG AAC TTG C- 3' (19mer) 5' -ACT GAC AGC CAC ACC TTC C- 3' (19mer)	Macrogen
FAK-F FAK-R	5' - GAA GCA TTG GGT CGG GAA CTA- 3' (21mer) 5' - CTC AAT GCA GTT TGG AGG TGC- 3' (21mer)	Macrogen
$\alpha$ 1-F $\alpha$ 1-R	5' -ACA TCA GCC AAG TCA ATG TTT CG- 3' (23mer) 5' -AGC ATT AAC AGC AAC AAT CCG G- 3' (22mer)	Macrogen
$\alpha$ 2-F $\alpha$ 2-R	5' -GCT GCT GTG CAT TAG ATA TTA G- 3' (22mer) 5' -CTG TAA CTT CTG GTG AAA TCC T- 3' (22mer)	Macrogen
$\alpha$ 5-F $\alpha$ 5-R	5' -ACT AGG AAA TCC ATT CAC AGT TC- 3' (23mer) 5' -GCA TAG TTA GTG TTC TTT GTT GG- 3' (23mer)	Macrogen
$\alpha$ 11-F $\alpha$ 11-R	5' -TGG GCG CAC CCA TGT ACT TC- 3' (20mer) 5' -ATG GCT CCT GCG TGG TTG TC- 3' (20mer)	Macrogen
$\beta$ 1-F $\beta$ 1-R	5' -ATG AAT GAA ATG AGG AGG ATT ACT TCG- 3' (27mer) 5' -AAA ACA CCA GCA GCC GTG TAA C- 3' (22mer)	Macrogen

## ÖZGEÇMİŞ

ADI-SOYADI: CANSU GÜRCAN

DOĞUM YERİ: ANKARA

DOĞUM TARİHİ: 13/ 05/ 1991

YABANCI DİLİ: İNGİLİZCE

## EĞİTİM DURUMU

- Lisans: ANKARA ÜNİVERSİTESİ / Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü (2011-2016)

## STAJ TECRÜBESİ

- ERASMUS STAJI Associate Prof. Dr. Vincenzo Lionetti danışmanlığında;  $\beta$ -glukanın kardiovasküler sistem üzerine olan etkisi başlıklı çalışmada erasmus staj tecrübesi (Temmuz- Eylül 2015 Scuola Superiore Sant'Anna Üniversitesi Pisa, İtalya)
- ANKARA ÜNİVERSİTESİ Prof. Dr. Mustafa Akçelik danışmanlığında; mikrobiyoloji laboratuvarlarında staj tecrübesi (Eylül 2015- Haziran 2016)

## İŞ TECRÜBESİ

- Kurumu: Ankara Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

“Grafenin immün etkilerinin omik yöntemler ve genotoksik analizler ile karakterize edilmesi (G-IMMUNOMICS)”

Görevi: TÜBİTAK 315S102 nolu proje bursiyeri

Yılları: Nisan 2017- Devam etmekteyim

## MAKALELER

- Springer, Advances in Experimental Medicine and Biology, Graphene based materials in neural tissue regeneration. Tuğçe Aydın, **Cansu Gurcan**, Hadiseh Taheri, Açelya Yilmazer. (gönderildi)

- Carbon, Graphene based toxicity and genotoxicity. **Cansu Gurcan**, Hadiseh Taheri, Lucia Gemma Delogu, Açelya Yilmazer. (gönderildi)
- Stem Cells International, Evaluation of graphene based toxicity and genotoxicity in human mesenchymal stem cells. Hadiseh Taheri, **Cansu Gurcan**, Lucia Gemma Delogu, Açelya Yilmazer. (gönderildi)

## KİTAP BÖLÜMLERİ

- **Gurcan C**, Taheri H, Yilmazer A. Introduction to In Vivo Cell Reprogramming Technology. In: Yilmazer A, ed. *In Vivo Reprogramming in Regenerative Medicine*. Cham: Springer International Publishing; 2017:1-10. doi.org/10.1007/978-3-319-65720-2\_1
- Taheri H, **Gurcan C**, Yilmazer A. Challenges and Future Perspectives for In Vivo Reprogramming Technology. In: Yilmazer A, ed. *In Vivo Reprogramming in Regenerative Medicine*. Cham: Springer International Publishing; 2017:99-103. doi.org/10.1007/978-3-319-65720-2\_7

## KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri

- **C.Gürcan**, H.Taheri, I. Lazaro, K. Kostarelos, A. Yilmazer. Treatment of tumor spheroids with graphene oxide, 22<sup>nd</sup> Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED), 12-14 May, 2017, Ankara, Turkey.





# BIOMED2017

22<sup>ND</sup> INTERNATIONAL BIOMEDICAL  
SCIENCE & TECHNOLOGY SYMPOSIUM

12-14 MAY 2017 - ANKARA | TURKEY

## Abstract Book

Organised By

**BIOVALDA**

ELCINLAB



biomat™



## Treatment of Tumor Spheroids with Graphene Oxide

Cansu Gürçan<sup>1,2</sup>, Hadiseh Taheri<sup>1,2</sup>, Irene De Lazaro<sup>3</sup>, Kostas Kostarelou<sup>3</sup>, Açelya Yilmazer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Institute, Ankara University, Turkey

<sup>2</sup>Biomedical Engineering Department, Faculty of Engineering, Ankara University, Turkey

<sup>3</sup>Nanomedicine Lab, Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester, Manchester, UK

gurcanc@ankara.edu.tr, ayilmazer@ankara.edu.tr

### INTRODUCTION

Graphene, a two-dimensional, single-layer sheet of sp<sup>2</sup> hybridized carbon atoms, carbon-based material with physical properties such as electronic conductivity, thermal stability, mechanical strength<sup>1</sup>. There are different forms of graphene: graphene oxide (GO), reduced graphene oxide, and exfoliated graphite. These forms can be easily processed and functionalized<sup>1</sup>. These functionalized forms can have different interactions with biological structures and have been studied for different biomedical applications. In this work, we aimed to investigate the effect of graphene oxide (GO) on tumor spheroids.

### MATERIALS & METHODS

In this study, two cell lines were used, MCF7 (human breast carcinoma) and U87MG (human glioblastoma). Cells created 3D-spheroids on agar-coated plates. Three days after spheroid formation, spheroids were treated with two concentrations (10ug/ml and 100ug/ml) of GO. Exposure time was 4 hours. In order to analyze cell proliferation in this 3D culture system, spheroid diameter was measured 0, 2, 4, 6 and 10 days after exposure. Spheroids obtained at day 6 were used to isolate RNA and perform qRT-PCR analysis for proliferation markers. On day 10, colorimetric assay MTT was performed to assess cell viability.

### RESULTS AND DISCUSSION

Treatment with GO changed the proliferation rate of spheroids, as the diameter of spheroids incubated with GO increased comparable to that of untreated spheroids. This was also evident by the cell proliferation assay MTT. According to the qRT-PCR results, GO treated spheroids showed higher expression of proliferation markers compared to untreated groups.

### CONCLUSION

Treatment of tumor spheroids with GO material enhances cellular proliferation of tumor spheroids. Further studies are needed to elucidate if the enhancement of cellular proliferation by GO is linked to the increased tumorigenicity of tumor cells or availability of a better cell culture environment for spheroid growth.

### REFERENCES

1. Huang X, Yin Z, Wu S, et al. Graphene-based materials: Synthesis, characterization, properties, and applications. *Small*. 2011;7(14):1876-1902. doi:10.1002/sml.201002009.

### ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge support from the European Commission (FlagEra G-Immunomics Project) and the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK, grant number 315S102).