TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI
PROJE DETAY RAPORU
FİKİR KATEGORİSİ

PROJE ADI: İki ve Üç Boyutlu Hücre Kültür Sistemlerinde Microcystis Ekstraktının Etkilerinin Araştırılması

TAKIM ADI: 3D Techno Team

TAKIM ID: T3-20687-156

DANIŞMAN ADI: Sümeyye Özyaman

İçindekiler

1. **Proje Özeti……2**
2. **Problem/Sorun ……..…..2**
3. **Çözüm ……..…..3**
4. **Yöntem……...…3**
5. **Yenilikçi (İnovatif) Yönü……...…..8**
6. **Uygulanabilirlik……9**
7. **Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar) ……..….9**
8. **Proje Ekibi……..…...9**
9. **Kaynaklar ……..….....9**
10. **Ekler……11**

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünüp çoğalmasıyla ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında oluşan karmaşık bir hastalıktır. Glioblastoma kanser çeşitleri arasında en dirençli ve en kötü seyreden, meme kanseri ise kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür. Doğal ürünler yıllardır daha fazla araştırılmayı bekleyen, güçlü farmasötik amaçları olan önemli moleküler kaynaklardır. Özellikle siyanobakterilerden izole edilen sekonder metabolitler benzersiz yapısal iskeleleri ve önemli biyolojik aktiviteleri ile ilaç üretimindeki potansiyel özelliklerinden dolayı ilgi görmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda, siyanobakteri cinsi olan *Microcystis'*in MCF-7 ve U-87MG hücre hatlarındaki etkilerinin iki boyutlu hücre kültürü ile incelenmesi ve tümör gelişimi üzerindeki etkilerinin üç boyutlu hücre kültürü ile histolojik olarak görüntülenmesi hedeflendi.

Ekstrakte edilerek kullanılan *Microcystis* medyumda çözülerek iki boyutlu hücre kültüründe MCF-7 ve U-87 MG hücre hatlarına farklı dozlarda (50 µg/ml–500 µg/ml) uygulanırken pozitif kontrol olarak kemoterapötik ajan olan metotreksat (10 µM) kullanıldı. Hücrelerin 24 saatlik inkübasyonları sonrası metilen mavisi kullanılarak % canlılık oranları Thoma lamı ile hesaplandı. Deneyler 3 kez tekrar edilerek istatistiksel sonuçlar tablo ve grafik çizimleri ile gösterildi. Ayrıca *Microcystis* ekstraktı in vivo benzeri üç boyutlu tümör modelleri üzerindeki etkilerini gözlemlemek için oluşturulan sferoidlere uygulandı. Takip işlemi uygulanan sferoidler parafin bloklara gömülerek mikrotomda kesitler alındı. Tümor yapılarının genel histolojik görünümleri hematoksilen eozin boyasıyla gösterildi.

Çalışmamız sonucunda iki boyutlu hücre kültüründe *Microcystis* ekstraktının MCF-7 ve U-87MG hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri gösterilirken üç boyutlu hücre kültüründe de MTX grubu ile benzer histolojik yapılar görüntülendi. Dolayısıyla üç boyutlu modelleme ile antikanser etkilerini ilk kez ortaya koyduğumuz *Microcystis* ekstraktının daha ileri çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

2. Problem/Sorun:

Kanser günümüzde tüm dünyada büyük bir sağlık problemidir ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre en yaygın ikinci ölüm nedenidir. Son verilere göre kanserin 2018 yılında yaklaşık 9.6 milyon insanın ölümüne neden olacağı bildirilmiştir. Beyin tümörleri kanser sonucu meydana gelen bu ölümlerin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Glioma, merkezi sinir sisteminin en yaygın malign tümörüdür ve bu hastaların ortalama yaşam süresi 12-15 aydır. Öte yandan dünyadaki her 6 ölümden yaklaşık 1 tanesi kanserden kaynaklanmaktadır ve 627.000 kadının meme kanserinden

(kadınlardaki tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %15'i) öldüğü tahmin edilmektedir. Meme kanserine yakalanma oranı gelişmiş bölgelerdeki kadınlar arasında daha yüksek olmakla birlikte, küresel olarak neredeyse her bölgede artış göstermektedir. Doğal ürünler uzun yıllardan beri daha fazla araştırılmayı bekleyen, güçlü farmasötik amaçları olan önemli moleküler kaynakları barındırır. Son dönemlerde, deniz kaynaklarından elde edilerek geliştirilen ilaçlar, çeşitli kimyasal gruplarda sınıflandırılan etkili deniz bileşenlerinin izolasyonu ile her geçen gün artış gösteren önemli terapötikler olarak ortaya çıkmaktadır. Siyanobakterilerden izole edilen sekonder metabolitler de benzersiz yapısal iskeleleri ve antibakteriyel, antifungal, antikanser, anti-tüberküloz, immünosüpresif ve anti-inflamatuar gibi önemli biyolojik özellikleri ile ilaç üretimindeki potansiyel özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir.

Kanser terapisinin gelişimi ile ilgili temel sorunlardan biri, hayvan modellerinde ve hastalarda gözlemlenen sonuçlar arasında, tekrarlanabilirlik oranının düşük olmasıdır. Çünkü hayvan modellerinden elde edilen verilerin % 10'undan daha azı insanlara uyarlanabilir (Mak I. W ve ark., 2014) Bu yıpranma oranını azaltmak, preklinik taramayı iyileştirmek ve hayvan kullanımını azaltmak için daha fazla fizyolojik insan modeline ihtiyaç vardır. Kanser sferoidleri gibi tek katmanlı ve üç boyutlu (3D) hücre kültürü metotları, yüksek verimli tarama için önemli bir araç olarak ortaya çıkmaktadır.

3. Çözüm

Son yıllarda bitkiler üzerindeki çalışmaların artmasının sebepleri; kolay ve ucuz tedavi olanağı sağlaması, sentetik ilaçların taşıdığı tehlikeli yan etkilere sahip olmaması ve bitkisel ilaçların birden fazla etkiye sahip olmasıdır. Tüm bu bilgiler ışında çalışmamızda in vitro yanık ve yara modelinde sedef otu ve tarhun bitki ekstraktlarının yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırılması, antimikrobiyal aktivitelerinin de ortaya konarak bu bitkiler üzerinde yapılacak daha sonraki farmakolojik çalışmalara ışık tutulması amaçlanmıştır.

Deney gruplarına *Microcystis* ekstraktının 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml dozlarda uygulanarak kontrol grubu ve MTX ile kıyaslandığında, hem MCF-7 hem de U-87 MG hücrelerinde % canlılık ve proliferasyon oranlarında azalma meydana geldiği gözlendi. Çalışmamızda kullanılan her iki hücre hattında da *Microcystis* ekstraktının 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml dozlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında % canlılık oranlarında meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). MTX uygulanan grup kontrol grubu ile kıyaslandığında meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,001$).

Ayrıca MTX uygulaması ile deney grupları kıyaslandığında MCF-7 ve U-87 MG hücre hatlarının canlılık oranlarında 250 µg/ml ve 500 µg/ml dozlarda meydana gelen azalmalar istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaştı ($p<0,001$).

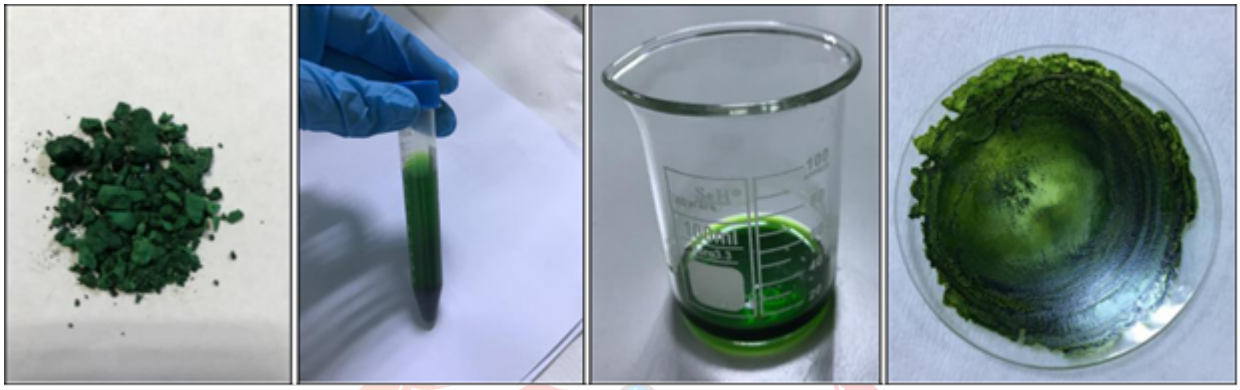
4. Yöntem

Çalışmalarımızın hücre kültürü aşaması için Yıldız Teknik Üniversitesi merkez laboratuvarı, histolojik çalışmalar için İstanbul Medipol Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ABD rutin histoloji laboratuvarı ve diğer tüm deneysel çalışmalar için Bayrampaşa Bilim Merkezi biyoloji laboratuvarı ekipman ve imkânlarından faydalanıldı.

4.1.Siyanobakteriyel (*Microcystis*) Ekstraktın Elde Edilmesi

Çalışmamızda kullanılan siyanobakteri cinsi *Microcystis* İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi'nin örnek havuzundan temin edildi. Biyokütlede 300 ml sıvı kültürden 0.21 g kuru ağırlık elde edildi. *Microcystis* biyokütle örneği tartıldı. Bu örnekler 0,1 gr tartılarak falcon tüplerine alınan

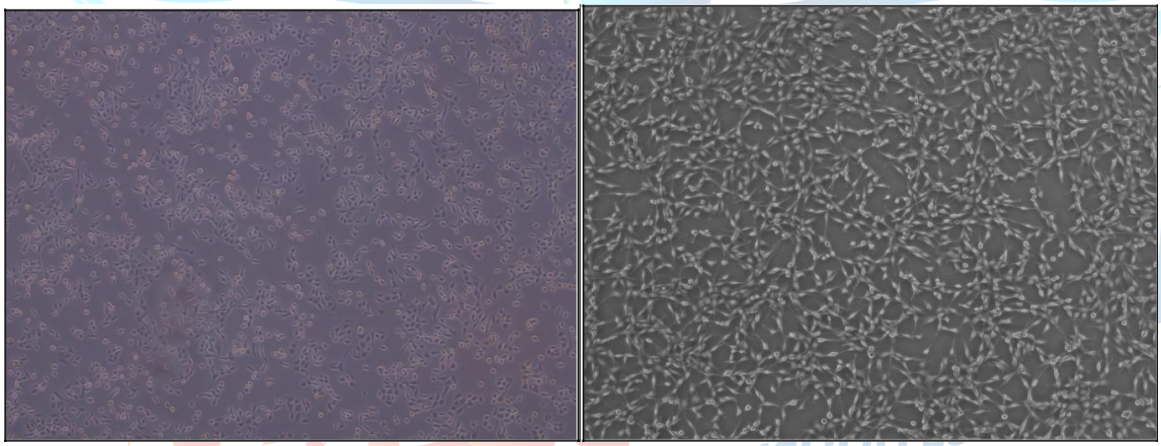
çözücü olarak 10 ml metanol üzerine eklenerek 1 saat oda sıcaklığında ekstrakte edildikten sonra 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip 24 saat ekstraksiyona bırakıldı. Ektraksiyon sonunda elde edilen süpernatantlar su banyosunda metanolden uzaklaştırıldı. Sonrasında ekstrakt belirlenen dozlarda kullanılmak üzere medyumda çözülerek kullanılıncaya kadar +4°C de muhafaza edildi (Şekil 1).



Şekil 1. *Microcystis* ekstraktının eldesi.

4.2.Hücre Kültürü

Araştırmalarımızda Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından temin edilen olarak bulunan insan meme kanseri (MCF-7) ve insan glioblastoma (U-87 MG) hücre hatları kullanıldı (Şekil 2).



Şekil 2. Flasklara ekilen MCF-7 ve U-87 MG hücrelerinin faz kontrast mikroskobunda çekilen görüntüleri.

<u>İki Boyutlu Hücre Kültürü</u>

Çalışmamızda kullanılan her iki hücre hattı 75 cm2 hücre kültür flasklarında çözülerek çoğaltıldı. Kullanılacak U-87 MG ve MCF-7 hücreleri için besi ortamı olarak inaktive edilen %10 Fosfat Tamponlu Su Çözeltisi (PBS), 100 IU/ml penisilin ve streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture (DMEM) medyumu kullanıldı. Hücreler bu besi ortamını içeren flasklarda, iç ortamı %5 CO2 , %95 hava karışımı olan 37°C'lik inkübatör (ESCO) içinde tutuldu ve haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

Semi-konfluent kültürler kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tamponunda hazırlanan %0,3 tripsin (Gibco) ile tripsinize edilerek toplandı. 1500 rpm'de 1-3 dakika süreyle santrifüj (elektro-mag) edildi. Santrifüj işlemi 3 ml medyum ile tekrarlanarak tripsin etkisi ortadan kaldırıldı. Hücreler taze hazırlanan serumlu medyumda tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücreler hemositometrik sayma kamarasında sayılarak deney için yeterli hücre sayısının bulunup bulunmadığı saptandı. Deneyler 24 kuyucuklu kültür pleytlerinde gerçekleştirildi. Her kuyucuğa

taze hazırlanan ve %10 serum içeren 2 ml DMEM (Sigma) medyumu konuldu. Bu medyumun içerisine %100 canlı 3x10^5 MCF-7 ve U-87 MG hücreleri ekildi. Kültür kapları hafifçe sallanarak hücrelerin kuyucuk yüzeyine homojen yayılmaları sağlandı (Şekil 3).

Şekil 3. Hücre kültürü çalışmaları.

Deney grupları MCF-7 ve U-87 MG hücre hatları için iki boyutlu hücre kültüründe şu şekilde oluşturuldu;

Kontrol: Kültür pleytlerine MCF-7 ve U-87 MG hücre hatları yalnızca medyum içerisine 3.10^5 hücre %100 canlı olacak şekilde ekildi.

Microcystis: Kültür pleytlerine MCF-7 ve U-87 MG hücre hatları her kuyucuğa 3.10^5 hücre %100 canlı olarak ekildi. *Microcystis* ekstraktının medyum ile hazırlanan dilüsyon oranları 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml olacak şekilde uygulandı.

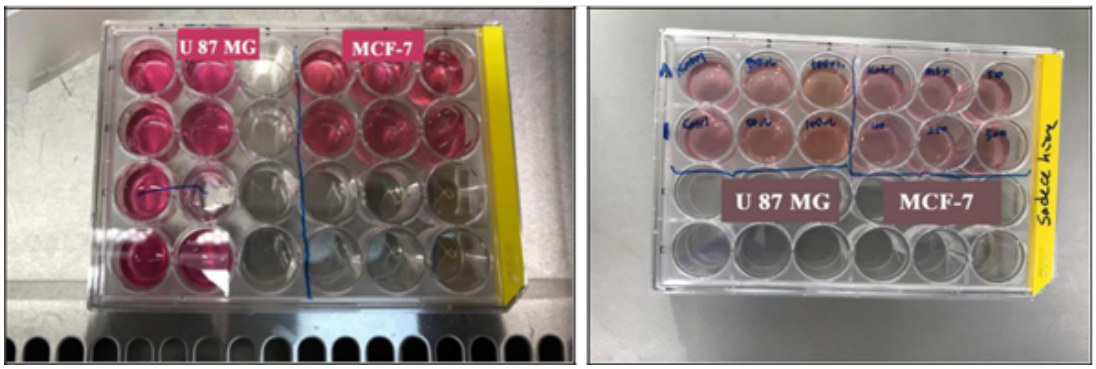
Metotreksat: Kültür pleytlerinde MCF-7 ve U-87 MG hücre hatları her kuyucuğa 3.10^5 hücre %100 canlı olarak ekildi. Metotreksat ise %0,05'ten az olacak şekilde DMSO'da çözülerek medyumda 10 µM olacak şekilde uygulandı.

Tüm gruplar 37˚C'de %5 CO2'li inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi ve deneyler 3 kez kontrollü bir şekilde tekrarlanarak sayımları yapıldı.

Üç Boyutlu Hücre Kültürü

Üç boyutlu modelleme için çok hücreli tümör sferoidleri üretimi sıvı üst tabaka yöntemi (Liquid overlay tecnique) ile gerçekleştirildi. (Acker ve ark., 2012). Steril bidistile suda hazırlanan 60 °C' ye kadar soğutulan % 0,3' lük Agar solüsyonu ve 40°C' ye kadar ısıtılan medyum 1/1 oranında karıştırılarak hazırlandı ve 24 kuyucuklu kültür kaplarındaki kuyucukların her birine 500 µl konarak tüm yüzeyinin kaplanması sağlandı. Kuyucuklardaki agar-medyum karışımı yeteri kadar sertleşmesi için +4°C'de 10 dakika bekletildi. Ardından üzerlerine 1 ml DMEM medyumu eklenerek inkübatöre kaldırıldı. İki boyutlu hücre kültürlerinde flasklarda üretilen hücreler tripsinize edilerek toplandı ve sayımlar yapıldı. Takiben 24 kuyucuklu kültür kaplarındaki her bir agar-medyum karışımı bulunan kuyucuğa %100 canlı 4×105 U-87 MG ve MCF-7 hücreleri ayrı ayrı ekildi (Şekil 4).

İki boyutlu hücre kültürü deneylerinde kullanılan gruplar esas alınarak her deney grubu için kuyucuklara ekim yapıldı. Hücreler, 37 °C de %5'lik CO2 hava karışımında, %95 nemli ortamda sferoid oluşturmaları için 5-7 gün inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 100-150 civarında oluşan ve boyutları 100-150 mikron arasında değişen sferoidlere taze hazırlanan 100 µg/ml Microcystis ekstraktı ve 10 µM MTX ilacı iki boyutlu hücre kültüründe olduğu gibi ayrı ayrı uygulandı. İlaç uygulamalarını takiben 24. saatin sonunda her gruptaki sferoidler genel histolojik görünümlerinin incelenmesi için toplandı ve takibe alındı (Ek 1).



Şekil 4. İki ve üç boyutlu hücre ekimi yapılan kültür pleytleri.

<u>İki Boyutlu Hücre Kültüründe Sayım ve Canlılık Tayini</u>

Canlılık tayini için; 24 saat inkübasyon süresinin sonunda kuyucukların üst medyumları alınarak 3 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi ve etkileşim sonucu inkübasyon medyumuna çıkması mümkün olan hücreler üst medyumdan ayrıldı. Ardından kuyucuklardaki hücreler üzerine %0,3'lük tripsin solüsyonu eklenerek hücreler zeminden ve birbirlerinden ayrıştırılarak santrifüj edilip tripsin uzaklaştırıldı. Diğer hücrelerle aynı tüpte toplanan hücreler 2 ml medyum ile tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Sayım için; 0,1 53 hacimde sayım yapılma kuralına göre, Thoma lamının bir çukur kısmına konulan örnek üstüne lamel kapatıldıktan sonra (0,1 mm yüksekliğinde sıvı ile) sayıldı. Lamda 16 tane büyük kare, her büyük karede 25 tane küçük kare olmak üzere toplam 400 tane küçük kare vardır. Her bir grup için ml'de ki hücre sayısı = 16 x 10 4 x seyreltme faktörü formülünden hesaplandı.10^4 = 0,1 mm 3 hacimdeki sayım sonucunu 1 ml'de ki sayıya dönüştürmek için sabit değer olarak kullanıldı. Toplam hücre sayısı ml'de ki hücre sayısı x toplam hacim formülü kullanılarak hesaplandı. Santrifüj sonrası, süspansiyon halinde hazırlanan hücreler ile %4'lük Tripan mavisi çözeltisi 1/1 (v/v) oranında karıştırıldı. Hücrelerin 3 dakikalık inkübasyonları sonrası Thoma lamına alınarak sayıldı. Canlı hücrelerin membran bütünlükleri ve geçirgenlikleri bozulmadığı için boyayı hücre içine almazlar. Bu özelliğe dayanarak boyanan ve boyanmayan hücre oranı ile canlılık (% olarak) hesaplandı.

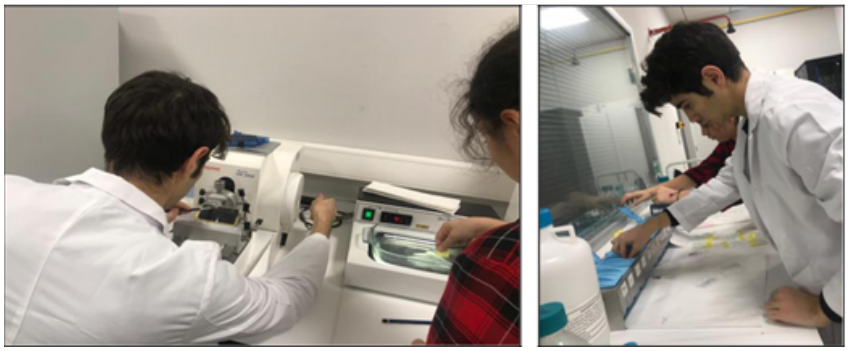
Hücre canlılığı (%) = Canlı hücre sayısı / Toplam hücre sayısı (x100)

4.3.Histolojik İncelemeler

Üç boyutlu olarak elde edilen sferoid yapıların genel görünümü için hematoksilen eozin boyaması yapıldı. Bu doğrultuda her grubun kuyucuğundaki sferoidlere takip işlemleri uygulandı. Toplanan sferoidler 1000 devirde 3 dakika santrifüj edildi ve %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Fosfat tampon (PBS) ile yıkandıktan sonra yine PBS içinde 1 ml'lik Ependorf tüplerine alındı ve 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edildi. PBS uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine filtre kağıdından süzülen taze yumurta akı eklenip, 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edildi. Yumurta akının fazlası çekildi ve üzerlerine %70 etanol konarak sertleşmesi için 2 gün bekletildi. Sferoid topluluğu ependorflardan çıkarıldı ve iğne ile tutturuldu. Tüm sferoid grupları yükselen alkol serilerinden geçirilerek (%70, %90,%96, %100, %100, toluol) dehidrate edilip parafine gömüldü (Ek 2).

Parafin bloklardan mikrotom ile 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve 1 gece 56°C de etüvde bekletildi. Parafin kesitler 30 dakika toluolde bekletilerek parafinden arındırıldı ve azalan alkol serilerinden geçirilip (sırasıyla %100, %96, %90, %70) distile suya indirilerek rehidrate edildi. Kesitler hematoksilen'de 10 dakika boyandıktan sonra morarıncaya kadar çeşme suyunda bekletildi. Ardından kesitler eozinde (%0,5 Eosin Y) 1 dakika boyandı ve distile suyla yıkandıktan sonra

yükselen alkol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) geçirildi. Kesitler toluol ile şeffaflaştırıldıktan sonra kapatma solüsyonu (Bio Optica) ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda (Zeiss) değerlendirilerek fotoğraflandı (Şekil 5).



Şekil 5. Bloklardan mikrotom ile kesit alınarak boyanması.

İstatistiksel Analizler

İki boyutlu hücre kültüründe her bir hücre hattı için yapılan 3 tekrar sonrası hücrelerin canlılıkları olarak hesaplandı. Sonuçların istatistiksel değerlendirmelerinde GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA,USA) programı ile ANOVA testi kullanıldı. Testler %95 güven aralığında yapıldı ve $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. Gruplardaki verilerin ortalaması ± standart sapma (SD) olarak verilerek sonuçların grafikleri Microsoft Office Excel 2013 programında hazırlandı.

4.4.Bulgular

Çalışmamızda bir siyanobakteri cinsi olan *Microcystis* ekstraktının meme ve beyin kanserleri üzerine olan etkilerinin araştırılarak sonuçların iki ve üç boyutlu hücre kültürlerinde ortaya konması amaçlandı. Bu doğrultuda, MCF-7 ve U-87 MG hücre hatları ile monolayer hücre kültürü yapılarak hücrelere artan dozlarda *Microcystis* ekstraktı uygulandı. Ekstraktın ektisi 10 µM dozda kemoterapötik bir ajan olarak kullanılan MTX ilacı ile kıyaslandı.

MCF-7 ve U-87 MG hücrelerine farklı dozlarda *Microcystis* ekstraktının 24 saatlik inkübasyonları sonucu hücrelerin canlılık yüzdeleri değerlendirildi. Sonuçlar istatistiksel olarak Tablo 1'de ifade edildi.

Deney gruplarına *Microcystis* ekstraktının 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml dozlarda uygulanarak kontrol grubu ve MTX ile kıyaslandığında, hem MCF-7 hem de U-87 MG hücrelerinde % canlılık ve proliferasyon oranlarında azalma meydana geldiği gözlendi (Ek 3).

Çalışmamızda kullanılan her iki hücre hattında da *Microcystis* ekstraktının 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml dozlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında % canlılık oranlarında meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). MTX uygulanan grup kontrol grubu ile kıyaslandığında meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,001$)(Ek 3).

Ayrıca MTX uygulaması ile deney grupları kıyaslandığında MCF-7 ve U-87 MG hücre hatlarının canlılık oranlarında 250 µg/ml ve 500 µg/ml dozlarda meydana gelen azalmalar istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaştı ($p<0,001$) (Ek 3).

İki boyutlu hücre kültürü uygulamaları sonucu *Microcystis* ekstraktının inhibisyon dozu 50 (ID50 değeri), 100 µg/ml olarak belirlendi ve üç boyutlu hücre kültürüne uygulanacak doz olarak tercih edildi.

Tümör dokularındaki genel görünümü ortaya koymak, histolojik olarak değerlendirmek, iki ve üç boyutlu hücre kültürü sonuçlarını kıyaslamak için MCF-7 ve U-87 MG hücre hatları ile üç boyutlu

kültür modeli oluşturuldu (Ek 3). Sferoid oluşumunu takiben (5-7 gün) MTX (10 µM) ve *Microcystis* ekstraktı (100 µg/ml) uygulamaları yapıldı. Uygulamaları takiben 24. saatte sferoid yapılar toplanarak histolojik takip uygulandı. Parafin bloklar oluşturularak kesitler alındı ve genel görünümleri için hematoksilen eozin boyaması gerçekleştirildi (Ek 3).

Tablo 1. MCF-7 ve U-87 MG hücrelerinin kontrol, MTX ve *Microcystis* ekstraktının artan dozları ile oluşturulan deney gruplarında Tripan mavisi ile boyanma sonrası 24 saatlik canlılık ortalamaları (%). Gruplardaki veriler ortalama (X)±standart sapma (SD) olarak ifade edildi.

Uygulamalar	MCF-7	U-87 MG
Kontrol	% 98,0 ± 1,00	97,0± 1,00
MTX (10 µM)	% 32,2 ± 0,57	% 36,5 ± 1,24
Microcystis ekstraktı 50 µg/ml	% 84,5 ± 0,20	% 85,4 ± 1,60
Microcystis ekstraktı 100 µg/ml	% 46,3 ± 0,86	% 48,8 ± 0,82
Microcystis ekstraktı 250 µg/ml	% 26,7 ± 0,48	% 34,3 ± 0,62
Microcystis ekstraktı 500 µg/ml	% 15,2, ± 0,37	% 20,5± 1,84

Hematoksilen eozin boyası ile MCF-7 ve U87 MG hücrelerinde kontrol gruplarında genel sferoid yapı ve hücreleri izlenmektedir. MTX ve *Microcystis* ekstraktı uygulanan gruplardaki apoptotoik görünümler gösterildi (Ek 4).

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Çalışmamızda *Microcystis* ekstraktının meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 ile insan glioblastoma hücre hattı olan U-87 MG hücrelerinde sitotoksititeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlendi. Bundan sonraki süreçte sekonder metabolitleri açısından değerli görülen siyanobakteri ekstraktlarının farklı hücre hatlarındaki etkilerinin incelenmesi önemlidir. Bu ekstraktların hücrelerde neden olduğu toksisitenin hangi moleküler yolaklar üzerinde gerçekleştiği ve hücre siklusunun hangi evrelerinde tutuklu kaldığı aydınlatılmalıdır.

Özellikle hücre-hücre etkileşimleri için örnek bir model olan üç boyutlu hücre kültüründe immünolojik ya da moleküler belirteçler kullanılarak hücre ölümünün hangi yoldan ve/veya hangi ölüm yolakları üzerinden meydana geldiğinin belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca çalışmamızda sıvı üst tabaka yöntemi (Liquid overlay tecnique) ile ortaya koyduğumuz üç boyutlu hücre kültür modelinin kanser tedavilerinde hastanın kendi hücreleri ile oluşturularak kişiye özgü tedavilerde kullanılabileceği ve çalışmamızda ortaya koyduğumuz sitotoksik etkilerinden dolayı *Microcystis* ekstraktı etkilerinin umut verici olduğu kanısındayız.

Bundan sonraki süreçte *Microcystis* ekstraktının etkilerinin daha iyi anlaşılması için farklı hücre hatları ve bu hücre hatları üzerindeki etkilere daha ileri teknikleri ile bakılması gerekir. Özellikle sağlıklı hücre hatları ile de kıyaslanarak vücut hücreleri üzerine olan etkilerinin ortya konması önemlidir. Buna ek olarak çalışmamızın in vivo teknikler ile de desteklenerek klinik tedavilerde

kullanılan antitümör ilaç uygulamalarına da alternatif olabileceğini ve hatta yeni farmasötik kaynaklar oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

6. Uygulanabilirlik

Ortaya koyduğumuz bu üç boyutlu modelleme, literartürde kullanılan en temel doku modellemelerinden biridir. Bu temel modelin geliştirilerek kanser çalışmalarında kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz. Öte yandan çalışmamızda kullandığımız *Microcystis* ekstraktı kullandığımız yöntemler ile kolaylıkla ekstrakte edilerek laboratuvar çalışmalarında ve ileri çalışmalarda kullanılmak üzere temin edilebilir. Farklı hücre soyları üzerindeki etkileri de ortaya konarak kanser çalışmaları konusunda daha fazla bilgi edinilerek tedavi yöntemleri açısından değerli bir deniz ürünü olarak karşımıza farmakolojik çalışmalarda değerlendirilebilir.

7. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar)

Çalışmamızın sonuçları kanser araştırmaları yapan onkoloklar ve hastaları için oldukça umut vericidir. Özellikle bilinen bir kemoteröpatik ajan olan MTX ile kıyaslandığında yan etkileri bulunmayan ve içerisinde taşıdığı sekonder metabolitler nedeniyle kullanımını önerdiğimiz bu ürün klinik araştırmalar sonucu literartüre önemli katkılar sunacaktır. Takiben kullanılması ile de kanser tedavilerinde kannser hastaları için önemli bir farmakolojik ajan olabilir

8. Proje Ekibi

Takım Lideri: Elif Şevval Saçlı

Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeyle veya problemle ilgili tecrübesi
Elif Şevval Saçlı	Takım lideri	Suat Terimer Anadolu Lisesi	4 yıllık laboratuvar ve proje çalışması deneyimi
Ömer Polat	Takım üyesi	Suat Terimer Anadolu Lisesi	4 yıllık laboratuvar ve proje çalışması deneyimi

9. Kaynaklar

Anastasov N. ve ark. (2015). A 3D-microtissue-based phenotypic screening of radiation resistant tumor cells with synchronized chemotherapeutic treatment. BMC cancer 15, 466, https://doi.org/10.1186/s12885-015-1481-9. Erişim tarihi: 20.09.2018.

Anjum K., Abbas S.Q., Akhter N., Shagufta B.I., Shah S.A.A. (2017). Emerging biopharmaceuticals from bioactive peptides derived from marine organisms. Chem. Biol. Drug Des. 90, 12–30.

Carlsson J., Yuhas JM. (1984). Liquid-overlay culture o cellular spheroids, Resent Results Cancer Res, 95,1-23.

Chen Y. ve ark. (2016). Antitumor activity of combined endostatin and thymidine kinase gene therapy in C6 glioma models, 6 Sep;5(9):2477-86.

Dixit R.B.; Suseela M.R. (2013). Cyanobacteria: Potential candidates for drug discovery. Antonie Van Leeuwenhoek, 103, 947–961.

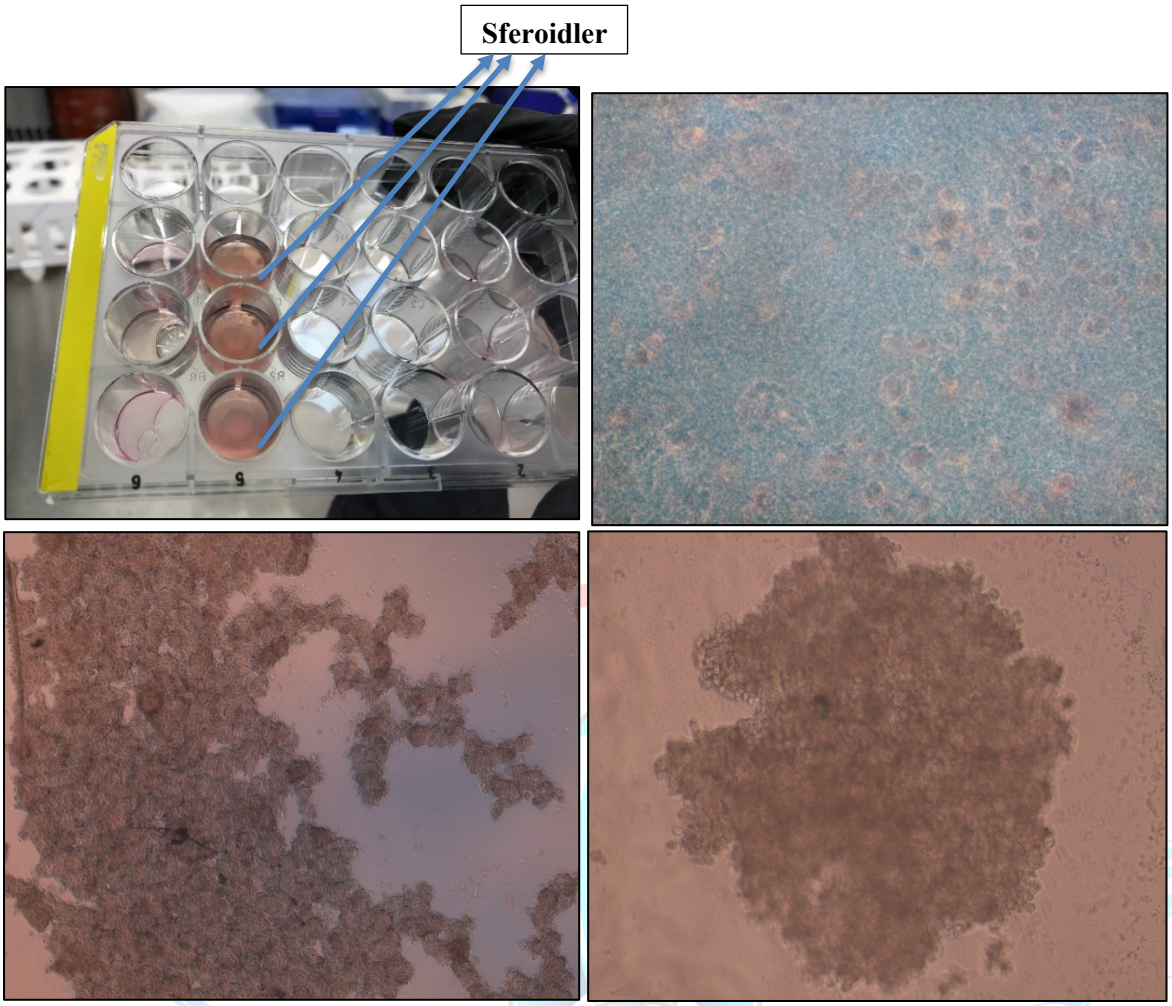
Do Rosário Martins M., Costa M. (2015). Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: Implication of apoptosis. In Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin; Springer: Berlin, Germany;pp. 621–647.

Duke J.A., Bogenschutz-Godwin M.J. . Doke P.A., Ducellier J. (2002). 'Handbook of Medicinal Herbs.', Second Edition, CRC pres LLC, Printed in USA.

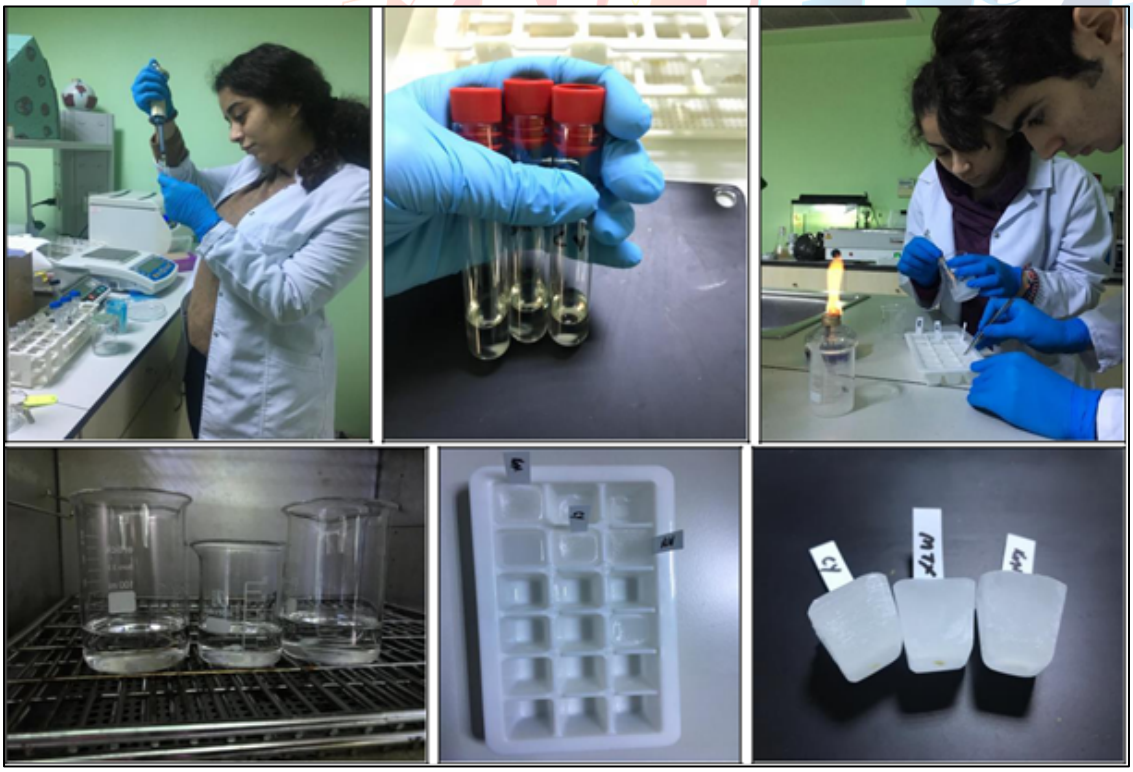
El-Sheekh M.M., Osman M.E.H., Dyab M.A., Amer M.S. (2006). 'Production and characterization of antimicrobial active substance from the cyanobacterium Nostoc muscoru', Enviromental Toxicology and Pharmocology, 21: 42-50.

Gademann K., Portmann C. (2008). Secondary metabolites from cyanobacteria: Complex structures and powerful bioactivities. Curr. Org. Chem. 12, 326–341.
Glombitza K.W., Koch M. (1989).'Secondary metabolites of pharmaceutical potential'İn Algal and Cyanobacterial Biotechnology ed., 161-238.
Li Z., Cui Z. (2014). Three-dimensional perfused cell culture. Biotechnology Advances., 32, 243–254.
Mather Jennie P., ve Penelope E. Roberts.(1998). Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. Springer Science & Business Media .
McPherson K., Steel C., Dixon JM. (2000).Breast cancer -Epidemiology, risk factors, and genetics. British Medical Journal, 321: 624–628.
Mi Y., Zhang J., He S., Yan X. (2017). New Peptides Isolated from Marine Cyanobacteria, an Overview over the Past Decade. Mar. Drugs, 15, 132.
Newman D.J., Cragg G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod.; 70, 461–477.
Patterson G.M.L., Larsen L.K., Moore R.E. (1994).'Bioactive natural products from blue-green algae', J. Phycol., 29(39):14.
Pickl M., Ries CH. (2008).Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. Oncogene,,28(3):461-8.
Sainis I., Fokas D., Vareli K., Tzakos AG., Kounnis V., Briasoulis E. (2010). Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs. Mar Drugs, 8:629–657.
Santini MT., Gabriella R. (1999). Three dimensional spheroid model in tumor biology, Pathobiology, 67, 148-57.
Verkhratsky A. ve Butt A. (2007). Introduction to Glia, in Glial Neurobiology: A Textbook. 1st ed. Chichester, UK, John Wiley & Sons Ltd, 96-121.
Visser P.M., Ibelings B.W., Mur L.R., Walsby A.E. (2005). The ecophysiology of the harmful cyanobacterium Microcystis, In Harmful Cyanobacteria, Springer Netherlands, 109-142.
WHO Cancer Facts, World Health Organization http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/ , Erişim tarihi: 10.11.2018.

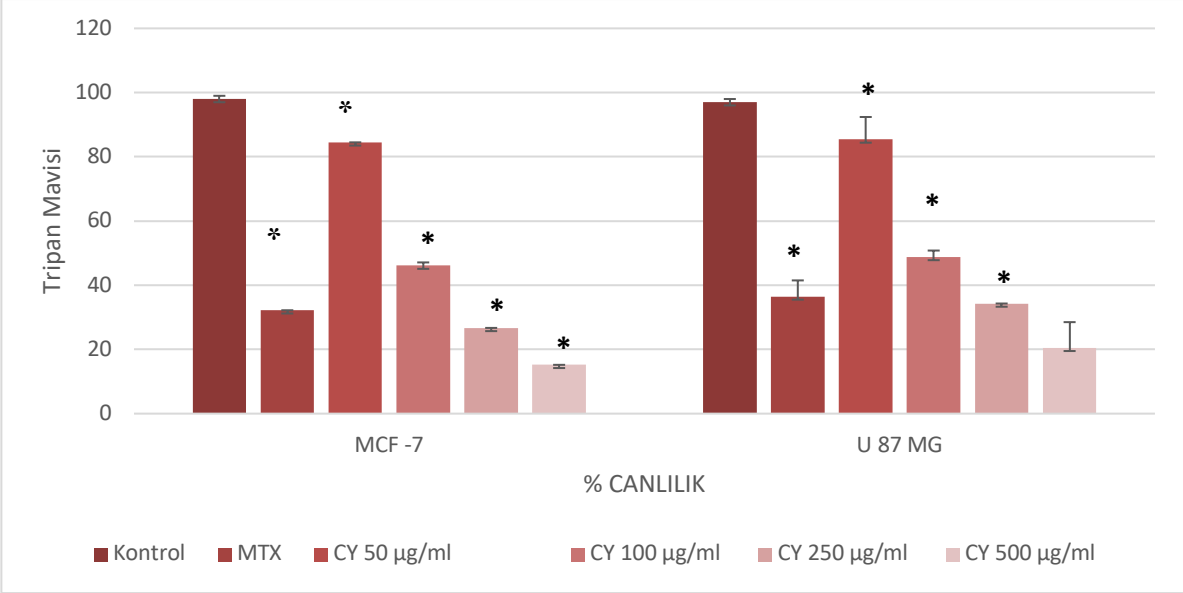
10. Ekler



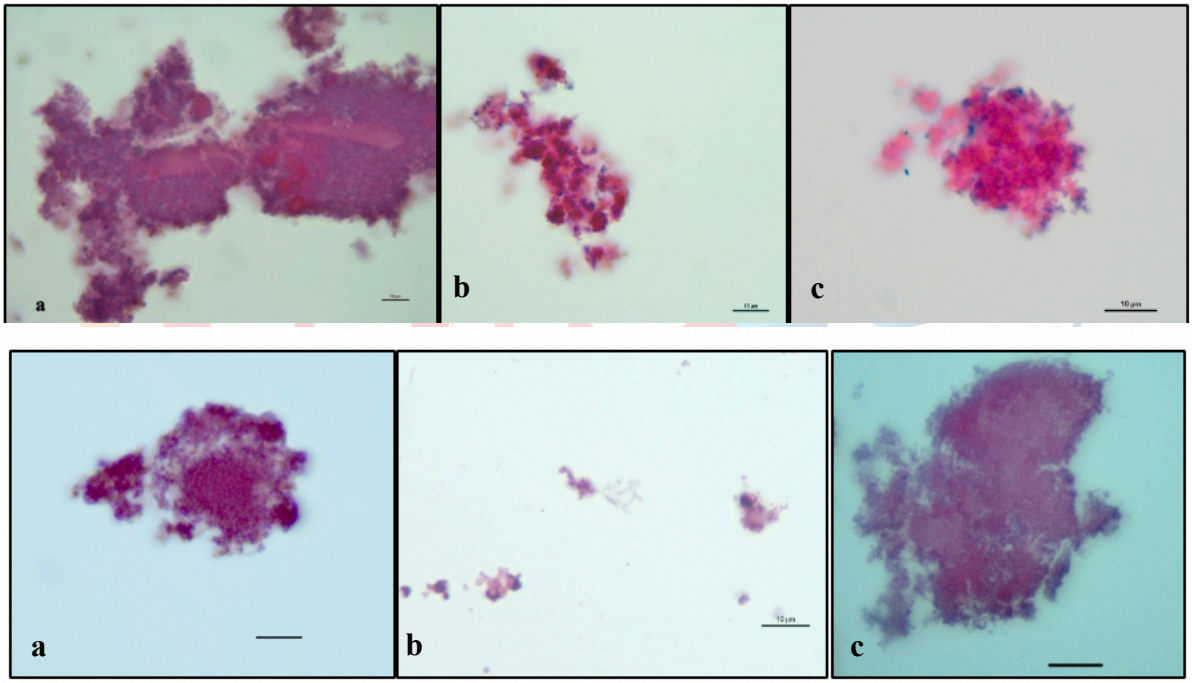
Ek 1. Üç boyutlu hücre kültüründe zamana bağlı olarak gelişen sferoid yapıların faz kontrast mikroskobunda çekilen görüntüleri (a: Hücrelerin pleyt içerisindeki sferoid görünümleri, b: MCF-7 hücreleri 3. gün (10X), c: U 87 MG hücreleri 3. gün (5X), d: U 87 MG hücreleri 5. gün (10X)).



EK 2. Sferoid yapıların takip edilerek parafine gömülmesi.



Ek 3. MCF-7 ve U 87 MG hücrelerinin kontrol, MTX ve *Microcystis* ekstraktının artan dozları ile oluşturulan deney gruplarında tripan mavisi ile boyanma sonrası semi-kantitatif olarak belirlenen % canlılık değerleri grafiği. $^{£}p<0,05$; $^{\#}p<0,01$ $^{*}p<0,001$; kontrol grubuyla kıyaslandığında;. $^{c}p<0,05$; $^{b}p<0,01$ $^{a}p<0,001$; MTX grubuyla kıyaslandığında. Gruplardaki veriler ortalama (X)±standart sapma (SD) olarak ifade edildi.



Ek 4. Sırasıyla U87-MG ve MCF-7 hücre hattında Kontrol (a), MTX (b) ve (c), CYP (c) gruplarına ait ışık mikrograflar. Hematoksilen eozin boyası; bar=10 µm (a, b, c).