

**SFEROİD YÜKLÜ ECM-MİMETİK PEPTİT AMFİFİL
HİDROJELLERLE ÇİP-ÜSTÜ-KARACİĞER
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF LIVER-ON-CHIP WITH SPHEROID
LOADED ECM-MIMETIC PEPTIDE AMPHIPHILE
HYDROGELS**

ŞEYMA BEKTAŞ

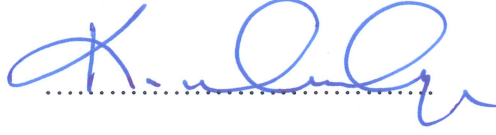
PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

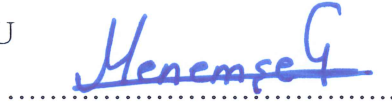
2018

ŞEYMA BEKTAŞ'ın hazırladığı “SFEROID YÜKLÜ ECM-MİMETİK PEPTİT AMFİFİL HİDROJELLERLE ÇİP-ÜSTÜ-KARACİĞER GELİŞTİRİLMESİ” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM
Başkan



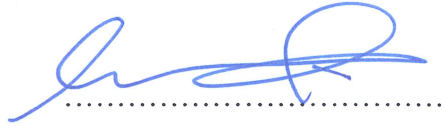
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman



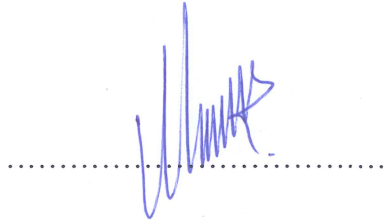
Doç. Dr. Lokman UZUN
Üye



Doç. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ
Üye



Dr. Öğretim Üyesi Murat ŞİMŞEK
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ **Tezimin/Raporumun 25/06/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ **Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- ☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

28 / 06 / 2018


Şeyma Bektaş

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

Şeyma BEKTAŞ

28/06/2018

ÖZET

SFEROİD YÜKLÜ ECM-MİMETİK PEPTİT AMFİFİL HİDROJELLERLE ÇİP-ÜSTÜ-KARACİĞER GELİŞTİRİLMESİ

Şeyma BEKTAŞ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Haziran 2018, 130 sayfa

Bu çalışma, “İlaçların Toksisitesini Belirlemede Kullanılacak Karaciğer Çipinin Geliştirilmesi” başlıklı (proje numarası FBA-2017-12820) proje kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında maddi olarak desteklenmiştir. Sunulan tez çalışmasında amaç karaciğerin görevlerini etkin olarak gerçekleştirebilecek, ilaç tarama ve toksisite testlerinde kullanılmak için “çip-üstü-karaciğer” sistemi geliştirmektir.

Tezin ilk aşamasında karaciğerin fonksiyonel açıdan en küçük biriminde yer alan hepatosit (HepG2 hücre hattı) ve endotel hücrelerinden (HUVEC hücre hattı) asılı damlacık yöntemi ile sferoid üretimi gerçekleştirilmiştir. Hepatositlerin endotel hücrelerle 2:1 oranında birleştirildiği 1500 hücre içeren sferoidlerin 5 günlük inkübasyon sonunda 428 ± 45 μm çapa sahip olduğu görülmüş ve tez kapsamında çalışmalara bu sferoidler ile devam edilmiştir. Sferoidlerin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) görüntülerinde yer alan kürenin dış yüzeyindeki 2-3 μm çapındaki porlar karaciğerdeki safra kanalcıkları (1-3 μm) ile benzer özelliktedir. Sferoidlerdeki hücrelerin işlevselliğini incelemek amacı ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu hepatositlerin, karaciğerin spesifik fonksiyonu olan albumin sentezi ve ilaç dönüşümü işlevlerini devam ettirdiği görülmüştür. Sferoidlerdeki

HepG2 ve HUVEC hücre organizasyonunu ve damarlanmayı incelemek için von Willebrand Faktör boyaması yapılmış ve konfokal görüntülerinde HUVEC hücrelerinin HepG2 hücrelerini çevrelediği ve dış yüzeyden merkeze doğru 35 µm'lik tübüler yapılar oluşturduğu görülmüştür. Konfokal görüntüleri HepG2 ile HUVEC arasındaki kendiliğinden düzenlenme ve hücre sıralanma prosesinin gerçekleştiğini kanıtlamıştır. Yapılan analizler sonucunda sferoidlerin damarlı yapıda ve işlevsel olduğu bulunmuştur.

Tezin ikinci aşamasında sferoidlere hücrel davranışları destekleyen yapay mikroçevrelerin oluşturulması için kolajen-mimetik (PA-GFOGER) ve fibronektin-mimetik (PA-RGDS) peptit amfifiller kullanılmıştır. PA-RGDS negatif yüke (-1), PA-GFOGER ise pozitif yüke (+4) sahip olduğu için 4:1 oranında karıştırılarak ECM-mimetik (PA-GFOGER+RGDS) hidrojel elde edilmiştir. Kalsiyum eklenmesi sonrası nanofiber düzenlemenin β-tabaka ikincil yapı üzerinden gerçekleştiği bulunmuştur. PA-GFOGER ve PA-GFOGER+RGDS hidrojellerin kendiliğinden düzenlenme ve jelleşme sonrasında birleşerek 75-100 nm çapa sahip fiber demetlerini oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca PA-GFOGER+RGDS hidrojeli, ECM bileşenlerinin hiyerarşik organizasyonunu sağlamıştır. Reoloji analizi sonucunda tüm hidrojellerin viskoelastik karakterde olduğu ve depo modülünün kolajen katkılanması ile düştüğü gözlenmiştir.

Tezin son aşamasında şırınga pompası, kültür ortam rezervuarı, polidimetilsiloksan (PDMS) çip ve bağlantı elemanlarından oluşan bir “çip-üstü-karaciğer” sistemi oluşturulmuştur. Hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin durgun ve dinamik koşullardaki kültürü hidrojelsiz sferoidlerle karşılaştırmalı olarak gen ifadesi, albumin ve üre salımı açısından değerlendirilmiştir. Sferoidler dinamik kültür koşulları altında 7 günün sonunda 2,023±409 ng albumin ve 31,003±3595 nmol üre; durgun koşullar altında ise 1,444±92 ng albumin ve 1,279±40 nmol üre salımı gerçekleştirmiştir. Özellikle hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin dinamik kültür *ALBUMİN* ve *CYP 2E1* gen ifadeleri sırasıyla 4 ve 28,343 kat artış göstererek anlamlı düzeyde fark oluşturmuştur.

Tüm bu sonuçlar ışığında perfüzyon biyoreaktörde 5 µL/dk akış hızıyla gerçekleşen dinamik kültürün sferoid performansını arttırdığını ve çip üstü organ sistemlerinde hidrojel kullanımının hücre canlılığı ve işlevselliği açısından daha iyi sonuç verdiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte bu tez kapsamında geliştirilen çip üstü organ sistemi ile daha ileri uygulamalar gerçekleştirilebilmek için işletim koşullarının optimize edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çip-üstü-karaciğer, peptit amfifil, sferoid, hidrojel

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF LIVER-ON-CHIP WITH SPHEROID LOADED ECM-MIMETIC PEPTIDE AMPHIPHILE HYDROGELS

Şeyma BEKTAŞ

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

June 2018, 130 pages

This study was financially supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit with a project entitled “Development of the liver-on-chip to be used in determining the toxicity of drugs” (project number FBA-2017-12820) and The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) under 2210-C Primary Subject National Scholarship Program for MSc Students. The aim of this study is to develop a liver-on-chip system, which can effectively perform liver tasks, for drug screening and toxicity tests.

In the first step of the study, spheroid production was carried out by hanging drop method from hepatocyte (HepG2 cell line) and endothelial cells (HUVEC cell line), which are located in the smallest functional unit of the liver. Spheroids containing 1500 cells, in which hepatocytes were combined in 2:1 ratio with endothelial cells, were found to have a diameter of $428 \pm 45 \mu\text{m}$ after 5 days of incubation and these spheroids were used within the scope of the thesis. Scanning Electron Microscopy (SEM) images demonstrated that the pores with a diameter of 2-3 μm on the outer surface of the spheroid are similar to the bile canals in the liver (1-3 μm). Immunocytochemical staining of hepatocytes that were performed with the aim of investigating the function of cells in spheroids showed that the cells maintained the liver-specific function of albumin synthesis and drug conversion. Von Willebrand Factor

staining was performed to examine the HepG2 and HUVEC cell organization and vascularization in spheroids, and resulting confocal microscopy images showed that HUVEC cells covered HepG2 cells and formed tubular structures from the external surface to the center of the spheroid in 35 μm depth. Confocal images have proved that the self-assembly and cell arrangement process between HepG2 and HUVEC has been achieved. As a result it is found that the spheroids are vascular and functional.

In the second part of the thesis, collagen-mimetic (PA-GFOGER) and fibronectin-mimetic (PA-RGDS) peptide amphiphiles were used to construct artificial microenvironments that support cellular behavior in spheroids. Since PA-RGDS has a net negative charge (-1) and PA-GFOGER is positively charged (+4), ECM-mimetic (PA-GFOGER + RGDS) hydrogel was obtained by mixing these two hydrogels in the ratio of 4:1. After the addition of calcium ions, it was found that the nanofiber organization occurred via β -sheet secondary structure. PA-GFOGER and PA-GFOGER + RGDS hydrogels were found to form fiber bundles with a diameter of 75-100 nm after self-assembly and gelation. Additionally, PA-GFOGER+RGDS hydrogel provided a hierarchical organization similar to ECM components. As a result of the rheology analysis, it was observed that all the hydrogels were viscoelastic and the storage module is decreased by collagen deposition.

In the final part of the thesis, a "liver-on-chip" system was established consisting of a syringe pump, culture medium reservoir, polydimethylsiloxane (PDMS) chip and fitting elements. The culture of hydrogel-encapsulated spheroids under static and dynamic conditions was evaluated in terms of gene expression, albumin and urea release in comparison with hydrogel-free spheroids. At the end of 7 days, it was found that 2023 ± 409 ng albumin and 31003 ± 3595 nmol urea was released under dynamic culture conditions of spheroids, whereas under static conditions 1444 ± 92 ng albumin and 1279 ± 40 nmol urea was released. In particular, dynamic culture of hydrogel encapsulated spheroids significantly increased ALBUMIN and CYP 2E1 gene expressions by 4 and 28343 folds, respectively.

In the light of these findings, it can be stated that the dynamic culture with the use of a perfusion bioreactor at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate improved spheroid performance and hydrogel use in the organ-on-chip systems gave better results in terms of cell viability and functionality. However, it is concluded that the operating conditions in the present organ-on-chip system should be optimized for advanced applications.

Keywords: Liver-on-chip, peptide amphiphile, spheroid, hydrogel

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve tecrübeleriyle, bir bilim insanı ve birey olarak hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu**'na, yoluma tuttuğu ışık, verdiği cesaret ve sağladığı olanaklar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım ve tezim süresince her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, çalışma konumun belirlenmesinde bana yeni ufuklar açan, tezim süresince bana güvenen, hiçbir zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen **Yrd. Doç. Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş**'e Tez çalışmam sırasında 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu programı kapsamında maddi destek sağlayan **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı**'na ve FBA-2015-5315 Kapsamlı Araştırma Projesi ile maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne

Birlikte zaman geçirmekten ve çalışmaktan büyük keyif aldığım tezim için çok emek harcayan **Elvan Konuk, Gülnihal Tok İlhan** ve **Aslı Sena Karanfil**'e

Çalışmalarım sırasında yarının mutluluk dolu geleceğine inandıran ve her zaman yanımda bana destek olan dostlarım; **Ebru Tamahkar, Aslı Taşpolatoğlu, Tuğçe Gültan** ve **Sinem Demir**'e

Küçüklük hayalimin gerçek olmasını sağlayan, sıcak sohbetleri ve çözüm odaklı önerileri için **Ekin-Musa Akdere** çiftine;

Çalışmalarım süresinde desteğini gördüğüm ve her sorumu sabırla yanıtlayan **Gülseren Irmak, Gökçe Kaynak, Dr. Damla Çetin Altındal, Dr. Soner Çakmak, Dr. Anıl Sera Çakmak, Dr. Merve Çapkın Yurtsever** ve **Dr. Gamze Dereli Can** ve **Burcu Sarıkaya**'ya Samimi arkadaşlıkları ile beni yalnız bırakmayan **Demet Çakır, Meltem Gamze Öztürk, Tülay Selin Ertekin** ve **Sena Koç** olmak üzere **Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu** çalışma arkadaşlarıma;

Maddi manevi desteklerini asla esirgemeyen, benimle üzülp benimle sevinen, başarılarımla gururlanan, benim için vazgeçilmez annem **Rukiye Bektaş** ve babam **Bekir Bektaş**'a hayatımdaki varlıklarına her zaman iyi ki dediğim biricik ablalarım **Fatime Bektaş Daşdan** ve **Şerife Beşik**'e; hayatımın neşesi **Eymen Beşik, Eslem** ve **Toprak Daşdan**'a; ailemin bir parçası haline gelen ve her zaman desteğini gördüğüm **Merve Çalışkan** ve **Neşe AYATA**'ya Sevgisi ve anlayışı ile her zaman yanımda olan ve bana kendimi dünyanın en şanslı insanı hissettiren **Engin TERCAN**'a

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER.....	xi
ÇİZELGELER.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İlaç Endüstrisi ve İlaç Geliştirme Süreci	4
2.2. Karaciğerin İlaç Metabolizmasındaki Önemi	5
2.2.1. Karaciğerin Anatomisi	5
2.2.2. Karaciğerin Histolojisi	6
2.2.2.1. Karaciğer Lobülü	6
2.2.2.2. Karaciğer Asinüsü	8
2.2.2.3. Karaciğerin Yapısındaki Hücreler.....	8
2.2.3. Karaciğerin Fizyolojisi	10
2.2.4. İlaçların Metabolizması	12
2.3. İlaç Toksisite Test Yöntemleri.....	12
2.3.1. İki Boyutlu (2B) Sistemler	14
2.3.1.1. Tek Tabaka Hücre Kültürü	14
2.3.1.2. Karaciğer Kesitleri	14
2.3.2. Üç Boyutlu (3B) Sistemler	15
2.3.2.1. Hücre Sferoidleri.....	15
2.3.2.2. 3B Matris Sistemler.....	16

2.3.2.3.	Mekanik Destek Sistemler	17
2.3.3.	Hayvan Modelleri.....	17
2.3.4.	Çip-üstü-Organ Sistemleri	18
2.3.4.1.	Organ Çiplerinin Mikrofabrikasyonu	23
2.3.4.2.	Mikroakışkan Teknolojiler	24
2.3.4.3.	Çip-üstü-Karaciğer	25
2.4.	Damarlı Karaciğer Modelinin Geliştirilmesi	30
2.4.1.	Sferoidlerin Geliştirilmesi	30
2.4.2.	Sferoid Üretim Yöntemleri	32
2.5.	Doku Geliştirilmesinde Hidrojeller	34
2.5.1.	Biyouyumluluk	35
2.5.2.	Mikroçevre.....	35
2.5.3.	Çapraz Bağlanma	36
2.5.4.	Mekanik Özellikler.....	37
2.5.5.	Biyobozunma Kinetiği	37
2.6.	Peptit Amfifillerin Yapısı ve Özellikleri	38
2.6.1.	Kolajen-Mimetik Peptit Amfifiller	40
2.6.2.	Fibronektin-Mimetik Peptit Amfifiller.....	42
2.7.	Vaskülarizasyon	43
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	47
3.1.	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler	47
3.2.	Hücre Kültürü Çalışmaları	49
3.2.1.	Hepatosit Hücre Kültürü.....	49
3.2.2.	Endotel Hücre Kültürü	49
3.3.	Hücre Karakterizasyonu	49
3.3.1.	Hücre Sayımı	49

3.3.2.	MTT Analizi	49
3.3.3.	Kristal Viyole ile Boyama	50
3.3.4.	Floresan Boyama.....	50
3.4.	Sferoidlerin Oluşturulması.....	51
3.5.	Sferoidlerin Karakterizasyonu	51
3.5.1.	Sferoid Boyut Analizi.....	51
3.5.2.	Sferoid Canlılığının Belirlenmesi	51
3.5.3.	Sferoidlerin Morfolojik Analizi	52
3.5.4.	Sferoidlerin İmmünofloresan Görüntülenmesi	52
3.5.4.1.	Albumin/Cyp Redüktaz/DAPI Boyama	52
3.5.4.2.	von Willebrand Faktör/DAPI Boyama.....	53
3.6.	Peptit Amfifillerin Sentezi ve Karakterizasyonu	53
3.7.	Peptit Amfifil Hidrojelinin Hazırlanması	54
3.8.	Peptit Amfifil Hidrojellerin Karakterizasyonu	54
3.8.1.	Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi	54
3.8.2.	Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	54
3.8.3.	Dairesel Dikroizm (CD) Analizi	55
3.8.4.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	55
3.8.5.	Reolojik Analiz	55
3.9.	Sferoidler ile Hücre Kültür Çalışmaları.....	56
3.9.1.	Besin Ortamının Belirlenmesi	56
3.9.2.	Sferoidlerin Durgun Kültürü.....	57
3.9.3.	Sferoidlerin Dinamik Kültürü.....	57
3.9.3.1.	Çip-üstü-Karaciğer Sisteminin Geliştirilmesi.....	57
3.9.3.2.	Çip-üstü-Karaciğer Sisteminde Sferoidlerin Dinamik Kültürü	59

3.10. Sferoidlerin Analizi	60
3.10.1. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	60
3.10.2. Albumin Salımının İncelenmesi	60
3.10.3. Gen İfadesinin Belirlenmesi	61
3.10.4. Üre Sentezinin İncelenmesi	62
3.11. İstatistiksel Analiz	62
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	63
4.1. Hücre Hatlarının Karakterizasyonu	63
4.1.1. Hepatosit Hücre Karakterizasyonu	63
4.1.1.1. Hücrelerin Morfolojik Analizi	63
4.1.1.2. Hücre Üreme Davranışının Analizi.....	66
4.1.2. Endotel Hücre Karakterizasyonu	68
4.1.2.1. Hücrelerin Morfolojik Analizi	68
4.1.2.2. Hücre Üreme Davranışının Analizi.....	71
4.2. Sferoidlerin Oluşturulması ve Karakterizasyonu	73
4.2.1. Sferoid Çapının Belirlenmesi.....	74
4.2.2. Sferoid Canlılığının Belirlenmesi	78
4.2.3. Sferoidlerin Morfolojik Analizi	79
4.2.4. Sferoidlerin İmmünohistokimyasal Görüntülenmesi	81
4.3. Peptit Amfifillerin Sentezi ve Karakterizasyonu	83
4.3.1. Kolajen-Mimetik Peptit Amfifil	83
4.3.2. Fibronektin-Mimetik Peptit Amfifil.....	84
4.4. Peptit Amfifil Hidrojelinin Hazırlanması	86
4.5. Peptit Amfifil Hidrojelin Karakterizasyonu.....	88
4.5.1. Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi	88

4.5.2.	Dairesel Dikroizm (CD) Analizi	89
4.5.3.	Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi	91
4.5.4.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	92
4.5.5.	Reolojik Analiz	93
4.6.	Sferoidlerin Hücre Kültür Çalışmaları	95
4.6.1.	Besin Ortamının Belirlenmesi	95
4.6.2.	Durgun Hücre Kültür Çalışmaları.....	97
4.6.3.	Sferoidlerin Durgun Kültür Analizleri	98
4.6.3.1.	Proliferasyonun Belirlenmesi	98
4.6.3.2.	Albumin Salımı.....	99
4.6.3.3.	Üre Salımı.....	101
4.6.3.4.	Bağıl Gen İfadelerinin Belirlenmesi	103
4.6.4.	Dinamik Hücre Kültür Çalışmaları	104
4.6.4.1.	Çip-üstü-Karaciğer Sisteminin Geliştirilmesi.....	104
4.6.5.	Sferoidlerin Çip-üstü-Karaciğer Sisteminde Dinamik Kültürü Analizleri.....	106
4.6.5.1.	Albumin Salımı.....	106
4.6.5.2.	Üre Miktarının Belirlenmesi.....	107
4.6.5.3.	Bağıl Gen İfadelerinin Belirlenmesi	107
KAYNAKLAR.....		115
EK 1.....		125
EK 2.....		126
ÖZGEÇMİŞ.....		128

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İlaç geliştirme süreci [14].	4
Şekil 2.2. Karaciğerin anatomi ve histolojisi [25].	7
Şekil 2.3. Karaciğerin asinüsü [27, 28].	8
Şekil 2.4. 2B ve 3B mikroçevrelerde bulunan hücrelerin davranışı [52].	16
Şekil 2.5. Çip-üstü-organ sistemlerinin özellikleri [6, 58-62].	19
Şekil 2.6. Yumuşak litografi yöntemi ile PDMS çip üretimi [66].	24
Şekil 2.7. Çip üstü karaciğer modelleri A)[80] B)[82] C)[84] D)[79] E)[3] F)[85].	29
Şekil 2.8. Sferoid oluşum basamakları [89].	30
Şekil 2.9. Hücre sıralanma davranışı [91].	31
Şekil 2.10. Hidrojellerin biyolojik ve fiziksel tasarım kriterleri [53].	35
Şekil 2.11. Peptit amfifilin yapısı [8].	38
Şekil 2.12. Peptit amfifilin ikincil yapısı [112].	39
Şekil 2.13. Kolajenin yapısı [117].	41
Şekil 2.14. Kolajen mimetik peptit amfifilin kimyasal yapısı [10].	42
Şekil 2.15. Fibronektinin yapısı [122].	42
Şekil 2.16. Fibronektin mimetik peptit amfifilin kimyasal yapısı [126].	43
Şekil 2.17. Kan damarlarının oluşum süreci [137].	45
Şekil 3.1. Asılı damlacık yöntemi ile sferoid üretimi.	51
Şekil 3.2. Karaciğer çipinin konfigürasyonu ve boyutları.	59
Şekil 3.3. Dinamik hücre kültürü çalışmalarında kullanılan karaciğer çipi sistemine ait şema.	60
Şekil 4.1. TCPS yüzeylerde kültüre edilen HepG2 hücrelerinin farklı büyütme ve günlerde optik mikroskop görüntüleri; 1. gün a)10X ve b) 32X, 5. gün a)10X ve b) 32X.	64
Şekil 4.2. Kristal viyole ile boyanan HepG2 hücrelerinin farklı günlerde optik mikroskop görüntüleri; 1. gün a)10X ve b) 40X, c) 3. gün 40X, d) 5. gün 40X	64

Şekil 4.3. TCPS yüzeylerdeki HepG2 hücrelerinin kültürün farklı günlerindeki floresan mikroskop görüntüleri; 2. gün a) 20X ve b) 32X, 4 gün c) 20X ve d) 32X, 6. gün e) 20X ve f) 32X.....	65
Şekil 4.4. TCPS yüzeylerdeki HepG2 hücrelerinin hemositometrik sayım sonucu elde edilen üreme grafiği.	66
Şekil 4.5: HepG2 hücrelerine ait $\ln(X) - t$ grafiği.....	67
Şekil 4.6. TCPS yüzeylerdeki HepG2 mitokondriyal aktivite analizi sonucu elde edilen üreme grafiği.	68
Şekil 4.7. TCPS yüzeylerde kültüre edilen HUVEC hücrelerinin farklı günlerdeki optik mikroskop görüntüleri; 1. gün a)10X ve b) 32X, 5. gün a)10X ve b) 32X.....	69
Şekil 4.8. Kristal viyole ile boyanan HUVEC hücrelerinin farklı günlerdeki optik mikroskop görüntüleri; 1. gün a)10X ve b) 40X, c) 3. gün 40X ve d) 5. gün 40X.	69
Şekil 4.9. TCPS yüzeylerdeki HUVEC hücrelerinin kültürün farklı günlerindeki floresan mikroskop görüntüleri; 2. gün a) 20X ve b) 32X, 4 gün c) 20X ve d) 32X, 6. gün e) 20X ve f) 32X.....	70
Şekil 4.10. TCPS yüzeylerdeki HUVEC hücrelerinin hemositometrik sayım sonucu elde edilen üreme grafiği.	71
Şekil 4.11. HUVEC hücrelerine ait $\ln(X) - t$ grafiği.....	72
Şekil 4.12. TCPS yüzeylerdeki HUVEC hücrelerinin mitokondriyal aktivite analizi sonucu elde edilen üreme grafiği.....	72
Şekil 4.13. Farklı sayıda hücre içeren HepG2+HUVEC (1:1) sferoidlerin 5 günlük optik mikroskop görüntüleri (10X).....	73
Şekil 4.14. Farklı sayıda ve oranda hücre içeren sferoidlerin optik mikroskop görüntüleri (10X).....	74
Şekil 4.15. Farklı sayıda ve oranda hücre içeren sferoidlerin çap değerleri.	76
Şekil 4.16. Farklı oranda karıştırılmış 1500 hücre içeren heterosferoidlerin 5 günlük optik mikroskop görüntüleri (10X).....	77
Şekil 4.17. Farklı oranda karıştırılmış 1500 hücre içeren heterosferoidlerin çap dağılımı. .	77

Şekil 4.18. Farklı sayıda hücre içeren HepG2+HUVEC (2:1) sferoidlerinin canlı ölü boyama floresan mikroskop görüntüleri; 1000 hücre/sferoid a) 4X, b) 10X ve c) 20X; 1500 hücre/sferoid d) 4X e) 10X ve f) 20X; 2000 hücre/sferoid g) 4X, h) 10X ve ı) 20X.	79
Şekil 4.19. Farklı sayıda ve oranda hücre içeren sferoidlerin SEM görüntüleri: HepG2 a) 1000, b) 1500 ve c) 2000; HepG2+HUVEC (1:1) d) 1000, e) 1500 ve f) 2000; HepG2+HUVEC (2:1) g) 1000, h) 1500 ve ı) 2000.	80
Şekil 4.20. Sferoid yüzeyindeki gözenegin SEM görüntüsü.	81
Şekil 4.21. Sferoidlerin immünohistokimya analizi floresan mikroskop görüntüleri; a) hücre çekirdeği DAPI boyama (mavi), b) albümin proteini (kırmızı), c) sitokrom p450 redüktaz proteini (yeşil).	81
Şekil 4.22. Sferoidlerin immünohistokimya analizi konfokal mikroskop görüntüleri; hücre çekirdeği (mavi) ve vWF (yeşil). Fotoğrafların sol üst köşesinde yer alan rakamlar yüzeyden merkeze olan uzaklığı göstermektedir.	82
Şekil 4.23. Sferoid yüzeyinden 5 µm derinlikteki sferoid kesitinin konfokal mikroskop görüntüsü.	83
Şekil 4.24. PA-GFOGER'e ait a) HPLC analizi ve b) kütle spektroskopisi sonuçları.	84
Şekil 4.25. PA-RGDS'e ait a) HPLC analizi ve b) kütle spektroskopisi sonuçları.	85
Şekil 4.26. Peptit amfifillere ait FTIR spektrumları.	89
Şekil 4.27. Peptit amfifillere ait katlanma grafiği.	90
Şekil 4.28. Peptit amfifillerin TEM görüntüleri. (a–c) PA-RGDS; (d–f) PA-GFOGER; (g–ı) PA-GFOGER+RGDS (1:4).	91
Şekil 4.29. Hidrojellere ait SEM görüntüleri: PA- RGDS: a) 10000, b) 20000X, c) 30000X; PA-GFOGER+RGDS (1:4): d) 10000X, e) 20000X, f) 30000X.	93
Şekil 4.30. Çapraz bağlanan peptit amfifillerin depo modülleri (G') ve kayıp modülleri (G''): (a) %1'lik (w/v) PA-RGDS, (b) %2'lik (w/v) PA-RGDS, (c) %2'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4), (d) %1'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4).	94
Şekil 4.31. Hidrojellerin depo modülü karşılaştırılması. Kırmızı noktalar: %2'lik (w/v) PA-RGDS; siyah noktalar: %1'lik (w/v) PA-RGDS, yeşil noktalar: %2'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4), mavi noktalar: %1'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4).	95

Şekil 4.32. Hücrelerin farklı besin ortamları içinde mitokondriyal aktiviteleri (n=3 * p<0.05, ** p<0.01 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	96
Şekil 4.33. Tübüler yapı oluşum analizi 24. saat optik mikroskop görüntüleri: a) DMEM; b) %2 (v/v) FBS içeren vaskülarizasyon ortamı; c) %10 (v/v) FBS içeren vaskülarizasyon ortamı.	96
Şekil 4.34. Sferoidlerin PA-GFOGER+RGDS hidrojeline enkapsülasyon sonrası görüntüsü.	98
Şekil 4.35. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun hücre kültüründe mitokondriyal aktivitenin zamana bağlı değişimi (n=3 ** p<0.01, *** p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	99
Şekil 4.36. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun kültüründe kümülatif albumin salım değerlerinin karşılaştırılması (n=3 ***p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	100
Şekil 4.37. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun kültüründe MTT analizi ile normalize edilmiş albümin salımının zamana bağlı değişimi (n=3 ***p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	101
Şekil 4.38. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun kültüründe kümülatif üre salımı.	102
Şekil 4.39. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun kültüründe MTT analizi ile normalize edilmiş üre salımının zamana bağlı değişimi (n=3 ***p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	102
Şekil 4.40. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) durgun kültüründe ALBUMİN, CYP1A2 ve CYP2E1 gen ifadelerinin zamanla değişimi (n=3 * p<0.05, ** p<0.01 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	103
Şekil 4.41. Çip üstü karaciğer sisteminin kurulması a) Laminar akışlı kabin içinde sferoidlerin çip içine yerleştirilmesi ve steril sistem elamanlarının birleştirilmesi b) Kontrollü akış sağlayan şırınga pompasının sisteme entegrasyonu c) Sferoidleri içeren PDMS çipin sabitlenerek inkübatörde kültürü.	105
Şekil 4.42. Karaciğer çipinin optik mikroskop görüntüleri: a) Çip doku odasının üstten görüntüsü, b) Çip içi kanalların ve sütunların görüntüsü, c) Kanallara yerleşmiş sferoidlerin görüntüsü.	105

Şekil 4.43. Sferoidlerin perfüzyon ve statik kültüründe kümülatif albumin salımlarının karşılaştırılması.	106
Şekil 4.44. Sferoidlerin perfüzyon ve statik kültürü kümülatif üre salımı (n=3 ***p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	107
Şekil 4.45. Durgun ve perfüzyon kültür koşullarının sferoidlerin ALBUMİN gen ifadesi üzerine etkisi (n=3 * p<0.05 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	108
Şekil 4.46. Durgun ve perfüzyon kültür koşullarının sferoidlerin <i>CYP 2E1</i> gen ifadesi üzerine etkisi (n=3 *** p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	108
Şekil 4.47. Sferoidlerin hidrojelili (PA-S) ve hidrojelsiz (S) durgun ve perfüzyon kültürünün ALBUMİN gen ifadesi üzerine etkisi (n=3 *** p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	109
Şekil 4.48 : Sferoidlerin hidrojelili (PA-S) ve hidrojelsiz (S) durgun ve perfüzyon kültürünün <i>CYP 2E1</i> gen ifadesi üzerine etkisi (n=3 * p<0.05, *** p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).	110

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. İlaç test yöntemlerinin karşılaştırılması [37]	13
Çizelge 2.2. Çip üstü karaciğer sistemlerinin sahip olması gereken özellikler [42].....	26
Çizelge 2.3. Sferoid üretim yöntemlerinin karşılaştırılması [47, 96].	33
Çizelge 2.4. Damarlanma için önemli olan faktörler ve kullanım amacı [131, 132]	46
Çizelge 3.1. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan malzemeler.....	47
Çizelge 3.2. Perfüze karaciğer çipi sistemine ait malzeme ve ekipmanlar	58
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primer dizileri	61
Çizelge 4.1. Peptit amfifillerin kimyasal yapısı ve özellikleri	86
Çizelge 4.2 : PA-GFOGER peptit amfifilinin çapraz bağlama yöntemleri	87
Çizelge 4.3. Besin ortamı bileşenleri	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ca	: Kalsiyum
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
CO ₂	: Karbondioksit
Dk	: Dakika
G'	: Depo modülü
G''	: Kayıp modül
HCl	: Hidroklorik asit
Mw	: Molekül Ağırlığı
μ	: mikro
N	: nano
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Na ₃ PO ₄	: Sodyum Fosfat
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
td	: İkilenme Süresi
v/v	: Hacim/Hacim Oranı
w/v	: Ağırlık/Hacim Oranı

Kısaltmalar

ADME	: Metabolizma Dağılım ve Boşaltım
ANG (1 ve 2)	: Anjiyopoietin (1 ve 2)
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
APC	: Anjiyoblastik Öncül Hücreler
Ar-Ge	: Araştırma Geliştirme
ATR-FTIR	: Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi
B	: Boyut
bFGF	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BSA	: Sığır Serum Albümin
C-AM	: Calcein Acetoxymethyl
CD	: Dairesel Dikroizm
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CLSM	: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskopu
CYP450	: Sitokrom p450
DAPI	: 4',6' diamino-2-phenylindole•2HCl
DGEA	: Aspartik asit-Glisin-Glutamik asit-Alanin
DMEM	: Dulbecco Modifiye Eagle Ortamı
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPBS	: Dulbecco Fosfat Tampon Çözeltilisi
ECM	: Hücre Dışı Matris
EFPIA	: Avrupa İlaç Sanayi ve Dernekler Federasyonu
EGF	: Endotel Büyüme Faktörü
ELİSA	: Enzime Bağlı İmmünosorban Analizi
EPC	: Endotel Öncül Hücreler

Eth-I	: Etidyum Homodimer I
F-aktin	: Filementöz Aktin
FBS	: Fötal Sığır Serumı
FDA	: İlaç ve Gıda Dairesi
GAG	: Glikozaminoglikan
GFOGER	: Glisin-Fenilalanin-Hidroksiprolin-Glisin-Glutamik asit-Arjinin
GP	: Gliserilfosfat disodyum
GPO	: Glisin-Proline-Hidroksiprolin
GTAGLIGQ	: Glisin-Treonin-Alanin-Glisin-Lösin-İzolösin-Glisin-Glutamin
HMDS	: Hekzametildisilazan
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF (α ve β)	: Hipoksi İndükleme Faktörü (α ve β)
HSC	: Hepatik uydu hücresi
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin
ITS	: İnsülin-Transferin-Selenyum
MTT	: 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
MMP	: Matris Metalloproteinaz-2
MS	: Kütle Spektroskopisi
PA	: Peptit Amfifil
PA-GFOGER	: Glisin-Fenilalanin-Hidroksiprolin-Glisin-Glutamik asit-Arjinin Taşıyan Peptit Amfifil
PA-RGDS	: Arjinin-Glisin-Aspartik-Serin Asit Taşıyan Peptit Amfifil
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
PCLS	: Hassas Kesim Karaciğer Kesitleri
PCL	: Polikaprolakton
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDMS	: Polidimetilsiloksan
PECAM-1	: Platelet Endotel Hücre Adezyon Molekülü
PEG	: Polietilen Glikol
pHEMA	: Polihidroksietilmetakrilat
PLA	: Poli laktik asit
PLGA	: Poli laktid-ko-glikolik Asit
PI	: Propidyum iyodür
PU	: Poliüretan
RGDS	: Arjinin-Glisin-Aspartik Asit-Serin
RNA	: Reoksiribonükleik asit
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TCPS	: Polistiren Hücre Kültür Kapları
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGF- β	: Transform Edici Büyüme Faktörü Beta
UV	: Mor Ötesi
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Canlı organizmada hastalıkların tedavisi ve korunması amacıyla kullanılan ilaçların geliştirilmesi oldukça uzun sürede, yüksek maliyet gerektiren, iş gücü yoğun bir prosestir. Bu proseste 5000-10000 molekül tarama testlerinden geçirilerek ilaç olmaya aday olan molekül ayrıştırılmaktadır [1, 2]. Araştırılmış her 10000 bileşikten sadece 5 tanesinin klinik çalışmalarda kullanılacağı tahmin edilmektedir. Başarılı bir ilacı piyasaya sürmenin maliyeti 391 milyon dolar ile 1,8 milyar dolar arasında değişmektedir [2]. İlaç geliştirme sürecinin düşük maliyette ve yüksek verimde gerçekleşmesi, ilaçların klinik denemelere geçmeden önce insandaki etkinliğini ve toksisitesini en doğru analiz edebilen test sistemlerinin geliştirilmesine bağlıdır.

Karaciğer, birçok ilaç veya kimyasal ajanın metabolizması (biyotransformasyon) için temel organ olması nedeniyle ilaca bağlı karaciğer hastalığı (hepatotoksisite) karaciğer hasarının oluşumunda görülen en sık nedenlerden biridir [3, 4]. Hepatotoksisite ilaçların marketten geri toplanmasındaki temel sebeptir ve farmasötik şirketleri için büyük finansal kayıplarla sonuçlanır. Bu sebeple klinik öncesi ilaçların insanlar üzerindeki etkisini daha doğru tahmin etmek için birçok model geliştirilmiştir. İlk zamanlar izole ve perfüze karaciğer modelleri, karaciğer doku kesitleri, 2 boyutlu (2B) hepatosit kültürleri ve karaciğer mikrozomları kullanılmıştır. Günümüze geldiğimizde çok farklı 2 ve 3 boyutlu *in vitro* testler ve hayvan modellerini içeren *in vivo* testler yapılmaktadır.

Son yıllarda ilaç tarama ve toksisite testleri için organ ve insan çip (*organ-on-chip* ve *human-on-chip*) sistemleri gündeme gelmiştir. Doku mühendisliği prensiplerinin mikrofabrikasyon ve mikroakışkan teknolojileri ile birleştirilmesi sonucu oluşan **organ çipleri** bütün bir organ yerine onun fonksiyonlarını yerine getiren en küçük birimlerinin taklit eden sistemlerdir [5, 6]. Çip-üstü-organ sistemleri doğal dokuların sahip olduğu i) biyolojik özellikler: 3B yapı, heterojen kompozisyon, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri, damarlanma ve doku ara yüzeylerinin oluşturulması, ii) kimyasal özellikler: biyosinyal moleküller, ilaçlar ve kimyasallar ve bunların gradyanlarının oluşturulması ve iii) fiziksel özellikler: basma çekme germe gibi doğal dokulara uygulanan yükler ve elektriksel uyaranlar ile *in vivo* ortamı en iyi modelleyen sistemlerdir. Mikron boyutundaki kanallarda laminar akış ile damarlardaki sıvı akışını taklit etmesine, akışkan içindeki kimyasal ve biyokimyasal maddelerin ve dokunun canlılığı için gerekli parametrelerin izlenmesine imkân tanıdığı için oldukça avantajlı sistemlerdir [7].

Doku mühendisliği uygulanmalarında hücrelerin doğal ortamındaki mikroçevre benzer yapıda hidrojeller ile sağlandığı için bu malzemeler özellikle tercih edilmektedir. Hidrojeller çok miktarda su ve biyolojik sıvıları absorbe edebilen, polimerlerin kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmasıyla oluşan, üç-boyutlu, hidrofilik, ağ şeklindeki özel polimerlerdir [7]. Hidrojeller hücre dışı matrise (ECM) benzeyen 3 boyutlu ağı yapısı ile hücrelere hacimsel ve mekanik destek sağlar. Hücrelerin şekillerini korumasına, hareket edip çoğalmasına ve hücreler arası etkileşimin sürdürülmesine imkân sağlarken; oksijen ve besinlerin difüzyonuna izin vererek hücrelerin süreç boyunca canlı kalmasını sağlar.

Geçtiğimiz yıllarda peptitler kullanarak biyomimetik materyallerin üretimi gündeme gelmiştir. Rejeneratif tıpta kullanılan peptit ve protein fibröz malzemelerden biri de sentetik peptit amfifillerdir. Peptit amfifiller temelde alkil veya açıl zincirlerden oluşabilen hidrofobik segment (N-terminal bir alkil uç) ve amino asit içeren hidrofilik segmentten (C-terminal uç) oluşur. Hidrofilik uç i) β tabaka oluşturabilen kısım, ii) çözünürlüğü sağlayan yüklü kısım ve iii) farklı moleküler özellikler eklenebilen biyoaktif epitop olmak üzere 3 ana yapısal özelliğe sahip kısımdan oluşur [8, 9]. Peptitler, farklı biyolojik moleküllerle etkileşime girebilecek fonksiyonel yapıları oluşturmak için kendiliğinden düzenlenebilmektedirler. Sulu ortamlarda, peptit amfifil yapısındaki hidrofobik gruplar sudan kaçarken; hidrofilik kısımlar ise su ile temas edecek şekilde düzenlenir. Peptit amfifiller, istenilen aminoasitleri dizilimine imkan tanınması ile hedeflenen biyoaktif grupların yapılarına kolayca eklenebilmesi, doğal polimerlerin aksine güvenli, patojensiz ve yüksek saflıkta büyük ölçekte ve tekrarlı üretimlerinin mümkün olması nedeniyle ön plana çıkmıştır [10].

Sunulan tez çalışmasının amacı, karaciğerin görevlerini etkin olarak gerçekleştirebilen, ilaç tarama ve toksisite testlerinde kullanılmak için çip-üstü-karaciğer sistemi geliştirmektir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar 3 kısımdan oluşmaktadır.

Tez çalışmalarının ilk kısmı karakterizasyonu yapılan HepG2 (insan hepatoblastoma) ve HUVEC (insan göbek ven endotel) hücrelerinden asılı damlacık yöntemi ile sferoid üretimidir. Sferoidlerin kullanımı *in vivo* dokunun 3 boyutlu yapısı ve gerçek hücre-hücre bağlantıları, doku heterojenitesini sağlamaktadır. Ayrıca sferoid oluşumu sırasında hücreler, morfogenez sürecinde kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) ve hücre sıralanma (cell sorting) davranışlarını göstererek *in vivo* sistemi en doğru şekilde taklit etmektedir.

İkinci bölümünde peptit amfifil hidrojellerin oluşturulması ve karakterizasyona yönelik çalışmalar yapılmıştır. Tez kapsamında kolajen-mimetik ve fibronektin-mimetik olmak üzere iki farklı peptit amfifil, ECM-mimetik hidrojel elde etmek için kullanılmıştır. Bu peptit

amfifiller sadece yapısal olarak değil aynı zamanda oluşum sürecini de taklit ederek hücresel davranışları destekleyen yapay mikroçevrelerin oluşturulmasını ve sonucunda hücre-hücre, hücre-matris etkileşimlerine bağlı dokuların fonksiyonlarının korunmasını sağlar. Yapılan çalışma kapsamında doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilecek peptit amfifil hidrojellerin etkinliği gösterilmiş olup, özellikle “çip-üstü-organ” sistemlerde hidrojel kullanımının avantajları vurgulanmıştır.

Tezin son bölümünde, geliştirilen sferoidlerin *in vitro* performanslarını arttırmak için perfüzyon biyoreaktör sistemlerinin kurulumu gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktör düzeneği; şırınga pompası, kültür ortam rezervuarı, PDMS çip ve bağlantı elemanlarından oluşmaktadır. Kültür ortamına sürekli akış sağlandığı için, kütle aktarımı konveksiyon ile gerçekleşmekte, böylece doku odası içindeki besin, gaz ve pH gradiyentleri minimize edilmektedir. Ayrıca akış etkisi ile hücreler üzerinde oluşturulan kayma gerilimi hepatositlerin işlevselliğini arttırılması ve endotelyal hücrelerin tübüler form kazanmasında olumlu etki sağlaması amaçlanmıştır. Bağlı gen ifadeleri, albumin ve üre salımı incelenerek damarlı karaciğer modelinin işlevselliği ve etkinliği değerlendirilmiştir.

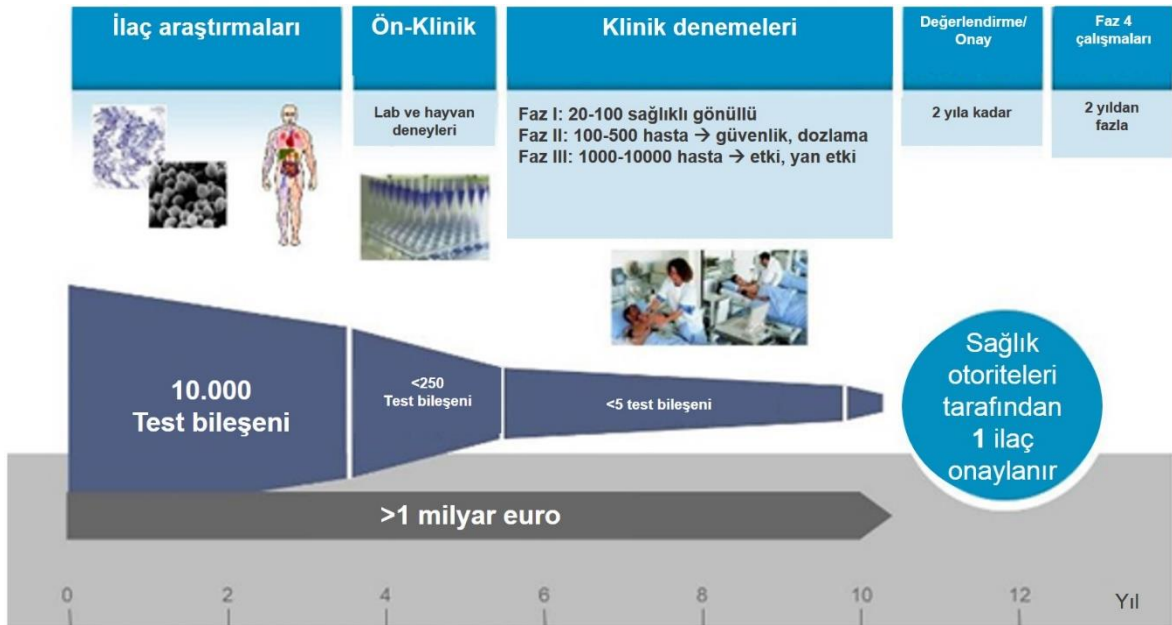
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Endüstrisi ve İlaç Geliştirme Süreci

Endüstriyel gelişmelerin, teknolojik ilerlemelerin ve çevresel etkenlerin hayat koşullarını değiştirmesi ile çeşitlenen hastalıklar ve insanların bu hastalıklara daha yatkın hale gelmesi, giderek yaşılanan dünya nüfusu ilaç sektörünün büyümesine neden olmaktadır [11].

İlaç sektörü; hastalıkların teşhisi, tedavisi ve korunması amacıyla kullanılan sentetik ve biyolojik kaynaklı kimyasal molekülleri farmasötik teknolojiye uygun üreterek tedaviye sunan bir sanayi dalıdır [11, 12]. Yoğun Ar-Ge yatırımı gerektiren ilaç sektörü Avrupa İlaç Sanayi ve Dernekler Federasyonu'nun (The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, EFPIA) 2014 yılı raporunda ilaç ve biyoteknoloji olarak ilk sırada yer almaktadır [13].

Şirketler, Ar-Ge faaliyetleri ile yeni ürünler geliştirmekte ve pazarlama faaliyetleri ile geliştirilen bu ürünleri markete sunmaktadır. İlaç sektöründe Ar-Ge süreci araştırmanın başlamasından satış stratejilerinin oluşturulmasına kadar olan süreci içerir. Yeni bir ilaç geliştirme süreci; ilacın keşfi, klinik öncesi dönem, klinik dönem, onay ve pazar sonrası denetim olmak üzere 5 aşamadan meydana gelmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İlaç geliştirme süreci [14].

Yeni bir ilacın geliştirilmesi oldukça uzun süre ve yüksek maliyet gerektiren, iş gücü yoğun bir prosestir. Bu proseste 5,000-10,000 molekül, tarama testlerinden geçirilerek ilaç olmaya aday olan molekül araştırılmaktadır [1, 2]. Araştırılmış her 10.000 bileşikten sadece 5 tanesinin klinik çalışmalarda kullanılabileceği tahmin edilmektedir [2]. Ayrıştırılmış aday moleküllerin %90'ı klinik denemelerde elimine olarak sadece %10'u markete geçebilmektedir [15]. Araştırılan bu moleküller karmaşık olması ve ilaçların satış ruhsatı alma şartlarının ağırlaşması ilaç geliştirme maliyetinin artması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle başarılı bir ilacı markete sürmenin maliyeti 391 milyon dolar ile 1.8 milyar dolar arasında değişmektedir [2] (Şekil 2.1).

Klinik öncesi ilaç geliştirme 5-8 yıl sürerken klinik denemeler 2-6 yıl sürmektedir. Bir buçuk yıl ilaç onayı da bu süreye dahil edilirse yeni bir ilacın geliştirilerek markete sunulması 10-15 yıl sürmektedir [2]. Yeni bir ilacın geliştirilerek markete ulaşması 1980'lerde ortalama 11 yıl iken 2000'li yıllarda 15 yıla kadar çıkarak son yıllarda ilaç geliştirme süresi artmıştır [1]. Proses verimliliğinin artırılması ve ilaç geliştirme maliyetlerinin azalmanın incelendiği bir çalışmada ilaç geliştirme toplam süresindeki %5 azalma; geliştirme maliyetine %3.5 düşüş olarak yansıdığı rapor edilmiştir. Bu miktar oldukça düşük gibi görünse de 1 milyar doların %3.5'i azımsanmayacak kadar önemli bir miktardır. Çalışmada özellikle vurgulanmak istenen, ilaç geliştirme prosesinde verimsiz geliştirme programlarının ne kadar erken safhada sonlandırılırsa maliyetin o kadar azaltılacağıdır [2].

2.2. Karaciğerin İlaç Metabolizmasındaki Önemi

Karaciğer; karbonhidrat, protein ve yağların metabolizması, albümin ve pıhtılaşma faktörleri gibi moleküllerin sentezi, safra gibi salgıların sekresyonu, ilaç, toksinler ve amonyumun detoksifikasyonu ve demir, kan, ve vitaminlerin depolanması gibi önemli biyokimyasal ve metabolik işlevlere yön veren yaşamımız için önemli bir organdır [16].

2.2.1. Karaciğerin Anatomisi

İnsan vücudundaki en büyük organ olan karaciğer karın boşluğunun sağ üst bölümünde diyaframın altında bulunur. Erişkin bir insanda yaklaşık 1,500 gr ağırlığındadır [16]. Karaciğer en dışta seröz bir zar olan periton ve onun altında ise kolajen ve elastik lif içeren Glisson kapsülü ile çevrelenmiştir. Glisson kapsülü karaciğer içerisine gönderdiği uzantılar ile karaciğeri lob, segment ve lobüllere ayırır [17]. Karaciğer; sağ lob (lobus hepatis dekster), sol lob (lobus hepatis sinister), dörtgen lob (lobus quadratus) ve kuyruklu lob (lobus caudatus) olmak üzere dört lobdan oluşur [18, 19] (Şekil 2.2).

Vücudumuzdaki organlar sadece arteriyel sistemden kan aldığı halde karaciğer hem arteriyel (A. hepatica), hem de venal (V. portae) sistemden kan aldığı için diğer organlardan farklı bir kan dolaşımı gösterir. Karaciğerde gerçekleşen bu **ikili kanlanma sistemi** [19-21];

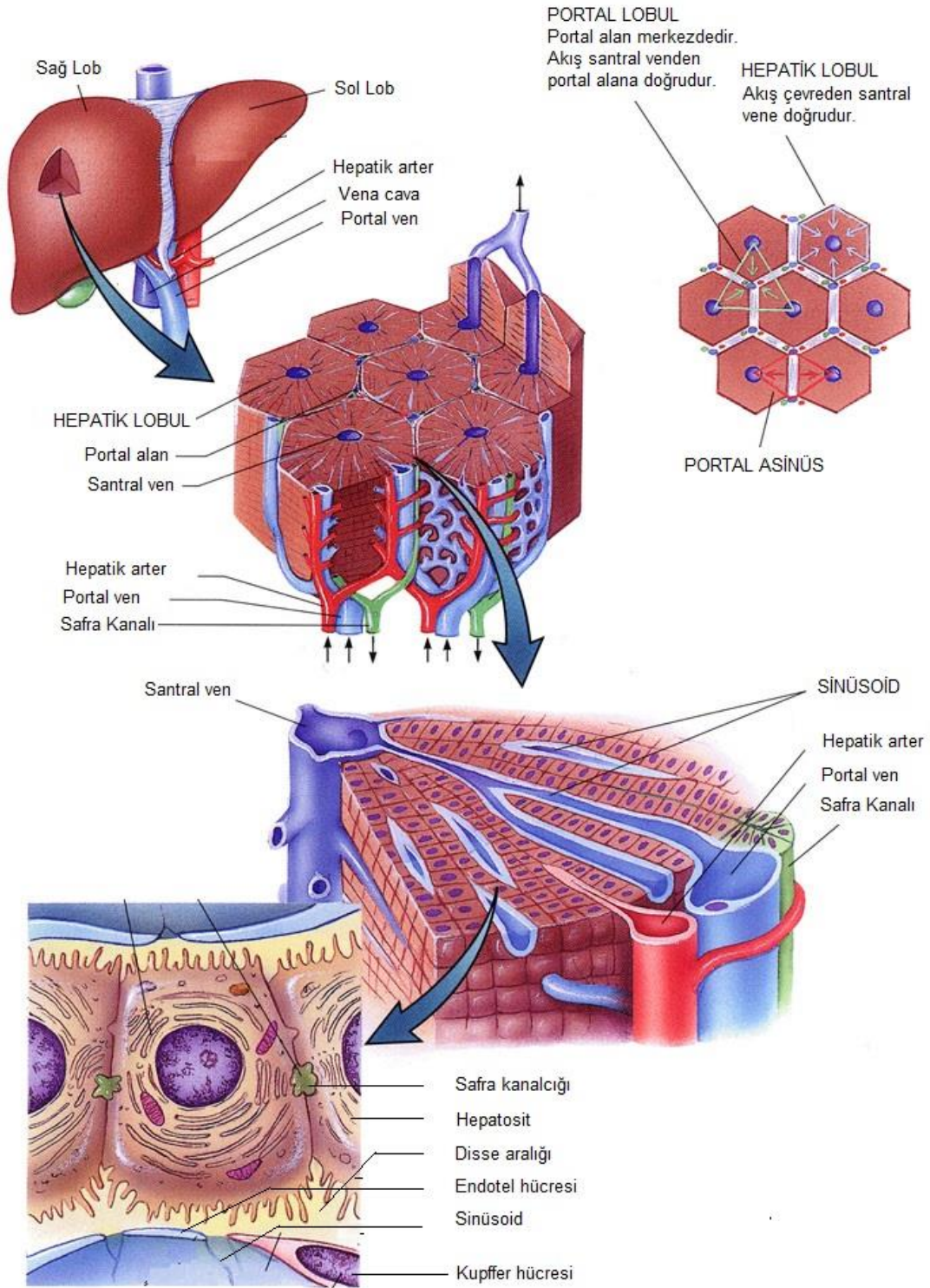
1) Portal Ven Sistemi: Karaciğere gelen toplam kanın % 70-80'ini sağlayan portal ven, besin maddeleri bakımından zengin kanı taşır. Portal alanlarda portal venler küçük portal venülleri oluşturmak üzere dallanır. Portal venüller dallara ayrılarak, dağıtıcı venleri meydana getirirler. Sinüzoidler merkezden çevreye doğru radyal olarak dağılır. Lobülün merkezinde birleşen sinüzoidler, çapı 50 µm olan santral veni oluştururlar. Santral venler, sublobüler venleri meydana getirecek şekilde bir araya gelir. Sublobüler venler tekrarlı dallanarak daha geniş hepatik venlere dönüşür. Hepatik venler, bir araya gelerek inferior vena kavaya katılır. Kanın ve safranin lobüller boyunca zıt yönlerde akması lobül organizasyonu ve hepatosit işlevinin anlaşılmasını sağlar [22].

2) Arteriyel Sistem: Karaciğere gelen toplam kanın % 30-20'ini sağlayan hepatik arter, merkezi dolaşımdan karaciğere bol oksijenli kanı taşıyan sistemdir. Hepatik arter dallara ayrılarak lobüller arası arteri meydana getirir. Bu dallanan arterlerden bazıları sinüzoidler içinde sonlanan arteriyelleri oluşturur. Sonuçta sinüzoid içinde arteriyel ve portal venöz kan karışır.

2.2.2. Karaciğerin Histolojisi

2.2.2.1. Karaciğer Lobülü

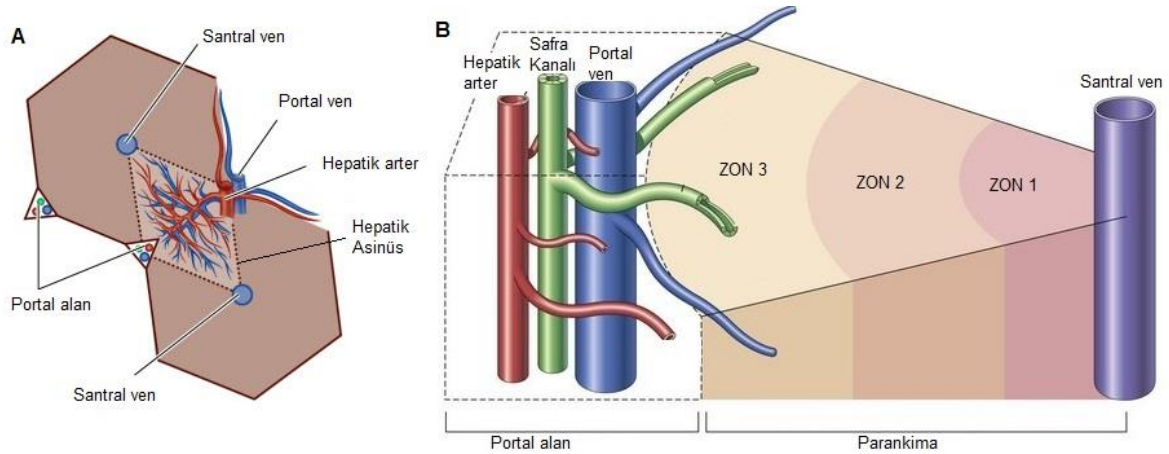
Karaciğerin yapısal ve fonksiyonel birimi lobüldür (Şekil 2.2). Merkezinde terminal hepatik venül (santral ven), köşelerinde ise portal alanların bulunduğu poligonal ünitelere “karaciğer lobülü” denir. Karaciğer lobülü birkaç mm uzunluğunda 0,8-2 mm çapında ve silindirik yapıdadır. Karaciğerde yaklaşık olarak 50,000-100,000 adet karaciğer lobülü bulunmaktadır [16]. Portal ven, hepatik arter ve interlobüler safra kanalı portal alanda yer almaktadır. Karaciğer parankimini oluşturan hepatositler, santral venden etrafa doğru uzanarak Remarck kordonlarını oluşturur. Bu kordonların arasındaki boşlukta karaciğer sinüzoidleri adı verilen kapillerler bulunur. Sinüzoidal kapillerler düzensiz olarak genişlemiş damarlar olup, burada portal alandan santral vene doğru kan akışı meydana gelir [23]. Sinüzoid duvarında endotel ve Kupffer hücreleri yer almaktadır. Endotel tabakanın altında endotel hücreleri ile karaciğer hücreleri arasında bulunan dar doku aralığına “Disse Aralığı” denir [16]. İki komşu karaciğer hücresi arasında safra kanalcıkları bulunur. Karaciğer hücreleri tarafından sentezlenen safra, safra kanalcıklarına verilir [24].



Şekil 2.2. Karaciğerin anatomi ve histolojisi [25].

2.2.2.2. Karaciğer Asinüsü

Karaciğer asinüsü; portal alan ile santral ven arasında oluşan üçgen şeklinde birime denir [23] (Şekil 2.3). Karaciğer asinüsünün kısa eksen, iki klasik karaciğer lobülünün sınırları arasında yer alırken uzun eksen, iki santral ven arasında bulunan kısa eksene en yakın sanal çizgidir. Asinüs modeli; arteriyel ve portal venöz damarlar ile karaciğer parankimine ulaşan kanın hepatositlerce işlendikten sonra terminal hepatik venüllere dökülmesi göz önünde bulundurularak oluşturulmuştur [20]. Bu model, kandan yararlanma derecelerine göre lobülde yer alan hepatositleri üç alana ayırır: En içte yer alan Zon 1 (birinci bölge), portal venülün ve hepatik arteriyolün uç dallarına en yakın yerleşime sahiptir. Bu bölge kandaki oksijenin ve besin maddelerinin ilk alındığı yerdir. Zon 2 (ikinci bölge) periferik zon ile santral zon arasında yer alır ve geçiş zonudur. Oksijen ve besin maddeleri açısından ara bir durumdadır. Zon 3 (üçüncü bölge) merkezi vene en yakın olup, oksijen açısından fakirdir [26]. Her hepatosit karaciğerin tüm işlevlerini gerçekleştirebilir. Fakat Zon 1'deki hepatositler daha çok aminoasit parçalanması, glukoneogenez, safra asidi salımı, yağ asidi oksidasyonu ve kolesterol üretimi ile ilgili görevlere, Zon 3'teki hepatositler glukoliz, detoksifikasyon lipogenez gibi işlevleri yoğun olarak yerine getirir. Bu kan akım yönü perilobüler hücrelerin santralobüler hücrelerden farklı davranmasının nedenini kısmen açıklayabilir [23].



Şekil 2.3. Karaciğerin asinüsü [27, 28]

2.2.2.3. Karaciğerin Yapısındaki Hücreler

Karaciğer; hepatositler, Kupffer hücreleri, endotel hücreleri, satelit (uydu) hücreleri ve safra kanalı epitelyum hücreleri olmak üzere yapısında beş tip hücre bulundurur.

➤ **Hepatositler**

Hepatositler; poligonal karakterde, 20-30 µ çapta, genellikle bir, bazen de iki çekirdekli hücrelerdir. Karaciğer hücrelerinin % 60-70'ini oluşturan hepatositler, karaciğerin ana fonksiyonel hücreleridir. Fonksiyonu itibarı ile bol miktarda endoplazmik retikulum, ribozoma, Golgi cisimciğine ve mitokondriye sahiptir. Genel olarak granüllü formu protein sentezinden sorumludur. Granülsüz formu hepatositlerde özellikle safra yapımı, salgılanması ve toksik maddelerin detoksifikasyonundan sorumludur [23].

Bir hepatositin “bazolateral bölge ve apikal bölge” olmak üzere iki hücresel bölgesi bulunmaktadır. Yüzü Disse aralığına doğru bazolateral bölge çok sayıda mikrovillus içererek kandan kaynaklanan maddelerin emilimine ve plazma proteinlerinin (albumin, fibrinojen, protrombin ve koagülasyon faktörleri V, VII ve IX gibi) salgılanmasına katkıda bulunur. Apikal bölge ise mikrovilluslarla çevrelenmiş bir girinti şeklinde olup safra kanalikülünün kenarını çevrelemektedir. Safranın dışarı kaçışını önlemek için kenarları bağlantılarla sıkıca kapatılmıştır [20].

➤ **Endotel Hücreleri**

Karaciğer hücrelerinin yaklaşık %20-30'unu oluşturmaktadır. Karaciğer fonksiyonel ünitesindeki sinüzoidler, endotel hücrelerinin birbiri ile bağlanmasıyla oluşturdukları tübüler yapılardır. Endotel hücreleri, sitoplazma ve organelleri az olan hücrelerdir. Endotel hücreleri yaklaşık 1 mikron çapında çok geniş porlar bulundurur [16]. Endotelin pencere ve kesintili yapısı bu damarların yüksek düzeyde geçirgen olmasını sağlar. Plazma sıvısının sinüzoid lümeniyle karaciğer hücreleri arasında molekül alışverişini sağlar. Bu geçiş çok sayıda büyük molekülün (örn. albumin, lipoproteinler, fibrinojen) hepatositler tarafından kana verilmesine ya da bu makromoleküllerin çoğunun hepatositlerce alınıp çözülmesine imkan tanır [20].

➤ **Kupffer Hücreleri**

Kupffer hücreleri monositlerden köken alan ve kuvvetli fagositoz yapan hücreler olup lümene doğru çıkıntı yapmıştır. Karaciğer hücre topluluğunun % 15'ini Kupffer hücreleri oluşturur. Bu hücrelerin çoğu fagositozda çok aktif oldukları periportal lopçuk bölümlerinde yerleşmiştir. Başlıca işlevleri yaşlanmış eritrositleri metabolize etmek, immün yanıt proteinlerini salgılamak, hemoglobini sindirmek ve bakterileri ortadan kaldırmaktır [26].

➤ **Hepatik Satelit Hücreleri**

Satelit hücreleri, karaciğer sinüzoidlerinin yakın konumunda, Disse Aralığı'nda yer alan mezenkimal kaynaklı hücrelerdir. Bu hücrelerin, ekstraselüler matriksin (ECM) sentezi, hücreler arası iletişim, fibrojeniz, eritropoietin sentezi, kemotaktik maddelerin salınması ve retinoid alımı, depolanması ve metabolizması gibi farklı görevleri vardır [20, 29].

➤ **Safra Kanalı Epitelyum Hücreleri**

İki hepatositin bitişik olduğu her yerde tübüler bir aralık bulunur ve safra kanalı epitel hücreleri bu aralıkta organize olarak “safra kanalikülü” olarak isimlendirilir [22]. Hepatosit hücreleri tarafından sentezlenen safrayı, safra kanalları ile lobülün merkezinden periferine doğru taşırlar. Kan ve safra lobüller boyunca zıt yönlerde doğru akar.

2.2.3. Karaciğerin Fizyolojisi

Karaciğer metabolik birçok reaksiyonu gerçekleştiren çok fonksiyonlu bir organdır. Karaciğerin aşağıda ayrıntılı olarak açıklanan önemli görevlerini; metabolizma, depo, salgı, kanı temizleme ve biyotransformasyon temel başlıkları altında toplayabiliriz [16, 30].

➤ **Metabolizma**

Karaciğer karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında, vitamin, glikojen ve mineral gibi maddelerin depolanmasında ve koagülasyon faktörlerinin sentezinde görev alır.

Karbonhidrat Metabolizması

Karaciğerin birincil metabolik görevi glikoz ve amino asitler gibi birçok metabolitlerin kandaki miktarını düzenlemektir. Karaciğere ulaşan fazla glikoz karaciğerde glikojen şeklinde depolanır. Kandaki glikoz konsantrasyonu düşmeye başladığında da glikojen depolarını kullanarak glikoz tamponlama işlevini yerine getirir. Ayrıca kandaki glikoz seviyesi normalin altına düştüğünde glikoneojenez ile laktat, gliserol ve amino asitler gibi karbonhidrat dışı metabolitleri glikoza çevirir [16, 22].

Protein Metabolizması

Karaciğer, amino asitlerin sentezini ve bazı aminoasitlerden önemli kimyasal bileşiklerin oluşturulmasını sağlar [16]. Üre oluşumu ile amonyağın vücut sıvılarından uzaklaştırılmasında ve plazma proteinlerinin oluşumu ile protein metabolizmasında fonksiyon görür [22].

Lipid Metabolizması

Karaciğerde yağ asitlerinin sentez ve oksidasyonu, yağ asitlerinden trigliserid oluşumu, karbonhidrat ve proteinlerden yağ sentezi, fosfolipid, lipoprotein ve kolesterol sentezi, gerçekleşmektedir [22].

➤ Depo Görevi

Kanın Depolanması

Karaciğer kan hacmi azaldığında ek kan sağlama, kan hacmi arttığında ise kan depolama yeteneği olan bir organdır. Vücuttaki kan hacminin %10'unu yapısında bulunduran karaciğer kalpte basınç yükseldiğinde karaciğerde de artar ve normalde var olan kan deposuna 500 – 1,000 mL daha kan ekleyebilir [16].

Vitaminin Depolanması

Karaciğer en fazla A vitaminini, buna ek olarak da D ve B12 vitaminini depolar [16].

Demirin Depolanması

Demir kandaki hemoglobinin dışında karaciğerde ferritin formunda depolanır. Karaciğer hücrelerinde bulunan apoferritin vücut sıvılarında demir miktarı arttığında demir apoferritinle birleşerek ferritini oluşturur ve hepatik hücrelerde depolanır. Vücut sıvısında demir azaldığında ferritin demiri serbest hale gelir. Böylece apoferritin-ferritin sistemi demir deposu işlevi görür [16].

➤ Safra Salgılanması

Karaciğerin önemli işlevlerinden biri safrayı salgılamaktır. Safra karaciğerin ekzokrin salgısı olarak, hepatositlerde granülsüz endoplazmik retikulumda sentezlenir. Safra içerisinde safra asitleri, bilirubin, kolesterol, fosfolipidler ve elektrolitler bulunur. Bu maddeler epitelden emilim yoluyla hepatosit içine alınır ve hepatositler aracılığıyla safra kanallıklarına taşınır [22]. Safra, yağların sindirim ve emiliminde, kandan yıkım ürünlerinin atılmasında önemli fonksiyonlara sahiptir [16].

➤ Kanın Temizlenmesi

Bağırsak kapillerinden gelen kan bağırsak florasında bulunan birçok bakteriyi de beraberinde götürür. Hepatik venöz sinüslerde yer alan Kupffer hücreleri sinüs içinden geçen kanı filtreleyerek sistemik dolaşıma temiz kanı verir. Fagositik makrofaj olan Kupffer hücreleri bakteriyi hücre içine alarak sindirir [16].

2.2.4. İlaçların Metabolizması

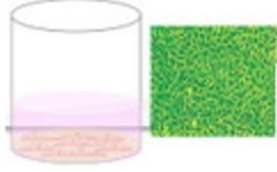
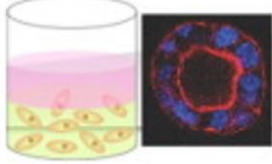
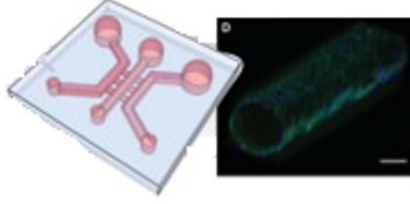
Karaciğer, karbonhidrat, lipit ve aminoasit metabolizmasındaki işlevlerinin yanı sıra gastrointestinal sistemdeki yerinden dolayı birçok yabancı maddenin (zenobiyotiklerin) metabolizmasından da görev alır [31]. Vücuda giren zenobiyotiklerin enzimler vasıtasıyla kimyasal değişikliğe uğrayarak yıkım ürünlerine (metabolit) dönüşmesine “biyotransformasyon” denir [32]. Biyotransformasyon sonucu ilaçlar aktif, daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline gelir [33]. Günümüzde kullanılan ilaçların birçoğu emilimlerini kolaylaştıracak şekilde lipofilik yapıya sahiptir. Bu ilaçlar hidrofilik özellik kazanabilmek için biyotransformasyona ihtiyaç duyar [31].

Bir ilacın metabolizması faz I ve faz II reaksiyonlar zinciri ile gerçekleştirilir. Faz I’de sitokrom P450-bağımlı monooksijenazların etkisiyle oksidasyon-redüksiyon ve hidroliz gibi aktivasyon reaksiyonları gerçekleşir [34]. Sonuçta toksik kimyasallar ve serbest radikaller oluşur [4]. Faz II ise sülfat, glisin, glukuronik asit ve glutatyon, asetat ile konjugasyonları yöneterek detoksifikasyon reaksiyonları oluşturur. Bu fazda glukuronidasyon temel detoksifikasyon reaksiyonudur. Faz II konjugasyon reaksiyonları sonucunda ilaç veya metabolitleri suda eriyebilir hale gelir ve safra veya idrar yoluyla atılır [31]. Aktivasyon ile detoksifikasyon reaksiyonları arasındaki dengenin bozulması sonucunda hepatotoksisite görülür.

2.3. İlaç Toksisite Test Yöntemleri

Karaciğer, birçok ilaç veya kimyasal ajanın metabolizması için temel organ olması nedeniyle reaktif metabolitlere maruz kalır ve toksik etkiler sıklıkla görülür [4]. Nefazodon, trovafloksasin gibi ilaçların marketten toplatılmasına neden olan hepatotoksisite, %18 oran ile marketten geri toplanan ilaçlar içinde en yüksek yüzdeye sahiptir [35]. Bu sebeple klinik öncesi ilaçların insanlar üzerindeki etkisinin daha doğru tahmin edilmesi için karaciğer fonksiyonlarını taklit eden birçok sistem geliştirilmiştir. İlk zamanlar izole ve perfüze karaciğer modelleri, karaciğer doku kesitleri, 2 boyutlu (2B) hepatosit kültürleri ve karaciğer mikrozomları kullanılmıştır [36]. Günümüze geldiğimizde çok farklı 2 ve 3 boyutlu testler ve hayvan modellerini içeren testler yapılmaktadır. Bu test yöntemleri aşağıda detaylı olarak açıklanmış ve Çizelge 2.1’de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 2.1. İlaç test yöntemlerinin karşılaştırılması [37]

İKİ BOYUTLU (2B) SİSTEM	ÜÇ BOYUTLU (3B) SİSTEM	ÜÇ BOYUTLU (3B) MİKROAKIŞKAN SİSTEM	HAYVAN MODELİ
			
• Kişisel bağımlılığı az • Hücrelerdeki değişiklikler izlenebilir • Ko-kültüre olanak sağlar • Altakım analizlerine olanak sağlar	• <i>In vivo</i> hücresel organizasyona benzeme • Hücreler ECM etkileşimlerini içerir. • Ko-kültüre olanak sağlar • Altakım analizlerine olanak sağlar	• Fizyolojik olaylar mevcut • Organ seviyesinde fonksiyonellik ve etkileşim • Daha az örnek ile çalışma • Gelişmiş görüntüleme ve nicelik özellikler • Gelişmiş üretim • Kontrol edilebilirliğin artması • Ucuz	• Organ seviyesinde etkileşim • Bütün organizma kullanılır • Fizyolojik olaylar mevcut • Genetik olarak modifiye edilebilir.
• Fizyolojik olaylara benzerliği yok • Sınırlı nicelik özellikler • Sınırlı üretim • Çok fazla örnek ile çalışma	• Sınırlı nicelik özellikler • Sınırlı üretim • Çok fazla örnek ile çalışma	• Kullanım için çok fazla denemeye ihtiyaç duyması	• Etik sınırlamalar • Verimliliği düşük • Pahalı • Sınırlı nicelik özellikler • İnsandan farklı özellikler

2.3.1. İki Boyutlu (2B) Sistemler

2.3.1.1. Tek Tabaka Hücre Kültürü

Uzun yıllardır tek tabakalı hücre kültürleri ilaçların toksisitesinin ve metabolik yollarının tahmin edilebilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu platformlar, hücrelerin kültür kabı yüzeylerinde tek tabakalı olarak kültürü şeklindedir. Daha sonra, ilaçlar tarama yapmak için hücre kültür ortamına eklenir ve belirli aralıklarla, hücreler tarafından üretilen kimyasal ve biyolojik sinyaller analiz edilir. Bu yöntem ilaçlar ile hücreler arasındaki etkileşimleri analiz etmek için doğrudan kullanılan bir yöntemdir [38].

Ayrıca kolay, ucuz, tekrarlanabilir olmaları nedeniyle avantajlıdır [39]. Özellikle fare, sıçan ve insan gibi farklı türlerden elde edilen hepatositler ilaç metabolizmasının tahmin edilebilmesi ve hepatoksisitenin değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılmaktadır.

Tek tabakalı hepatosit hücre kültürlerinin önemli bir dezavantajı; hücreleri çevreleyen bir mikroçevrenin olmaması nedeniyle hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyonu, çoğalma özellikleri, hücre yoğunluğu ve metabolik fonksiyonların zaman içerisinde farklılaşmasıdır [40]. Kültür sırasında oluşturulan yanıtlar doğal sistemlerdeki yanıtlardan farklıdır [6]. Ayrıca ilaç metabolizmasında kullanılan farklı türlere ait hepatositlerin enzimlerindeki türler arası kalitatif ve kantitatif farklılıklar, hayvan hepatositlerindeki ilaç metabolizması ve hepatoksik etkilerden yola çıkarak insan metabolizması için tahmin yürütülmesini zorlaştırmaktadır [36].

2.3.1.2. Karaciğer Kesitleri

Hassas kesim karaciğer kesitleri (precision cut liver slices-PCLS), organların çok hücreli karakteristiklerini taklit eden bir doku kültürü tekniğidir [41]. Birçok hücre kültürü tabanlı modelin aksine doku mimarisini korur ve karaciğerin tüm hücre tiplerini içerir. Doku mimarisini ve heterojenitesini koruduğu, matriks-hücre ve hücre-hücre etkileşimlerini içerdiği için PCLS ilaç toksisite testlerinde en uygun model olarak görünebilir. Bununla birlikte, endüstriyel ortamlardaki kullanımı, başarılı kriyoprezervasyon yöntemlerinin bugüne kadar mevcut olmamaları ve ortamdaki kısa ömürleri nedeniyle kullanımı sınırlıdır [42]. PCLS'nin işlevsel ömrünü uzatmak için mikroakışkan cihazlar kullanılmaktadır. Van Midwound ve ark. kararsız metabolitlerin saptanması için, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile birleştirilen mikroakışkan bir cihaz içerisinde insan PCLS'sini kültüre etmişlerdir. Mikroakışkan perfüzyonu uzun kullanım ömrü sağlarken, ilerleyen zaman dilimi içinde işlevsellik gösterememektedir. Bu da en az birkaç hafta boyunca kararlı

bir karaciğer fenotipinin gerekli olduğu kronik ilaç doz çalışmalarını ciddi bir şekilde sınırlandırmaktadır [43].

2.3.2. Üç Boyutlu (3B) Sistemler

1990 yılında geliştirilen doku mühendisliği teknikleri ile ilaç tarama ve toksisite testlerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Doku mühendisliği uygulamalarında 3B doku oluşturma teknikleri aşağıdan yukarıya (bottom-up) ve yukarıdan aşağıya (top-down) yaklaşımlar olmak üzere iki gruba ayrılır [44]. Top-down doku mühendisliği tekniklerinde; biyouyumlu ve biyobozunur doku iskelelerine hücre ekimi gerçekleştirilerek, doku iskeleleri içerisinde çoğalmaları ve kendi hücre dışı matrislerini sentezleyerek doku oluşturmaları beklenmektedir [45]. 3B doku iskelelerinin fabrikasyonunda; elektroegirme, dondurarak kurutma, faz ayrımı, partikül uzaklaştırma, hızlı prototipleme gibi yöntemler kullanılmaktadır [44].

Bottom-up doku mühendisliği yaklaşımında ise mikro ölçekteki doku bloklarının organa özgü mimariye benzer daha büyük doku yapılarını oluşturmak amacıyla bir araya getirilmesi prensibine dayanmaktadır. Doku yapılarını; biyobaskılama (3D bioprinting), kendiliğinden organize olabilen hücre tabakaları (cell sheet engineering) ve hücre sferoidleri (cell spheroids) gibi fabrikasyon teknikleri kullanılarak dokular oluşturulur [46].

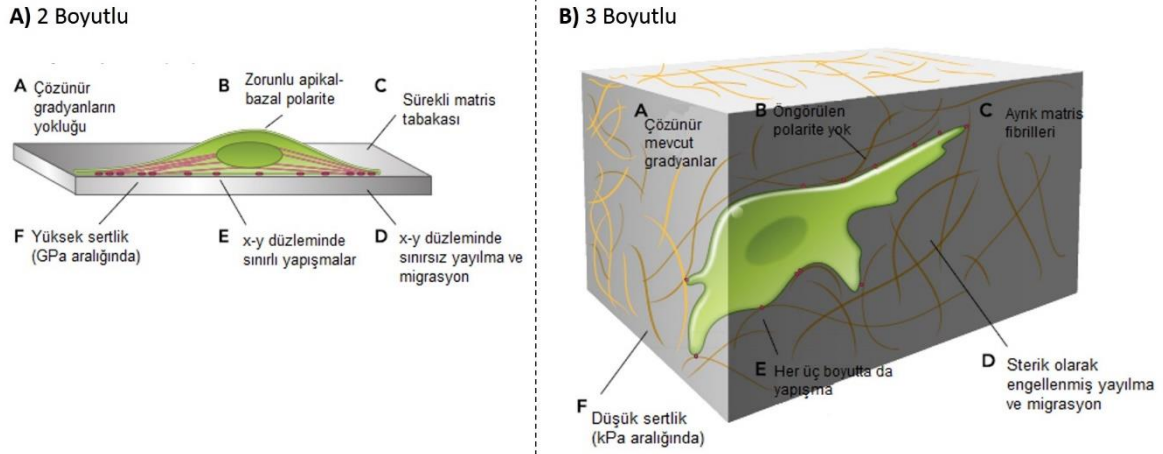
2.3.2.1. Hücre Sferoidleri

Sferoidler, yapışan hücrelerin birbirine tutunarak agregat oluşturma eğilimi ile çok çeşitli hücre tiplerinden elde edilebilen basit 3B modellerdir. Herhangi bir dış uyaran/etki ya da katı doku iskelesi desteği olmadan kendiliğinden düzenlenme (self assembly) ve kendiliğinden organizasyon (self organization) mekanizmaları üzerinden son şeklini alır. Sferoidler, karmaşık çok hücreli mimarisi, kütle transfer bariyerleri ve hücre dışı matriks birikimi dahil olmak üzere kritik fizyolojik parametreleri modellemektedir [47]. Hücreler sferoidlere kendiliğinden düzenlendikçe, metabolik ürünleri (oksijen, karbondioksit, besinler), atıkları ve çoğalmayı destekleyen biyosinyalleri verimli bir şekilde içsel gradyanlar oluşturarak doğal katı organları taklit ederler [48]. Ayrıca bu hücresel küreler standart 2B ortamlara göre avasküler ve katı tümör davranışını daha etkili bir şekilde taklit ederler. Çünkü tümörler gibi sferoidler genellikle heterojen bir popülasyona maruz kalan ve merkezde çoğalan ve çoğalmayan hücreler ile iyi oksijenli ve hipoksik bölgeler içerirler [49]. Buna ek olarak diğer hücrelerle olan kokültürleri ilaç tarama ve toksisitesi testleri için daha doğru yanıtların oluşturulmasını sağlar. Birçok yüksek verimli toksisite ve tarama uygulamaları için mevcut sisteme uygulanabilir, takibi ve analizi kolay ve seri üretime izin veren sistemler olduğu için avantajlıdır [50].

2.3.2.2. 3B Matris Sistemler

Bir dokunun tam olarak yapısını, fonksiyonunu ve patofizyolojisini anlayabilmek için dokuyu oluşturan hücrelerin, bütün canlı bir organın bir parçası olarak, 3B bir yapı içinde, biyolojik kimyasal ve mekanik mikroçevrelerini incelemek çok önemlidir. ECM proteinlerinin bileşim, konfigürasyon ve miktar bakımından üretimi; yüzey reseptörlerinin yönelimi ve kümelenmesindeki farklılıklara bağlı olarak modifiye edilir [51]. ECM sahip olduğu mekanik, kimyasal ve topolojik özellikleri ile hücresel biyoaktiviteleri tetiklemek ve hücre kaderini düzenlemek için çok faktörlü sinyaller üretir [52]. Hücre mikroçevresinin kontrol edilebilmesi, hücre canlılığı, büyüme, göç, apoptoz ve farklılaşmanın kontrol edilmesi için anahtardır [48].

2B kültürler de, hücre besin ortamı içindeki çözünür bileşenlerin taşınım alanını arttırmak için yüzey alanını genişletir. Hücre büyümesinin başlangıç oranı daha yüksektir, ancak hücreler yüzeyi tamamen kapladığında çoğalma durur. Aşırı beslenmeye ve oksijene maruz kalan hücreler için moleküler gradyanlar oluşturulamaz. Ayrıca ECM bulunmadığından dolayı ECM konfigürasyonundan kaynaklanan uygun sinyalleri almazlar ve hücre ortamdan farklı davranışlar gösterir [51]. Daha gerçekçi sonuçlar almak için 3B hücre kültürü modelleri geliştirilmeye başlanmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. 2B ve 3B mikroçevrelerde bulunan hücrelerin davranışı [52].

Üç boyutlu matriks sistemler, hücrelerin ECM benzeri yapılar içinde 3B olarak kültüre edildiği sistemlerdir. 3B hücre kültür modelleri hücrelerin, benzeri 3B konumlanması, hücresel fonksiyonları destekleyen biyoaktif yapay mikroçevrelerin oluşturulması, hücre-hücre, hücre-matris etkileşimlerine bağlı dokuların fonksiyonlarının korunmasını sağlar.

Ayrıca 3B sistemler farklı tipteki hücrelerin bir arada kullanımına imkân tanıyarak gerçek dokunun heterojenitesini sağlamasıyla 2B sistemlere göre avantaj sağlar [6, 52]. Günümüzde ECM yapısını taklit etmek için, kolajen, hyalunarik asit, fibrin, jelatin gibi doğal ve polietilen glikol (PEG) ve poli laktik asit (PLA) gibi sentetik polimerlerden, seramiklerden (trikalsiyum fosfat, hidroksi apatit vb.) ve bunların karışımından oluşan kompozit biyomalzemelerden gözenekli doku iskeleleri geliştirilmektedir [44, 46, 53].

Bununla birlikte en başarılı 3B hücre kültürü modellerinde bile, doku-doku arayüzleri (örneğin, epitel ve vasküler endotelyum), moleküllerin ve oksijenin düzlemsel gradyanları ve mekanik olarak aktif olan mikroçevre tam olarak taklit edilemez. Jel bazlı hücre kültür sistemleri ayrıca fizyolojik difüzyon gradyanlarının (örneğin, böbreklerde iyon taşınması) veya genellikle polarize bir şekilde salgılanan hücresel ürünlerin modellenmesi bakımından teknik zorluklar yaratır [6].

2.3.2.3. Mekanik Destek Sistemler

“Filtre well insört”ler bir kültür kabını bir membran filtreyle ayırarak üst ve alt olmak üzere iki adet kompartman sağlayan cihazlardır. İnsört sistemler, hücrelerin bazal membrana tutunmaları için hücrelere alt tabakalar sağlarken bazal ve apikal yüzeylerden çeşitli moleküllerin salgılanmasını da destekler. Bu yapı ortamdaki benzer bir şekilde yönlü ve polarize metabolik süreçlere izin verir. 1950’lerde, Grobstein filtrelerle ayrılmış embriyonik fare dokularının morfogenetik özelliklerini incelemek için filtrelerin kullanımına öncülük etmiştir.

İnsört sistemlerdeki filtrenin türünün seçimi bu tekniğin başarıya ulaşması için en kritik adımdır. Filtreler geniş bir aralıktaki gözenek boyutuna ve kaplama şekline sahip olabilir. Tüm bu özellikler kullanılacak hücre tipine ve yapılacak testlere bağlıdır [54]. Fakat fizyolojik yapıya benzerliğinin düşük olması, hücrelerin statik koşullarda kültüre edilmesi ve buna bağlı membran gözeneklerinin tıkanması ya da geçirgenliğinin azalması bu sistemlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle filtre well insörtlerin hücre migrasyon ve invazyon çalışmalarında kullanımı yaygındır [55].

2.3.3. Hayvan Modelleri

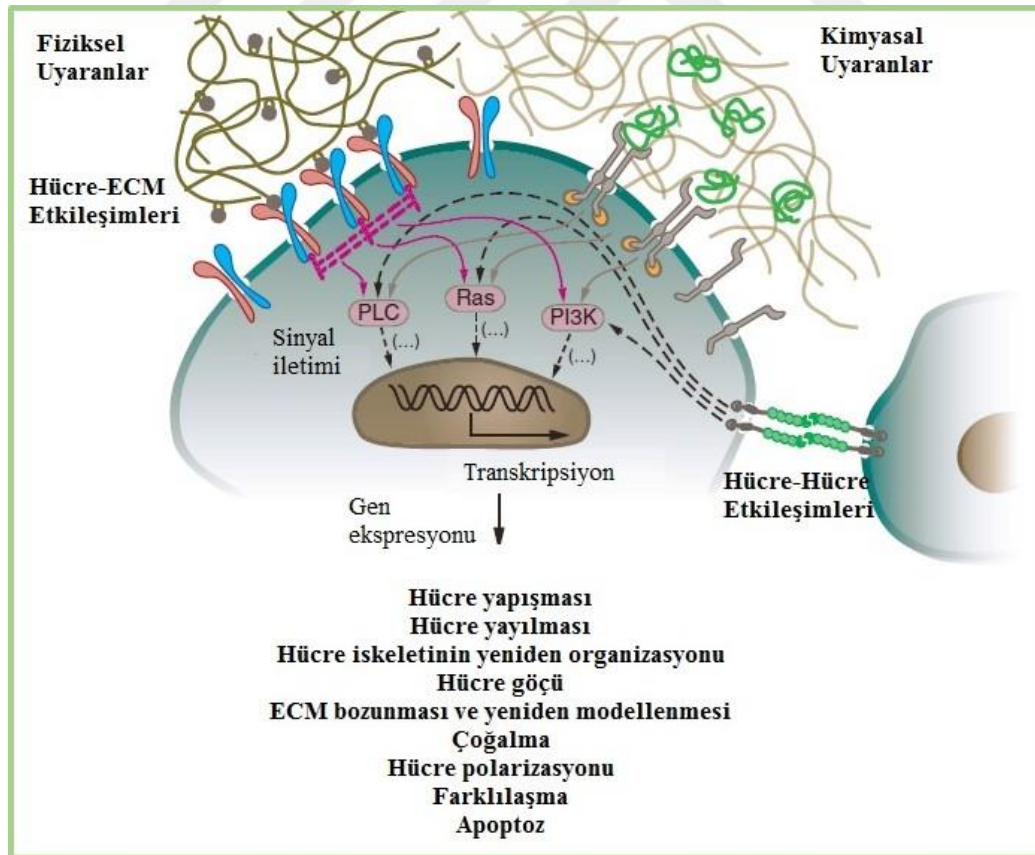
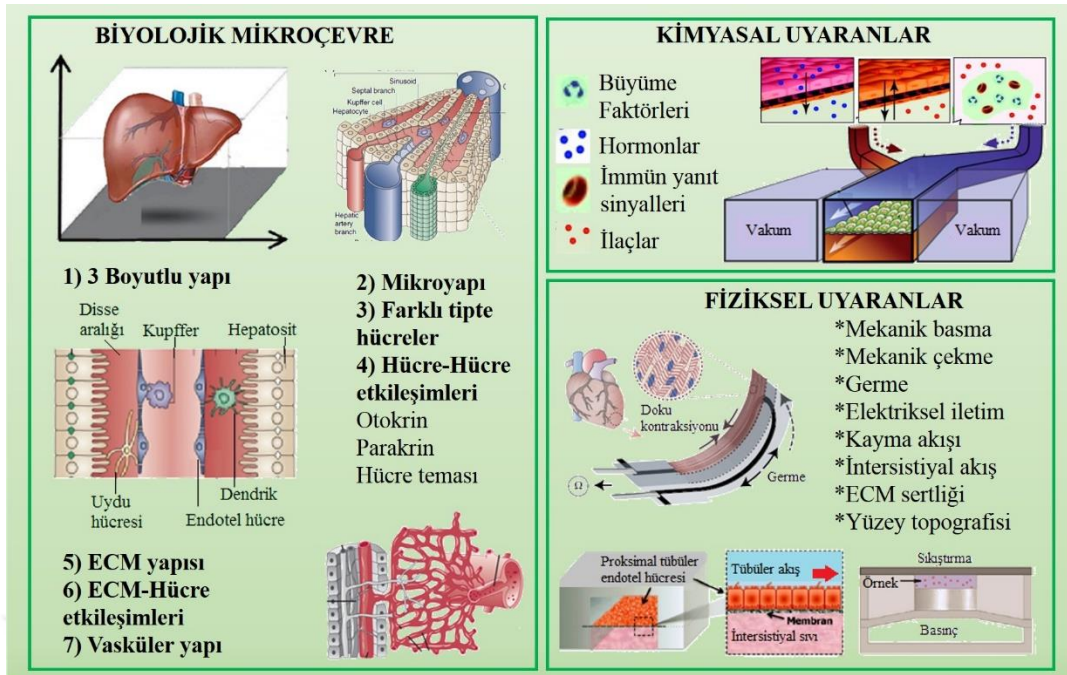
Yeni geliştirilen ilaçlar için klinik öncesinde yapılan testler ilk olarak hayvan ve insan hücrelerinde gerçekleştirilir. Elde edilen bilgiye bağlı olarak hayvan deneylerine geçilir. Sonuçlara göre insan vücudundaki farmakokinetik, farmakodinamik ve toksisiteye dair bir tahmin yapılır. Zenobiyotiklerin insan vücudundaki biyolojik yollar üzerindeki etkilerinin

tahmini, sıçan, fare, köpek veya maymun gibi hayvanlardaki biyolojik yollar hakkındaki bilgilere dayanmaktadır. Hayvan modelleri özellikle sistemik yanıtların ölçülmesine izin verdiği için avantajlıdır. Fakat ilaca bağlı karaciğer rahatsızlıklarının birçok çeşidi insan spesifik metabolizmasından üretilen reaktif metabolitlerden kaynaklanır ve bu metabolitlerin hayvan modellerinde ölçülmesi mümkün değildir. Klinik öncesi hayvan denemeleri ile insan denemeleri arasındaki farklılıklar sonucu oluşan başarısızlıklar son dönem klinik denemelerde ya da ilaç markette dağıtıldıktan sonra ortaya çıkar ve bu dönemlerde karşılaşılan başarısızlıklar daha fazla zaman ve maliyet kaybı ile sonuçlanır [56]. Ayrıca deneyde kullanılacak hayvanların bakımı; yüksek maliyet gerektiren, iş gücü yoğun bir süreçtir. Etik problemler ve yasal kısıtlamalar, deney hayvanı kullanımının bir diğer dezavantajıdır [5].

2.3.4. Çip-üstü-Organ Sistemleri

Mevcut hücre kültürü ve hayvan çalışmalarının sınırlamaları, canlı organların kompleks yapılarını ve işlevlerini daha iyi taklit eden alternatif hücre bazlı modeller olan organ (*organ-on-chip*) ve insan çip (*human-on-chip*) sistemlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. İlk olarak yüksek düzeyde yapılandırılmış 2B ve 3B hücre kültürü iskeleleri içinde hücre şekli, pozisyonu, işlevi ve doku organizasyonu hassas bir şekilde kontrol edilebilen mikroçiplerin üretimi için mikrofabrikasyon teknikleri geliştirilmiştir. Sonrasında mikrofabrikasyon yöntemleri ile üretilen substratların mikroakışkan teknolojiler ile entegrasyonu dinamik akış ve basınçların mikrometre ölçeğinde hassas kontrolünü sağlarken aynı zamanda hücrelere organa ait kimyasal gradyanları ve dinamik mekanik uyarıları içeren hücre mikroçevrelerinin oluşturulmasını mümkün kılmıştır [57]. Organ çipleri çeşitli biyolojik işlemlerin geleneksel 2B veya 3B hücre kültür sistemleri, hatta hayvan modelleri ile kullanımı mümkün olmayan durumlarda bile yapılmasına izin verir.

Organ çipi; mühendislik tasarım ilkeleri ve üretim yaklaşımları kullanarak organların fonksiyonel temel birimlerini yapısal ve fonksiyonel olarak taklit eden 3B mikroakışkan hücre kültür sistemleridir [57, 58]. Bu sistemler, bütün bir organ yerine onun fizyolojik fonksiyonlarını yerine getiren en küçük birimini yani ‘fonksiyonel üniteyi’ model olarak alır [5]. Çipler; fonksiyonel ünite, çipin dizayn ve üretim sistemine bağlı olarak fiziksel, kimyasal ve elektriksel uyarıları da yapısında barındırarak doku ve organların gerçek fizyolojik fonksiyonlarını sağlar [5].



Şekil 2.5. Çip-üstü-organ sistemlerinin özellikleri [6, 58-62].

Hücrelerin canlılığını devam ettirebilmek için ihtiyaç duyduğu oksijen ve besin maddelerinin ve test edilecek kimyasalların hücrelere iletilmesi ve atıkların hücrelerden uzaklaştırılması vücuttaki vasküler sisteme benzer şekilde yapılandırılmış çip kanallarından besin ortamının perfüzyonu ile sağlanır [6]. Şekil 2.5'te özetlenen biyolojik, kimyasal ve fiziksel faktörleri yapılarında bulundurarak insana spesifik güvenilir yanıtlar elde edilir. Mikroakışkan sistemlerinin, akışkan içindeki kimyasal ve biyokimyasal maddelerin ve dokunun canlılığı için gerekli parametrelerin izlenmesine imkân tanınması, düşük örnek hacmi gerektirmesi, kısa sürede cevap alınması, paralel ölçüm yapılabilmesi ve kontrol edilebilirlik gibi önemli avantajları vardır. Hayvan modellerine göre üretimi kolay ve ucuz sistemlerdir. Örneğin CN Bio's şirketi geliştirdiği karaciğer çipi ile 22,000 \$ ücret karşılığında toksisite testi yaparken sıçan kullanarak yapılan toksisite testinin maliyeti 50,000\$'dan başlamaktadır [18].

Organ çiplerine yönelik ilk çalışma Ingber ve ark. tarafından 2000'li yıllarda akciğer çipi geliştirmeye yönelik olmuştur [2]. Günümüzde “çip-üstü-arter (artery-on-a-chip)”, “çip-üstü-beyin (brain-on-a-chip)”, “çip-üstü-kalp (heart-on-a-chip)”, “çip-üstü-böbrek (kidney-on-a-chip)”, “çip-üstü-karaciğer (liver-on-a-chip)”, “çip-üstü-akciğer (lung-on-a-chip)” ve “çip-üstü-insan (human-on-a-chip)” olmak üzere pek çok farklı insan dokusu için çip-üstü-organ çalışmaları yapılmaktadır. İlaç geliştirme ve toksisite açısından kritik öneme sahip olan karaciğer çipleri üzerine yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Günümüzde farklı gruplarca geliştirilmiş karaciğer çipleri bulunmaktadır. Bu çipler doku odası dizaynı, hücre çeşidi ve sayısı bakımından farklılık göstermektedir.

Hidrojele enkapsüle edilmiş hücrelerden; 3 boyutta doku oluşumu başarıyla geliştirilse de bu yapıların insan fizyolojisine daha benzer yapısal ve mekanik özelliklerde yapıların oluşturulması organ çipleri ile mümkün olmaktadır. Organ çipi sistemleri i) doku doku arayüzlerinin oluşturulması ii) fiziksel uyarıların ve iii) kimyasal gradyanların oluşturulması bakımından mevcut ilaç tarama ve toksisite testlerinde avantaj sağlar [6, 57].

Doku doku arayüzlerinin oluşturulması

Mikro ölçekte hücre kültürü sistemlerine yönelik erken çalışmalar, hücre şekline, pozisyona, büyümeye ve farklı dokuya özgü fonksiyonların ekspresyonunu kontrol etmek için kontrollü mikro ortamlar sağlayan mikrofabrikasyon yöntemleri ile oluşturulmuş substratlara odaklanmıştır. Geçtiğimiz on yıl boyunca, yumuşak litografi tabanlı mikrofabrike ve

mikroakışkanlarla ilgili gelişmeler, canlı doku ve organların karmaşık 3B mikro mimarisini oluşturan daha ileri hücre kültürü ortamları geliştirmeyi mümkün kılmıştır [57].

Nakao ve ark. karaciğer sinüzoidini oluşturan endotelyal epitelyal arayüzün yapısal karmaşıklığını taklit eden çip geliştirmiştir. Bu doku ara yüzünün geometrisi, karaciğerin kan akış hızına yaklaşmak ve hepatositleri endotelyum kaplı sinüzoidal bariyer boyunca sıralamak için tasarlanmıştır. Bu doku-doku ara yüzünün mikromimarisini yeniden yapılandırmak, hepatositleri hepatik tabaka benzeri yapılara kendi kendine organize etmek için ve canlı endotelyum olmasa bile fonksiyonel safra kanallarını oluşturmak için yeterli olmuştur [63].

Bir başka çalışmada Jang ve ark. böbrek taşıma bariyeri fonksiyonlarının analizi için basitleştirilmiş bir böbrek modeli geliştirmiştir. Model iki PDMS odasının, ince bir gözenekli membran kullanılarak ayrılması ve daha sonra, membranın üst yüzeyi üzerinde sıçan renal tübüler epitelyal hücrelerin kültürlenmesiyle oluşturulmuştur. Cihazda fizyolojik düzeyde akış altındaki böbrek hücrelerinin kültürü büyük ölçüde doku polarizasyonu ve tamamen farklılaşmış ve polarize böbrek epitelyumunun oluşumunu sağlamıştır [64].

Hücre hücre ara yüzlerinin oluşturulması hücre polaritesinin oluşturulmasını ve buna bağlı hücrenin farklılaşmış spesifik fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlamıştır. Hücre polarizasyonu, hücre büyümesi ve bölünmesi, migrasyon, farklılaşma, uyarıların iletilmesi veya bağışıklık yanıtının gelişimi gibi spesifik görevleri yerine getirmek için özel sitoplazmik ve membranla ilgili bölgeleri bulundurması ve bu asimetriyi sürdürmesi için birçok hücre tipinin temel bir özelliğidir [65]. Epitelyal hücrelerin çoğu, göç eden ve gelişen hücre işlevleri için bir hücre polaritesi gerektirir. Bu hücreler çevreleriyle ilgili hücre dışı biyokimyasal ve mekanik uyarılardan bilgi alır ve bu bilgileri plazma membranının polaritesine, ilişkili proteinlerine ve hücre iskeletine aktarır [66]. Bu nedenle, mekanobiyoloji, hücre polaritesinin kurulması ve sürdürülmesinde önemli bir düzenleyici rol oynar.

Kimyasallar, besinler, hormonlar, metabolitler, sitokinler ve fiziksel sinyaller, normal olarak vücudumuzdaki organlardaki bitişik canlı dokular (örn., Epitelyum / mezenşim, parankimal hücreler/endotelyum) arasındaki ara yüzler üzerinden aktarılır [57]. Bu temel yapısal ilişkileri yeniden oluşturmak ve bu süreçlerin olarak çalışmasına izin vermek için Huh ve ark alveolar-kapiler ara yüzünü modellemiştir. İnsan alveolar-kapiler ara yüzün; bir merkezi mikroakışkan kanal ve iki içi boş yan oda içeren esnek bir PDMS cihazının mikro imalatı ile

oluşturmuştur. ECM ile kaplanmış ve gözenekleri (10 mm aralıklı 10 mm aralıklı) içeren ince (10 mm) PDMS membranı, ana mikrokana1ın merkezi boyunca yatay olarak gerilmiştir. İnsan alveolar epitelyal hücreleri gözenekli zarın bir tarafında, insan akciğer kapiler endotel hücreleri aynı zarın karşı tarafında konumlandırılmıştır. İnsan alveolar epitelyal hücrelerinin bulunduğu kanaldan hava; akciğer kapiler endotel hücrelerinin bulunduğu kanaldan ise besin ortam akışı gerçekleştirilmiştir [67].

Fiziksel mikroçevrenin oluşturulması

Mikroakışkanlar, tanımlanmış kimyasal gradyanlar oluşturmak için uzun yıllardan beri kullanılmakta iken, son zamanlarda hücrelerin ve dokuların organlarda var olan fiziksel mikroçevresini taklit etmek için de kullanılmıştır. Bu sistemler, ilgili organa ait fizyolojik akışkan kayma gerilmesi, döngüsel gerilme, mekanik sıkıştırma veya çekme olmak üzere fiziksel kuvvetleri ve elektriksel uyarıları yapılarında bulundurarak dokuya farklılaşmış fonksiyonların ilaçlara geliştirilen immün yanıt da dahil olmak üzere tüm cevapların analizine olanak sağlar [5] (Şekil 2.5).

Huh ve ark. geliştirdikleri akciğer çipinde alveolar-kapiller ara yüzün yeniden oluşturulmasına ek olarak hücrelerin fizyolojik olarak ilgili mekanik kuvvetlere maruz bırakılabileceğı şekilde tasarlamıştır. Akciğer hava keselerindeki alveolar epitelyal hücreler ile aynı bazal membranın zıt tarafındaki pulmoner kapiler endotelial hücreler PDMS membranın iki yüzüne ekilmiştir. İki farklı bölüme ayrılan çip kanal boyunca sürekli olarak kültür ortamı ve havanın fizyolojik bir akışına maruz bırakılmıştır. Kayma gerilimi ve yan bölmelere uygulanan aralıklı vakum sonucu sadece doku farklılaşmasını indüklemekle kalmamış daha önce modellenmiş akciğer sistemlerinde görülmemiş karmaşık akciğer işlevlerinin yerine getirdiğı görülmüştür. Fizyolojik solunumun, akciğer çipi tarafından tahmin edilen alveolar-kılcal bariyer boyunca nanoparçacık soğurması üzerindeki etkileri, bir fare *ex vivo* akciğer ventilasyonu-perfüzyon modelinde doğrulanmıştır. Böylelikle, bu basit cihaz sadece organ düzeyindeki işlevleri taklit etmekle kalmayıp, aynı zamanda insanla ilgili bir modelde daha önce bilinmeyen fizyolojik organ düzeyindeki tepkilerin keşfine yol açmıştır [67].

Jang ve ark. böbrek modelinde, normal seviyelerde sıvı kayma gerilmesinin morfolojik polarizasyonu tetiklemesinin yanı sıra epitelyumun, normal olarak sadece vücut içindeki böbreklerde görülen, vazopressin ve aldosteron ile hormonal uyarmaya yanıt olarak su ve sodyumun daha fazla taşınması gibi taşıma fonksiyonlarını uyarmıştır. Bu hücrelerin apikal

yüzeyine sıvı kayma gerilmesinin fizyolojik düzeylerde uygulanması ayrıca, aktin hücre iskeletinin yeniden organize edilmesini ve ilaç taranması ve böbrek fizyolojisi çalışmalarında faydalı olabilecek su taşıma proteininin (aquaporin-2) taşınım görevini tetiklemiştir [68].

Mekanik uyarılara ek olarak, modellenmek istenen organa spesifik elektriksel uyarımı sağlamak ve spesifik hücresel tepkileri incelemek için mikrosistem yaklaşımları kullanılmaktadır. Örneğin, Grosberg ve ark. neonatal sıçan ventriküler kardiyomiyositleri, düzlemsel olarak düzenlenmiş, iki boyutlu miyojenezi desteklemek için ECM proteinleri ile mikrodeselelenmiş ve oluşturulmuş bu kontraktıl dokulara elektriksel stimölasyon uygulamak için ince esnek PDMS filmleri üzerinde költüre etmiştir. Bu kalp dokusu yapıları elektriksel açıdan işlevsel ve mekanik olarak aktif olup, tam kas tarafından üretilen kontraktıl stresler ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Geliştirilen kalp çipi, kalp kası kasılmasının doğrudan izlenmesini ve aksiyon potansiyel yayılımı ile birlikte ölçölmesini sağlar. Cihaz ilaç etkinliğini ve kardiyotoksisiteyi belirlemek için farmakolojik uyarıma olan yanıtları ve kalp kasılma fonksiyonu üzerindeki etkileri ölçmek için iyi bir platform sağlar [69].

Kimyasal mikroçevrenin oluşturulması

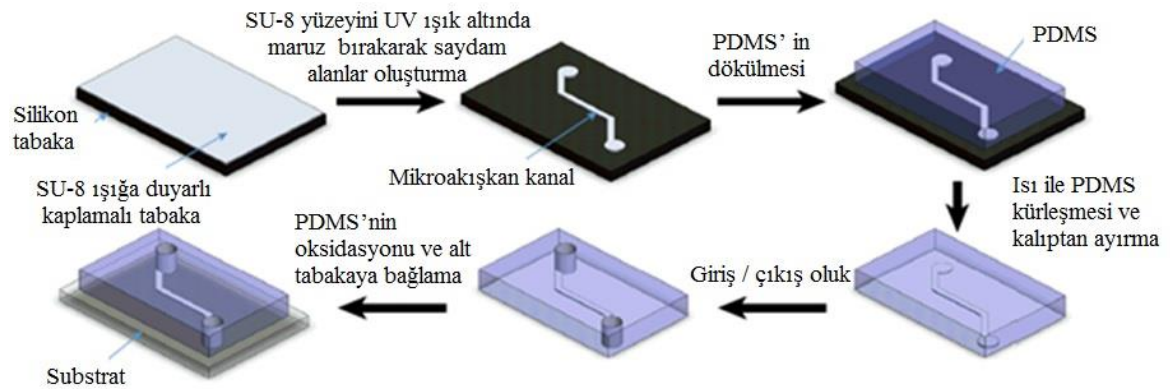
Biyomimetik mikromühendislik yaklaşımları organların karmaşık biyokimyasal mikro çevresini taklit etmek için de kullanılabilir. Allen ve ark. mikroakışkan perfüzyon biyoreaktörü, hepatosit formundaki fizyolojik varyasyonları taklit etmek ve karaciğerdeki zonasyon olarak bilinen ve oksijenasyonda bölgesel değışikliklere bağı olduğu düşünölen karaciğer sinüzoidleri boyunca işlev görmek üzere tasarlanmıştır. Fibroblastlar ile hepatositler biyoreaktörde oksijen grandyanları oluşturmak üzere birlikte költür edilmiştir. Bu mikroçip, oksijen karaciğer mikromimarisinin bölgesel heterojenliğini ve *in vivo* olarak görölen ilaca bağı zonal hepatotoksisiteyi etkili bir şekilde sağlamıştır [70].

2.3.4.1. Organ Çiplerinin Mikrofabrikasyonu

Doku mühendisliği çalışmalarına mikroteknoloji uygulamaları i) organ fizyolojisinin, organın işlevselliğini arttırmak için benzeri bir mikro ortam altında simöle edilmesini; ii) doku mühendisliğinde en kritik nokta olan doğal mimariyi taklit etmek için uygun kompleks mikro ölçekli ultra-yapılar oluşturulmasını; ve iii) çeşitli tedavi yöntemlerinin ve toksik malzemelerin taranması için hızlı, kolay ve yüksek verimliliğı sağlar [71]. Organ çipi uygulamalarında tekrarlı kalıplama (replica molding), yumuşak litografi (soft lithography) ve mikrotemas baskılama (microcontact printing) gibi çok farklı mikrofabrikasyon

yöntemleri kullanılır [72]. Bugüne kadar, organ çipi uygulamalarında en çok kullanılan mikrofabrikasyon teknolojisi, yumuşak litografidir (Şekil 2.6). Yumuşak litografinin ana avantajları, imalat sırasında düşük maliyet ve uygunluk, mikro ölçekte deformasyon, yapının kolay kontrolü ve çok farklı biyomalzeme ile çalışma imkanı tanınmasıdır [38].

Poliüretan (PU), poliimid, silikon kauçuk ve poli (dimetilsiloksan) (PDMS) yumuşak litografide kullanılan materyallerdir [6, 38]. PDMS sahip olduğu üstün özelliklerinden dolayı hücre ve doku kültürü çalışmaları için mikro-cihazların üretiminde en çok kullanılan materyaldir. PDMS'nin gaz geçirgenliği, hücrelerin veya dokuların canlılığını devam ettirmesi için oksijenin çip içine nüfuz etmesine izin verir. PDMS elastik (Young modülü 750kPa) bir malzemedir ve bu da onu mikrodinamik gerilmeyi üretmeye uygun hale getirir. PDMS 240–1100 nm dalga boyu aralığındaki ışınları geçirir. Uzun dalgalı UV'den kızılötesi radyasyona (IR) kadar dalga boyuna sahip ışınlar PDMS'den geçebildiğinden dolayı için çeşitli mikroskop sistemleri ile yüksek kaliteli görüntülerin alınmasına izin verir [38]. PDMS; mikro cihaz imalatı için hızlı, basit ve düşük maliyetli bir çözüm olarak tercih edilmektedir [73].



Şekil 2.6. Yumuşak litografi yöntemi ile PDMS çip üretimi [66].

2.3.4.2. Mikroakışkan Teknolojiler

Organ çipi sistemlerinin temelini oluşturan bir başka teknoloji mikroakışkan teknolojisidir. Mikro ve nano hacimlerdeki sıvılarla mikrometrik kanallarda mühendislik çalışmalarının gerçekleştirilmesi “mikroakışkan teknolojisi” olarak tanımlanmaktadır [74].

Akışkan davranışları; boyutları küçüldükçe değişmekte ve farklı fiziksel yapılar gözlemlenebilmektedir. Kütle çekimi gibi uzaysal/hacimsel kuvvetlerin etkileri azalır; buna karşın yüzey gerilimi (sıvı yüzeyinin kuvvete karşı gösterdiği direnç) ve kılcallık (sıvının kanal yüzeyiyle olan daha güçlü etkileşimi) gibi yüzeysel kuvvetlerin önemi artar [75].

Mikroakışkan sistemlerde kanalın küçük boyutlarından dolayı akışkan akışı tamamen laminar (çizgisel akış) olup, aynı kanal içinde akan komşu akışlar arasında neredeyse hiç karışma olmaz. Bu özellik, tek bir hücrenin çapı boyunca mikrometre ölçeğinde ani adım gradyanları oluşturmaya imkan tanır. Oluşturulan kimyasal gradyanlar, ile kemotaktik uyarılara karşı ortaya çıkan hücre hareketliliği, kök hücre farklılaşması, biyokimyasal sinyalizasyonun hücre altı yayılımı ve embriyo gelişimi gibi daha karmaşık hücre davranışları analiz edilir [5, 6].

Mikroakışkan çipler; çevresel ve işletim özelliklerinin (pH, sıcaklık, basınç, atık uzaklaştırılması ve besin kaynağı) iyi kontrol edildiği koşullar altında biyolojik ve/veya biyokimyasal işlemlerin gerçekleştirildiği biyoreaktörlerdir [50]. Doku mühendisliği çalışmalarında perfüzyon biyoreaktörlerin diğer bir kullanım amacı ise insan vücudunun içindeki doku sıvısının fizyolojik akışını oluşturmaktır. Böylece hücrelerin ihtiyaç duyduğu besin maddeleri ve çözünebilir faktörler bu akış ile hücrelere ulaştırılırken metabolik atıklar yine akış ile uzaklaştırılır [58]. Besinlerin ve gazların kütle aktarımı konveksiyon ve difüzyon mekanizmaları ile gerçekleşir [76].

Fizyolojik akış; canlılık, farklılaşma ve işlevsellik gibi hücrelerin davranışını doğrudan etkilemektedir. Akış hızı hücrelere yeterince oksijen ve diğer bileşenlerin taşınımına imkan tanımalıdır. Yüksek akış hızı hücrelere yeterince besin ve oksijenin ulaşmasına engel olurken düşük akış hızı ortamda metabolik atıkların birikimine ve ortam pH değişimine sebep olur. Ayrıca akışa bağlı kayma gerilimi fizyolojik düzeyde uygulandığında hepatosit ve böbrek gibi epitelyal hücrelerin dokuya farklılaşmış işlevselliği arttırırken yüksek kayma gerilimleri hücrede canlılık kaybına sebep olur. Mikroakışkanın kayma gerilimi akış hızı ve kanal boyutlarına bağlı olarak değişir. Bu sebeple akış-mekanik hesaplama modelleri ile mikrokanal geometrisi ve akış hızını optimize etmek ve oksijen ve besin iletimini arttırmak, böylece hücre canlılığı ve fonksiyonunu arttırmak mümkündür [77].

2.3.4.3. Çip-üstü-Karaciğer

Yeni ilaçlara artan ihtiyaçlar, bu ilaçların taramasına ve toksisitesine yönelik farklı karaciğer modellerinin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Emilim, metabolizma, dağılım ve boşaltım (ADME) ve toksisite için yapılan *in vitro* testlerin kullanılabilirliği sürekli olarak artsa da geleneksel *in vitro* modeller, insanlarda toksisiteyi tahmin etmek için hayvan modellerinin yerini alacak kadar güçlü olmamıştır. Bu modeller genel olarak, insan ADME ve toksisitesi için dokunun yeterli işlevsellik ve öngörülebilirlik özelliklerinden yoksundurlar.

Çizelge 2.2. Çip üstü karaciğer sistemlerinin sahip olması gereken özellikler [42]

Yapısal Özellikler	
Farklı tipte hücreler	Karaciğerin parankimal ve parankimal olmayan hücreleri, sayısız hepatik fonksiyonları, heterojen kompozisyonu ve hücre hücre etkileşimlerini gerçekleştirir.
3 boyutlu yapı	Hücre 3B yapısı; <i>in vivo</i> organizasyonu ve işlevselliği daha iyi taklit eder.
Akış	Akış, hücrelerin canlılığını devam ettirmesi için gerekli besin ve gazların hücrelere ulaştırılmasını sağlar. Tek geçiş modunda atık ürünleri giderir ve <i>in vivo</i> benzeri konsantrasyon profillerine izin verir. Aynı zamanda hepatositlerin ve endotel hücrelerin polaritesini ve <i>in vitro</i> işlevlerini artırır.
Hücre kaynağı	İnsana özgü yanıtların ölçülebilmesi için insan hücreleri daha uygundur.
Biyosensörlerin sisteme entegrasyonu	Biyosensörlerin entegrasyonu, ilaç toksisitesinde yer alan hücre içi ve hücre dışı olayların hassas bir şekilde izlenmesini sağlar.
Fizyolojik sıvının dokuya oranı	Fizyolojik sıvı-doku oranı, hücreler ve ortam arasında fizyolojik konsantrasyon gradyanlarının kurulmasına yardımcı olur.
Fonksiyonel özellikler	
İlaç metabolizma aktiviteleri	Karaciğerdeki <i>in vivo</i> benzer metabolik aktivite seviyeleri güvenilir bir toksisite tahmini için çok önemlidir.
Taşıyıcıların ifadesi	Taşıyıcıların <i>in vivo</i> olarak benzer düzeylerde ve lokalizasyonda ekspresyonu, gerçek ilaç maruziyetinin güvenilir bir tahmini için çok önemlidir.
Karaciğer zonlanması	Karaciğer zonu, karaciğerde toksisite için birincil hedef bölgeleri belirlemek ve ilaçların zehirlenmesi ve detoksifikasyonu arasındaki dengeyi yansıtmak için önemlidir.
Uzun dönem canlılık	Uzun süreli ilaç maruziyeti gerektiren durumlar için önemlidir.
İlaç toksisite test uygulama özellikleri	
Yüksek duyarlılık	Sistemler tüm potansiyel toksik adayları tanımlayabilmelidir.
Yüksek spesifiklik	Sistemler yanlış pozitif sonuç vermemelidir.
Kolay kullanım	Rutin bir ilaç testinde kullanılmak için uygun maliyetli ve uzmanlık gerektirmeyen sistemler olmalıdır.
Yüksek verim	Birden çok ilaç adayının hızlı analizine izin vermelidir.

Doku mühendisliği, mikroakışkan ve mikroüretim tekniklerinin gelişmesi ile gündeme gelen “çip-üstü-karaciğer” sistemleri daha fizyolojik modellerin oluşturulmasını sağlamıştır. Bu sistemler Çizelge 2.2'de özetlenen ve genel olarak karaciğer fonksiyonlarını, özellikle biyotransformasyon, taşıyım ve toksik yanıtların mümkün olduğunca *in vivo* özellikleri yansıtacak niteliklere sahip olmalıdırlar [42].

Karaciğer doku modellerinin en temel özelliği, hepatosit işlevselliğini sürdürmek için homojen ve heterojen hücre-hücre etkileşimlerini ve hücresel matris desteğini sağlamak üzere, karaciğerin fonksiyonel birimlerinin (yani lobüller) morfolojisini simüle etmektir [78]. Kompleks çoklu hücre-hücre etkileşimleri, düzlemsel yapısı ve mekanik mikroçevresinden dolayı *in vivo* karaciğer sinüzoidini taklit etmek zordur. Fakat mikroüretim yöntemleri ile karaciğer mimarisi yeniden üretilebilmiş ve entegre mikroakışkan teknolojileri ile karaciğerin dinamik mikroçevresi oluşturulmuştur.

Mikrofabrikasyon teknolojileri ile hedeflenen konfigürasyonda geliştirilen mikroakışkan cihazlar hücrelerin işlevini arttırmıştır. Lee ve ark. mikrofabrikasyon teknikleri ile oluşturdukları endotelial benzeri bariyerler içeren sinüzoid konfigürasyonda karaciğer modelini geliştirmiştir (Şekil 2.7.D). Mikroakışkan sistem primer sıçan hepatositlerinin hepatik tabaka benzeri yapılara hizalanmasında yardımcı olmuştur. Hepatositler membran polaritesini yeniden kazanmış ve çipin tasarımı sayesinde safra kanalı oluşturmuştur. Ayrıca sinüzoidal endotelial hücreler, kan ve plazmanın hepatositlere taşınmasını kolaylaştırır. Besin maddesinin kütle transferi endotelial bariyeri oluşturan ince (1-2 mm kalınlığında) kanallardan hepatositlere doğru gerçekleşmiştir. Bu yapay sinüzoidlerde, hepatositler, canlılığını kaybetmeden 7 gün boyunca muhafaza edilmiştir. Hepatositlerin ve vasküler elemanların kompartmanizasyonu, sadece sinüzoid içindeki nakil işlemlerini taklit etmekle kalmamış, aynı zamanda hepatositleri zarar verdiği bilinen yüksek kayma gerilimlerinden korumuştur [79].

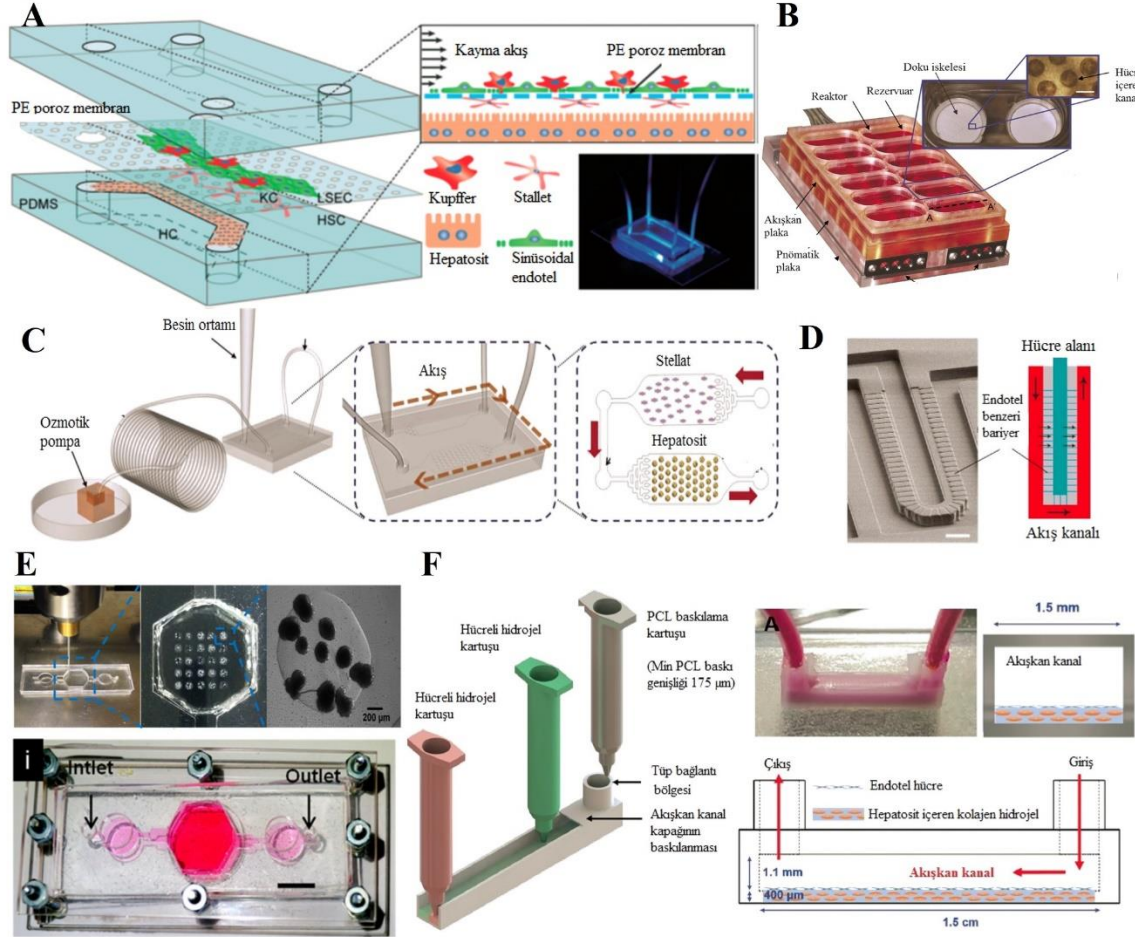
Nonparankimal karaciğer hücreleri (karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri, Kupffer hücreleri, hepatik satelit hücreleri) ile primer hepatositlerin kokültürü, hücresel ve metabolik fonksiyonlarını geliştirerek *in vivo* fizyolojilerini daha iyi modeller. Du ve ark. primer fare nonparankimal karaciğer hücreleri ve hepatositlerini, gözenekli geçirgen bir membranla ayrılmış iki bitişik mikroakışkan kanalına entegre ederek, karaciğerin fonksiyonel ünitesinin yapısını ve konfigürasyonunu taklit eden bir *in vitro* karaciğer sinüzoid çip geliştirmiştir (Şekil 2.7.D). Her hücre tipi, spesifik işaretçileri ile işaretlendikten sonra görüntülendiğinde karaciğere özgü benzersiz bir fenestrasyon morfolojisi elde edildiği rapor edilmiştir. Kayma

akışı ve kokültür albümin sekresyonunu geliştirirken, sadece kayma akışı hepatosit büyüme faktörü (HGF) üretimini ve CYP450 metabolizmasını artırır. Lipopolisakkarid stimülasyonları altında hepatik hücre kokültürü, karaciğer çipinde nötrofil alımını kolaylaştırmıştır. Bu 3B yapılandırılmış *in vitro* karaciğer çipi, karaciğerin yapısındaki iki temel faktör olan kayma akışı ve dört ana karaciğer hücresi tipini bütünleştirerek hepatik fonksiyonları ve birincil bağışık yanıtlarını yeniden oluşturur [80].

Karaciğerin işlevsel biriminin, ünitedeki pozisyonlara bağlı olarak farklı bir protein kümesi ifade ettiği ve karaciğer dokusunda mevcut olan oksijen konsantrasyonu gradyanı ile ilişkili olabileceği tahmin edilmiş ve oksijen gradyanının yeniden üretilmesi, karaciğer heterojenitesi ile tutarlı olarak P450 enzim aktivitesinin heterojen dağılımına yol açmıştır [81]. Domansky ve ark. karaciğer sinüzoidlerinin yapısını iskeleler ile desteklediği her biri birbiri ile entegre 12 otonom mikroakışkan sistemden oluşan çok gözlü plaka tasarlamışlardır (Şekil 2.7.B). İskelelere fizyolojik doku yoğunluğuna yakın hepatosit, Kupffer, hepatosit satelit ve karaciğer sinüsoidal endotel hücreleri ekilerek sürekli perfüzyon altında kültüre edilmiştir. İskele büyük kanalları dinamik koşullarda iki hücre tipinin kendi kendine organizasyonunu desteklemiş ve hepatositlerin fonksiyonel olarak zonlanması sağlanmıştır [82].

Karaciğer, gelişmiş mikroçevresinde çoklu hücre-hücre etkileşimlerine sahip eşsiz bir organdır. Hücre etkileşimlerinin etkisini araştırmak için Wong ve ark. primer hepatositlerin monokültürü ve primer hepatositlerin, hepatik satelit hücreleri ile birlikte kokültürünün yapıldığı sferoidal “hepatosfer” ve “heterosfer” modelleri geliştirmiştir. HSH'lerin etkisinin sıkı hücre-hücre temaslarının oluşumu, sferoidal yapının organizasyonu ve kontrolünde hem nicel hem de nitel olarak hayati önem taşıdığı gösterilmiştir. Metabolik fonksiyon analizi, heterosferlerin %30 daha fazla albümin salgıladığını ve kültürün 8. ve 9. günlerinde hepatosferlerden daha fazla CYP450 enzimatik aktivite ürettiğini göstermiştir [83]. Lee ve ark. hepatositler üzerinde hepatik satelit hücrelerinin (hepatic stellate cell, HSC) parakrin etkilerini araştırmak için, primer hepatosit sferoidleri ile doğrudan hücre-hücre teması olmayan primer HSC'leri içeren bir 3B çip üstü karaciğer modeli geliştirmiştir (Şekil 2.7.C). Farklı çiplerde kültüre edilen hepatosit ve HSCler birbirine bağlanarak kültüre edildiğinde albümin sekresyonundaki ve CYP450 aktivitesindeki artışın otokrin etkilerin yanı sıra parakrin etkileri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. HSC hepatik satelit hücrelerinin varlığı metabolik fonksiyonları geliştirirken küresel yapının sürekliliğini de sağlamıştır [84].

Başarılı bir doku mühendisliği üretim yöntemi olan biyobaskı yöntemi çip-üstü-organ sistemlerinin üretiminde kullanılmaya başlanmıştır. Bhise ve ark. ekstrüzyon biyoyazıcı kullanarak hepatik sferoidler içeren metakrilatlatmış jelatini (GelMA) önceden üretilmiş PDMS odalarına baskılayarak çip üstü karaciğer modeli geliştirmişlerdir (Şekil 2.7.E).



Şekil 2.7. Çip üstü karaciğer modelleri A)[80] B)[82] C)[84] D)[79] E)[3] F)[85].

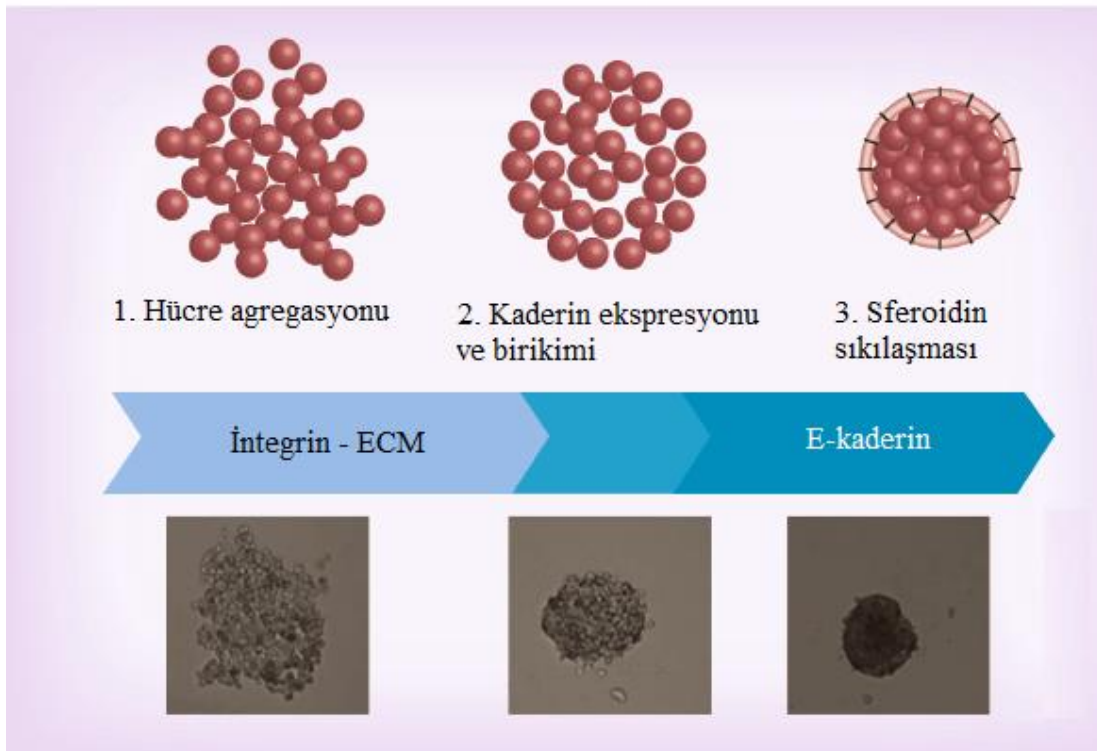
Mikrofabrike organ sistemlerinin hepatosit fonksiyonlarını geliştirebildiği ve iyileştirilmiş karaciğer fonksiyonlarının, ilaç metabolik profilini daha doğru bir tahmin edebildiği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, yeni uygulamaya konulan sistemlerin, bir ilaç geliştirme sürecine uygulanmadan önce *in vivo* hepatik klerans verilerine karşı doğrulanması gerekir [78]. *In vitro* metabolizma analizleri kullanılarak *in vivo* hepatik kleransının tahmin edilmesi, yarı ömrünü, biyoyararlanımını, dozu ve dozlama rejimlerini belirlemek için ilaç geliştirmenin bir parçasıdır. Özellikle zor olan, ilaç geliştirmede giderek daha önemli hale gelen düşük klerans bileşiklerdir. İnsan karaciğer mikrozomları ve insan hepatositlerinin süspansiyon kültürü gibi mevcut altın standart modelleri, genellikle insan klirensi, yarı ömür ve dozun öngörülmesinde belirsizliğe yol açar. 3B organotipik hepatik kültürlerin uzun

sürekli metabolik yeterliliğinin artması nedeniyle, bu modeller özellikle düşük klerans bileşiklerin metabolik profilini belirlemek için ilaç metabolizmasında ve farmakokinetik çalışmalarda umut vericidir [86].

2.4. Damarlı Karaciğer Modelinin Geliştirilmesi

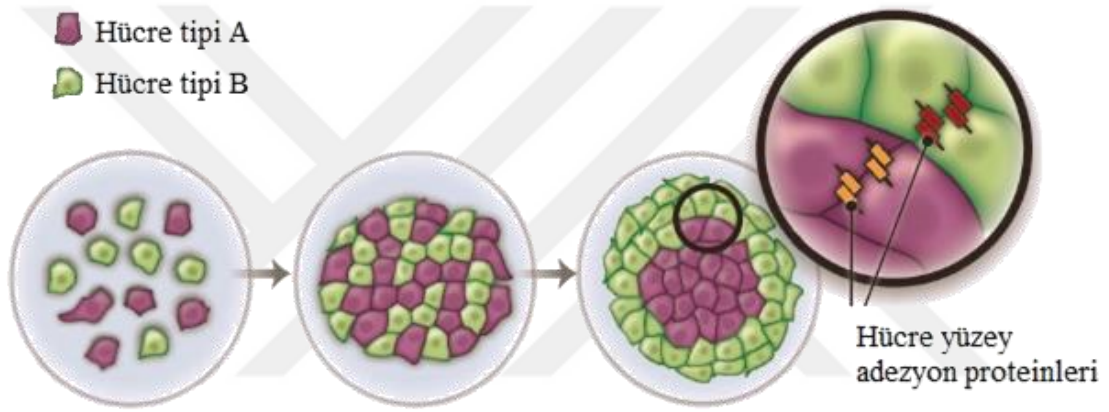
2.4.1. Sferoidlerin Geliştirilmesi

1830'ların sonuna doğru Mathias Jacop Schliede ve Theodor Schwann tarafından ortaya atılan hücre kuramı; hücreleri canlı sistemlerin örgütlenmesindeki biyolojik aktivite gösteren en küçük yapısal birim olarak tanımlar. Farklı yapısal özelliklere ve işlevlere sahip hücreler bir araya gelerek farklı dokuları, dokular birleşerek organları, organlar sistemleri, sistemler de organizmayı yani kısaca canlıyı oluştururlar [87]. Doku mühendisliği yaklaşımıyla fonksiyonel doku ve organların üretilmesinde başlangıç noktası hücrelerdir [88]. Sferoid oluşumu, hücrelerin integrinler aracılığıyla küresel formda agregasyonu ile başlar daha sonra E-kaderin aracılığı ile yapı sıkılaşıp 3B formunu kazanır. Agregasyon ile sıkışma fazı arasında transmembran proteini olan E-kaderinin ekspresyonu için gecikme fazı yaşanır [89] (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Sferoid oluşum basamakları [89].

Fonksiyonel doku ve organ üretimi doku mühendisliği haricinde sadece doğal embriyonik gelişim sürecinde gerçekleşmektedir. Embriyonik dönemdeki morfolojik yapı kendiliğinden düzenleme özelliğinden gelişmektedir. “Kendiliğinden düzenlenme” kompleks biyolojik yapının gelişiminde ve yaşamın orijininde yatan en temel mekanizmadır. Dış müdahale olmadan bileşenlerin otonom organizasyonuna “kendiliğinden düzenlenme” adı verilir. Bununla ilgili çalışmalar Aron Moscona’nın civciv embriyosunun işlevini yitirmiş organlarından hücrelerin ayrılması ve agregasyonu ile başlamıştır. Dokuların kendiliğinden düzenlenme mekanizmasındaki termodinamik kuralları ortaya koyan Malcolm Steinberg ayırıcı adezyon hipotezi ile hücre sıralanmasındaki akışkan doğasını ve kendiliğinden düzenlenmeyi açıklamıştır [90].



Şekil 2.9. Hücre sıralanma davranışı [91].

Hücre sıralanması; hücresel bölümlerin ve iki farklı doku arasındaki sınırların oluşturulmasını sağlar. Vücudumuzdaki lümen ve kavitelerin oluşumundaki temel mekanizmadır. Farklı doku tiplerinden elde edilen hücrelerin süspansiyonu önce farklılaşır, bir süre sonra aynı tip hücrelerin kendi aralarında kümeleşir, polarize olmaya başlar, yüzeyinin sınır bölgelerinde adezyon moleküllerini eksprese eder ve bu şekilde lümen oluşumu gerçekleşir [92] (Şekil 2.9).

Ayırıcı adezyon hipotezi, sıvılar ile morfogenetik süreçte hareketli ve adeziv hücreler arasında analogi kurar. Birbiri ile homojen karışmayan iki sıvı (yağ-su) bir müddet sonra yüzey gerilimine bağlı olarak van der Waals kuvvetlerinin etkisi ile farklı fazlara ayrılır. Dokular içindeki hareketli hücreler, yüzeylerindeki adezyon moleküllerine bağlı olarak metabolik enerji ile sıralanırlar. Hipoteze göre farklı tipteki hücrelerden biri diğeri ile farklı dayanımda bağlantı kurar. Böylece farklı hücreler kendiliğinden sıralanmış olur [93].

2.4.2. Sferoid Üretim Yöntemleri

Hücresel küre yani sferoid üretiminde çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Hücresel küre üretimi için en uygun yöntemin seçiminde dikkat edilmesi gereken hususlar; kullanılacak yöntemin ölçek büyütebilir olmasına, düşük maliyetli olmasına ve kolay olmasına dikkat edilmelidir. En temel yöntemler aşağıda açıklanmış ve Çizelge 2.3’de karşılaştırılmıştır.

a. Asılı Damlacık Yöntemi

İstenilen hücre yoğunluğuna sahip 15-30 μL hücre süspansiyonu Petri kabının kapağına damlatılır ve kapağın ters çevrilmesi ile damlacıklar asılı kalır. Hücreler yerçekiminin etkisi ile damlanın ucunda toplanır ve hücre-hücre bağlantılarının kurulması ile sıvı-hava arayüzeyinde küresel form kazanır. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak istenilen küre çapına uniform olarak ulaşılır. Fakat damlacığın yüzeyde kalabilmesi için sıvı hacminin yüzey gerilimini aşmayacağı maksimum miktar 50 mikrolitredir. Bu durum kullanılacak hücre sayısını ve kültür süresini kısıtlar. Çünkü yöntemin diğer bir kısıtlayıcı unsuru besin ortamının değiştirilememesidir. Bir insan böbreğinin hacmini $100 \times 50 \times 50 \text{ mm}^3$ kabul edersek 6,250,000 tane 200 μm çaplı hücresel küreye ihtiyaç olacaktır. Dolayısıyla, bu yaklaşım yoğun iş gücü, uzun süre ve yüksek maliyet gerektiren bir yöntemdir [94].

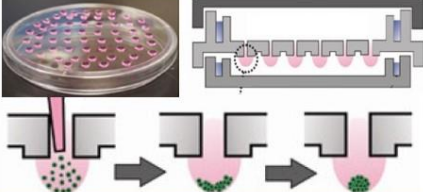
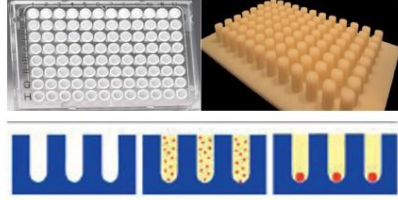
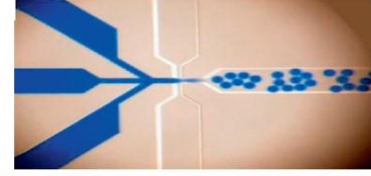
3D Biomatrix firması bu sistemi modifiye etmiştir. Doksanaltı ve 384 göz bulunduran kültür kapları kürelerin istenilen boyutta kolay, hızlı bir şekilde üretimine ve ortam değişimlerine de izin verir. Böylece kullanılacak hücre sayısı ve kültür süresi artırılabilir. Ayrıca hücresel küre üretiminde kullanılan otomatik dağıtıcı ile büyük ölçekte üretim mümkün olmuştur [47, 94, 95].

b. Hücre Tutunmasını Desteklemeyen Yüzeyler

Hücrelerin yüzeye tutunmalarını engelleyecek modifiye kültür kaplarında birbirleri ile bağlantı kurmaya zorlanarak yerçekiminin etkisi ile kültür kabı dibinde küresel form kazanmaları sağlanır [95].

İlk zamanlar polihidroksiletimetakrilat (pHEMA) ve agaroz gibi hücre yapışmasına izin vermeyen hidrojel ile 96 gözlü kültür kapları kaplanarak hücresel küre üretimi yapılmıştır. Yöntem fazladan kaplama basamağı içermesinden dolayı iş gücü yoğundur. Fakat gelişen teknoloji ile birlikte adhesiv olmayan hidrojellerden çoklu gözlü kalıplar üretilmiştir. Agaroz, PEG gibi hidrojellerden üretilen bu kalıplar ile boyutu ve bileşimi belirli sferoid üretimi daha kolay ve hızlı olmuştur. Özellikle üretim yöntemine robotik dağıtıcıların dahil edilmesi ile büyük ölçekte üretim mümkün olmuştur [96].

Çizelge 2.3. Sferoid üretim yöntemlerinin karşılaştırılması [47, 96].

ASILI DAMLACIK	ADHESİV OLMAYAN YÜZEYLER	BİYOREAKTÖRLER	MİKROAKIŞKAN SİSTEMLER
 • Basit • Ucuz • Aynı boyut • İstenilen hücresel kompozisyon ve boyut • Ticari olarak satılan plakalar ile verimlilik artar.	 • Ucuz • Aynı boyut • İstenilen hücresel kompozisyon ve boyut • Ticari olarak satılan kalıplar ile üretim verimliliği artar	 • Kültivasyonu kolay • Büyük ölçekte üretim • Arttırılmış kütle transferine bağlı yüksek metabolik aktivite ve canlılık	 • Üretimi Kolay • Verimliliği yüksek • Aynı boyut ve kompozisyonda üretim
• Sınırlı hücre sayısı ve besin ortamı kullanımı • İş gücü yoğun • Zaman alıcı • Ticari plakalar pahalıdır.	• Ekstradan kaplama basamağı içerir. • İş gücü yoğun • Düşük verimlilik • Ticari kalıplar pahalıdır. • Kalıbın üretilmesi için özel ekipman ve tecrübeli personele ihtiyaç duyulur.	• Hücre sayısının, boyutunun ve kompozisyonunun kontrol edilememesi • Özel ekipman gerektirmesi • Hücreler için yüksek kayma gerilimi	• Çipin üretimi ve kullanımı karmaşık • Çipin üretilmesi için özel ekipman ve tecrübeli personele ihtiyaç duyulur.

c. *Biyoreaktörler*

Hücrelere spinner flask ya da döner duvarlı biyoreaktörler içinde karıştırma etkisiyle birbirleri ile bağlantı kurmaya zorlandırılmalarıyla küresel form kazandırılır [95]. Yöntem diğerlerine göre daha kolay ve hızlıdır. Ayrıca oldukça yüksek sayıda küre üretimine imkan tanır. Fakat en önemli sorun küre boyutunun değişken olmasıdır [47]. Farklı tipte hücrelerden kokültür çalışmalarında da bileşenlerin bileşiminin belirlenememesi de bir diğer problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca bu reaktörlerin çalıştırılması için gerekli ortam ve hücre sayısı oldukça yüksektir.

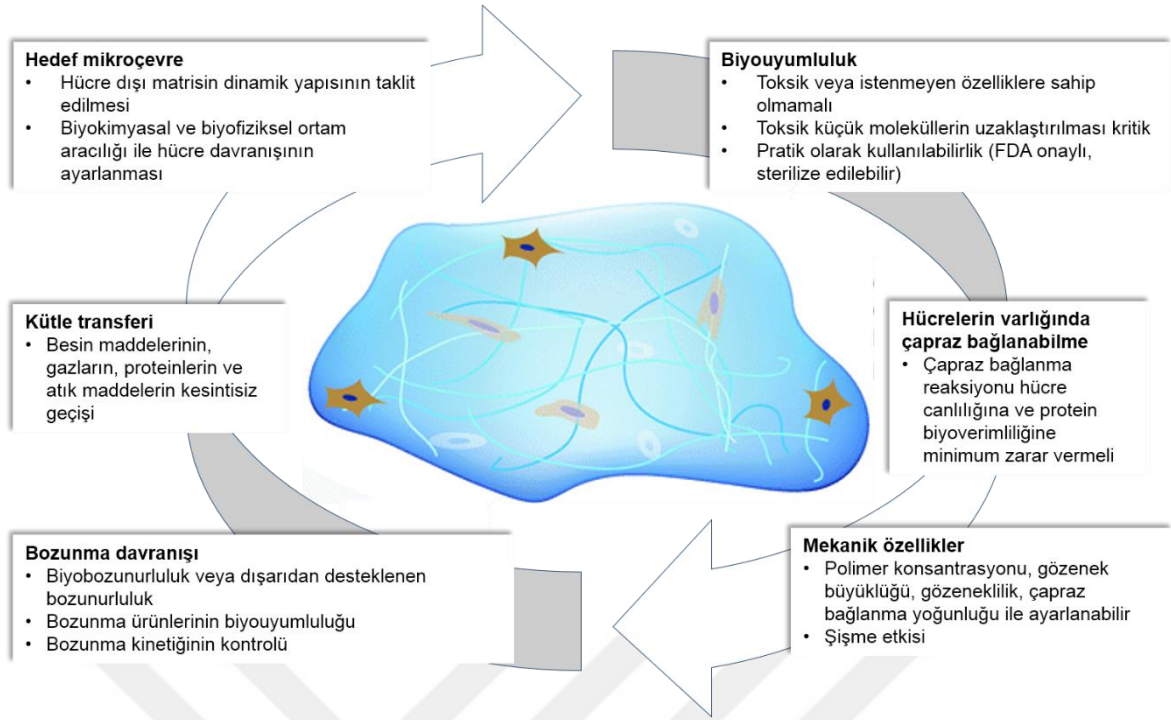
d. *Dijital Mikroakışkanlar*

Ortak eksenli damlacık üreten mikroakışkan sistemler hücrelerin hidrojellerle birlikte küre üretiminde kullanılmaktadır. Saniyeler içinde 10,000 kadar küre üretilmektedir. Fakat oluşturulan kürelerde hücre sayısının düşük olması optimize edilmesi gereken bir parametredir [94].

2.5. **Doku Geliştirilmesinde Hidrojeller**

Doku mühendisliğinde; doku ve organ yapısının oluşması için gerekli ECM yapısı doku iskeleleri, iskele oluşumunu sağlayan hücre tabakaları ya da destek görevi gören hidrojeller ile karşılanmaya çalışılmaktadır [97]. Doku iskeleleri, hücrelere uygun tutunma yüzeyi oluşturmalarının yanı sıra mekanik olarak destek sağlamakta, fizyolojik ve biyolojik değişikliklere yanıt oluşturmak için çevre doku ile etkileşimin kurulmasına yardım etmekte ve sonunda doğal hücre dışı matrisin yeniden oluşumunu uyarmaktadır [98].

Hidrojeller; içerisine kütlesinin %20'sinden fazla su alabilen, yapısında $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-COOR$ gibi hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğine sahip hidrofilik grupları bulunduran, kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmayla oluşan, üç-boyutlu, hidrofilik, ağ şeklindeki özel polimerlerdir [7]. Hücrenin mikro ortamında özelliklerin kontrol edilmesine izin veren hidrojeller, amaçlanan uygulamaya yönelik istenilen bir dizi biyolojik ve fiziksel tasarım kriterini karşılamalıdır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Hidrojellerin biyolojik ve fiziksel tasarım kriterleri [53].

2.5.1. Biyoyumluluk

Hücresel mikroçevre olarak hidrojel uygulamaları düşünülürken ilk ve en kritik parametre biyoyumluluktur. Biyoyumluluk, herhangi bir istenmeyen lokal veya sistemik yan etki yaratmadan bir biyomalzemenin istenen işlevi yerine getirme yeteneği olarak tanımlanır. Hücre taşıyıcı sistemler olarak kullanılacak hidrojeller; hücreye uyumlu ve aynı zamanda yenilenmekte olan dokuya ve çevre dokulara zarar verecek zararlı değişimlere (sıcaklık, pH, elektrolit dengesi) ve sistemik yanıt oluşumuna yol açmayan bozunma mekanizmaları ve bozunma ürünlerine sahip olmalıdır [99].

PEG, PLGA ve PLA gibi sentetik polimerler ve aljinat, kolajen ve fibrin gibi doğal polimerler Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration - FDA) tarafından spesifik klinik uygulamalar için onaylanmıştır. Fakat bunun gibi biyoyumlu birçok polimerden hidrojel üretimi sırasında kullanılan veya üretilen küçük moleküllerin (reaksiyona girmemiş monomer, başlatıcı ve çapraz bağlayıcılar gibi) ortadan kaldırılması, malzeme tasarımı sırasında dikkate alınması gereken önemli bir parametredir [53]. Bu moleküller konakçı hücrelere de toksik olabilirler.

2.5.2. Mikroçevre

Vücudumuzdaki dokular; hücreler ve hücre dışı matristen oluşmaktadır. ECM, hücreler için üç boyutlu mikroçevreyi oluşturur. Hücre dışı matrisler; jel benzeri polisakkarit temel maddesi içine gömülmüş proteinler ve hücre dışı bileşenlerini birbirlerine ve komşu hücreye

bağlayan adezyon moleküllerinden oluşur [100]. ECM ipliksi proteinler ve glikozaminglikan zincirine sahip proteoglikanların fiziksel ve kimyasal olarak çapraz bağlanması ile oluşmuş ağ yapısına sahiptir [101]. Ayrıca çeşitli moleküller ve iyonlar da bu ağ yapısına bağlanmıştır. Hücrelere fiziksel bir destek oluşturmalarının yanı sıra sürekli olarak kendini yeniden düzenleyen, hücre-hücre etkileşimini organize eden, hücrelerin yapışması, göçü, çoğalması, farklılaşması ve matris birikimi için çeşitli biyokimyasal ve biyofiziksel uyarıları sunan oldukça dinamik bir ortamdır [98]. Mikroçevre ile hücreler arasındaki bu iki yönlü iletişimi anlamak ve kullanmak, doku rejenerasyonu ve/veya hastalıkların tedavisi için uygulanan stratejilerin başarısını arttıracaktır.

2.5.3. Çapraz Bağlanma

Hidrojeller farklı polimer zincirleri arasında fiziksel ya da kimyasal olarak çapraz bağların varlığı sonucu ile oluşan polimerik ağlardır [102, 103]. Makromoleküler zincirlerin çapraz bağlanması, polimerlerin sulu ortamlarda kontrolsüz olarak çözünmesini önlemek için kullanılır [104]. Çapraz bağlanma; fiziksel ya da kimyasal bağların sıcaklık, pH, gibi çevresel faktörlerle, enzimatik tepkimelerle ya da fotopolimerizasyon ile oluşumunun sağlanmasıyla gerçekleşebilmektedir [105, 106].

Kimyasal çapraz bağlanma stratejileri, serbest radikal zincir polimerizasyonu, “click” reaksiyonları, Schiff bazlarının reaksiyonları ve karbodiimid aracılı aktivasyon reaksiyonlarını içeren zincir veya basamak büyüme reaksiyonları ile kullanarak hidrojel oluşumu için reaktif fonksiyonel grupları kovalent olarak birleştirmesine dayanır [7, 53]. Fiziksel çapraz bağlanma stratejileri, iyonik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağlama, kristalleştirme, hidrofobik etkileşimler ve protein etkileşimleri gibi işlevsel gruplar arasındaki kovalent olmayan etkileşimleri kullanır [7].

Fiziksel olarak çapraz bağlanmış hidrojeller, toksisite oluşturabilecek kimyasal çapraz bağlayıcı veya başlatıcı kullanmadan basit ağ oluşumuna izin verir. Fakat fiziksel etkileşimlerin zayıflığı ve bozunma hızlarının sınırlı kontrolü nedeniyle, bazı uygulamalar için yetersiz mekanik özelliklere sahiptir. Kendiliğinden bir araya getirilmiş amfifilik blok kopolimerler, proteinler, peptidler ve polipeptidler tipik olarak fiziksel çapraz bağlama yoluyla hidrojel oluştururlar [53].

Çapraz bağ konsantrasyonu veya yoğunluğu, elastikiyet, difüzyon hızı, su içeriği ve gözenek boyutu da dahil olmak üzere hidrojellerin çeşitli fiziksel özelliklerini belirler. Buna ek olarak, çapraz bağlanma derecesi, hidrojel parçalanma oranını etkiler bu nedenle, kontrol edilebilir hidrojel çapraz bağlama yöntemleri tercih edilir. Hidrojel oluşumunda yer alan

kimyasal dönüşümler sırasında sıcaklık, pH ve serbest radikallerde ani lokalize değişiklikler taşınan moleküllerin aktivitesini, hücre fonksiyonunu veya canlılığını etkileyebilir [53].

2.5.4. Mekanik Özellikler

Hücre göçü, proliferasyonu ve farklılaşması da dahil olmak üzere hücresel yanıtları etkileyen hidrojelın mekanik özellikleri, hedef dokunun yapısal ve mekanik özelliklerine sahip olmalıdır. Çünkü dokuların mekanik özellikleri yağ, deri, karaciğer gibi yumuşak dokulardan, kemik gibi sert dokulara kadar geniş bir aralıkta değişmektedir. Polimer konsantrasyonu, reaktif grupların stokiyometrisi ve çapraz bağlanma yoğunluğu, hidrojellerin mekanik özelliklerini ayarlamak ve dolayısıyla hücresel mikro çevreyi kontrol etmek için yaygın olarak kullanılır [53]. Hidrojeller viskoelastik özellik gösterdiklerinden dolayı yumuşak doku mühendisliği için daha uygundurlar. Fakat sert doku uygulamaları için olan bu kısıtlama, mekanik özellikleri bakımından dayanımı yüksek polimerlerin ve seramiklerin karıştırılması (kompozit maddeler) ile aşılmaktadır.

2.5.5. Biyobozunma Kinetiği

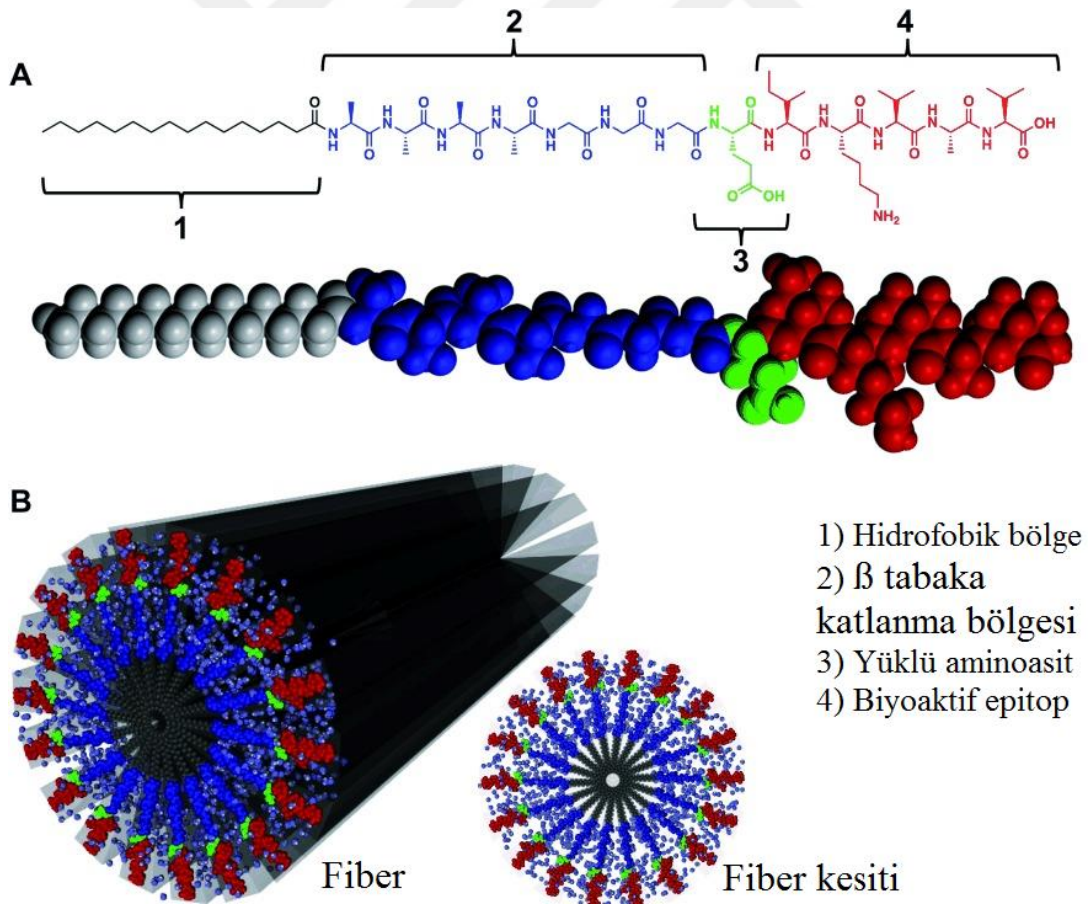
Hidrojellerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilmesi için bozunur olması gerekir. Bozunma çoğalan hücreler için yerleşme alanı sağlarken aynı zamanda yapı içinde damarların oluşmasını da kolaylaştırır. Polimerik malzemelerin bozunumu enzimatik tepkimeler, hidrolitik tepkimeler (sentetik polimerler) veya iyon değişimleri (örn. aljinat, peptit amfifiller) ile gerçekleşmektedir [53]. Bozunma kinetiği bozunma yöntemine bağlı olarak farklılık gösterir. Hidrolitik tepkimeler sonucunda bozunma kitlesel olarak gerçekleştiği için bozunum hızı sabittir. Vücut içerisinde matris metalloproteinazları (MMP'ler), heparinaz, hiyaluronidaz, serin proteinazlar ve trombospondin motiflerini içeren disintegrin gibi matris bozunumu ve yeniden düzenlenmesi için özelleşmiş enzim sınıfları bulunmaktadır [107]. Enzimatik tepkimeler çevredeki enzim konsantrasyonuna ve polimerdeki kesilme bölgelerinin sayısına bağlı olduğundan dolayı daha özgül ve kontrol edilebilir özelliktedir [108].

Doku mühendisliği çalışmalarında hücrelerin ECM üretim hızı ile hidrojelın bozunma kinetiğinin birbirine paralel olması gerekmektedir. Eğer hidrojel çok yavaş bozunursa polimer ağı hücrelerin yayılma, büyüme ve çoğalmasını, hücreler ile besin ortamı arasındaki difüzyonunu engelleyebilir. Eğer hidrojel çok hızlı bir şekilde bozunursa yapı şeklini kaybeder ve buna bağlı olarak hücreler ihtiyaç duydukları destek zemininden mahrum kalarak doku gelişimini durur. Hidrojelın bozunma hızı ile içinde bulunan hücrelerin ECM sentezleme hızları arasındaki dengeyi sağlamak için hidrojelın bozunma kinetiği hedeflenen

zamana ve hücreye bağlı olarak optimize edilmelidir. Bozunma kinetiği; polimere ve bu polimerin bozunma yöntemine, polimer konsantrasyonuna, çapraz bağlanma derecesine ve hidrojel içinde bulunan hücre tipine ve konsantrasyonuna bağlıdır [109].

2.6. Peptit Amfifillerin Yapısı ve Özellikleri

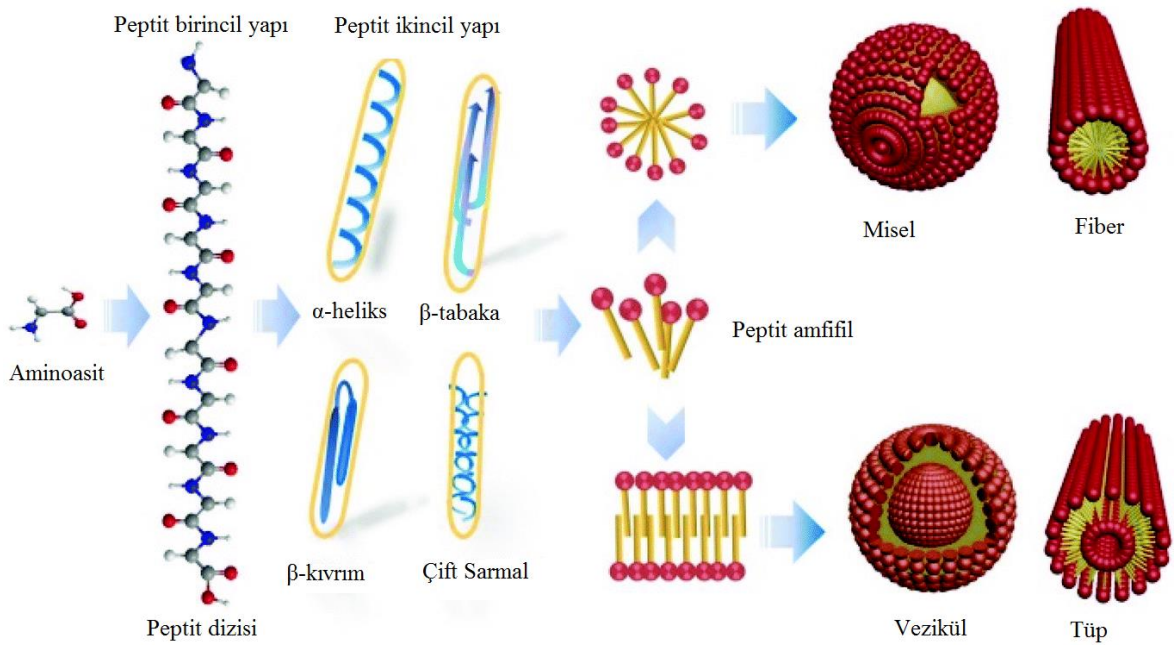
Son yarım yüzyılda biyomalzeme alanında büyük gelişmeler gerçekleşmiştir. Başlangıçta sadece yapısal ve mekanik fonksiyonları yerine getirmek için **biyoinert** malzemeler kullanılmıştır. Zamanla moleküler biyolojideki gelişmeler malzeme-hücre etkileşimlerinin hücrenin işlevselliğindeki önemini ortaya koymuş ve hücre canlılığı tutunması işlevselliği ve farklılaşmasındaki biyoaktif komponentler tanımlanmıştır. Bu gelişmelerle birlikte hücrenin onu çevreleyen malzeme ile aktif olarak etkileşime geçen **biyoaktif** malzemeler üretilmiştir. Günümüzde ise biyokimyasal süreçleri de taklit eden **biyomimetik** malzemeler geliştirilmektedir. Doğal biyolojik proseslerden esinlenerek geliştirilen biyomimetik malzemeler hem yapısal, kimyasal ve mekanik olarak hemde üretim mekanizması ile doku ve organ rejenerasyonu sağlar [110, 111].



Şekil 2.11. Peptit amfifilin yapısı [8].

Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyomimetik malzemelerden biri de sentetik peptit amfifillerdir. Peptit amfifilin (PA) tasarımı ilk olarak Hartgerink ve Stupp tarafından geliştirilmiştir. Peptit amfifiller temelde alkil veya açıl zincirlerden oluşabilen hidrofobik segment (N-terminal bir alkil uç) ve amino asit içeren hidrofilik segmentten (C-terminal uç) oluşur. Hidrofilik uç i) β tabaka oluşturabilen kısım, ii) çözünürlüğü sağlayan yüklü kısım ve iii) farklı moleküler özellikler eklenebilen biyoaktif epitop olmak üzere 3 ana yapısal özelliğe sahip kısımdan oluşur (Şekil 2.11) [8, 9].

Bir aminoasidin amino grubuyla diğerinin karboksil grubunun reaksiyona girmesiyle oluşan peptit bağları çok sayıda aminoasitin uç uca eklemesi sonucunda polipeptit zincir oluşumunu sağlar. *Birincil yapı* adını verdiğimiz bu polipeptit zincir; aminoasitler arasındaki hidrojen bağları, aminoasit yan zincirleri arasındaki disülfid bağları ve kovalent olmayan etkileşimlerle daha sıkı olan *ikincil yapıyı* oluşturur. İkincil yapı; düzenli ilişkilerle oluşan α -heliks, β -tabaka ve düzensiz ilişkilerle oluşan tesadüfî kıvrımlardan meydana gelir. α -heliks ve β -tabaka yapıları katlanmalar geçirerek proteinlerin fonksiyonel karakterini belirleyen *üçüncül yapıları* oluştururlar. *Dördüncül yapı* ise birden fazla polipeptit zincirinin kovalent olmayan bağlarla bir arada bulunduğu yapıdır [112, 113] (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Peptit amfifilin ikincil yapısı [112].

Peptid amfifiller çözeltide amfifilik doğası gereği ilk olarak misellerin oluşumunu gerçekleştirir. Daha sonra bu miseller pH veya yüklü iyon gibi uyarıların varlığında hidrofilik baş gruptaki baskın elektrostatik çekim kuvvetleri nedeniyle silindirik nanofibere

dönüşür. Silindirik nanofiber PA'lar arasında, β tabaka segmentinden hidrojen bağları oluşturarak yönlendir. PA nanofiberler fonksiyonel biyoaktif hidrojel oluşturmak için fiziksel çapraz bağlarla belirli kritik konsantrasyon üstünde jel oluştururlar [114].

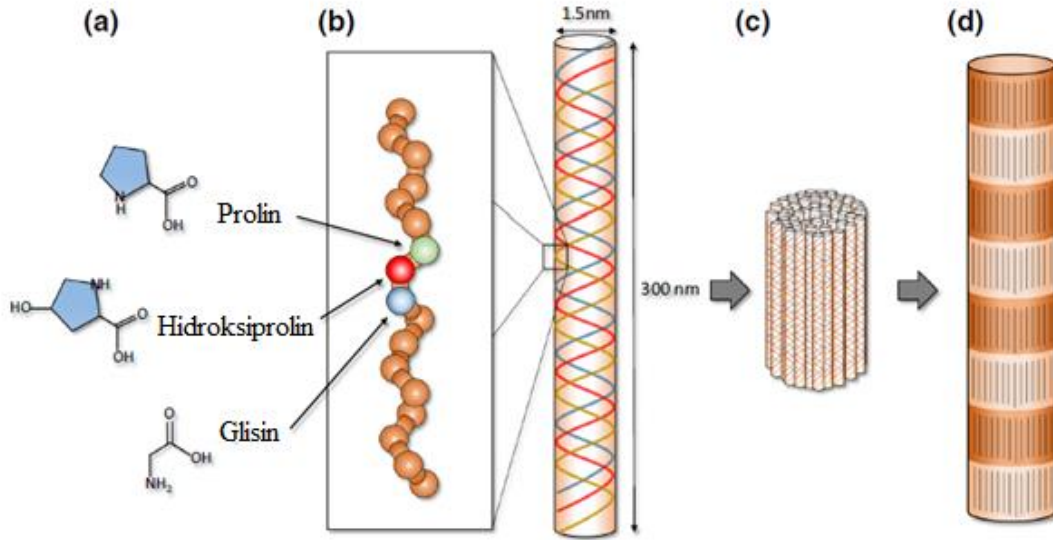
Doğal ECM proteinleri biyomedikal uygulamalarda kullanılan temel materyaldir. Bununla birlikte hayvan türevli proteinler, olası immünojenesite, hayvan kaynaklı hastalık bulaştırma riski, düşük tekrarlanabilir ürün eldesi gibi problemler barındırmaktadır [115]. Bu sebeple doğal ECM'i taklit eden biyomimetik materyallerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Peptit amfifiller, istenilen aminoasitleri dizilimine imkan tanınmasına bağlı olarak hedeflenen biyoaktif grupların yapıya kolayca eklenebilmesi, doğal polimerlerin aksine güvenli, patojensiz ve yüksek saflıkta büyük ölçekte ve tekrarlı üretimlerinin mümkün olması nedeniyle ön plana çıkmıştır [10].

2.6.1. Kolajen-Mimetik Peptit Amfifiller

Kolajen, ECM'de bulunan en yaygın yapısal proteindir. Kolajen yaklaşık 1000 aminoasit dizisinden oluşan üç adet polipeptit α zincirinin üçlü sarmal konfigürasyonuna sahiptir [116]. Sarmal bölgelerinde tekrar eden Gly-X-Y sekansları bulunur. Genellikle X ve Y kısımlarında sırasıyla prolin ve hidroksiprolin bulunmaktadır. Glisin en küçük aminoasit olmasından dolayı kolajen üçlü sarmalının yeterince yakın paketlenmesini sağlarken prolin ve hidroksiprolin, halka yapıları nedeniyle polipeptit zincirinin sarmal düzenini sağlamlaştırır [100].

Değişik kolajen alt birimlerinin (polipeptid zincirlerinin) birleşmesi ile 25 çeşit kolajen ortaya çıkmıştır. Bunlardan tip 1, 2 ve 3 fibril yapıdaki en yaygın kolajenlerdir. Şekil 2.13'te tip 1 kolajenin prokolajen olarak isimlendirilen en basit ünitesinden kolajen fiber oluşumuna kadar olan süreci göstermektedir [117].

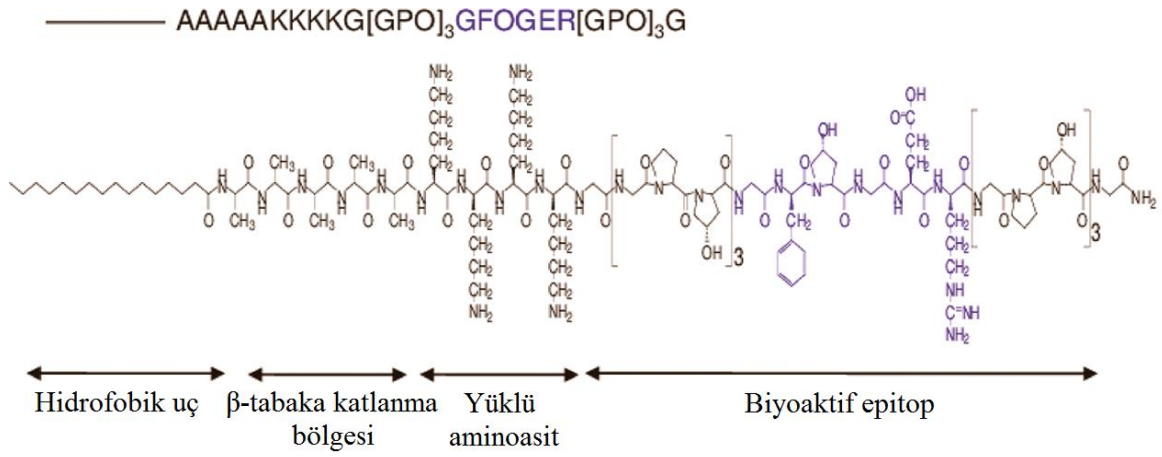
Kolajen proteinin yapı taşı olan prokolajen üç farklı primer polipeptit zincirinin heliks konfigürasyonunda kendiliğinden düzenlenmesi ile meydana gelir. Hücre içinde sentezlenen prokolajen, prokolajen metalloproteinaz gibi enzimler tarafından hücre içi enzimatik modifikasyona uğrayarak tropokolajen adı verilen yapıya döner ve ardından hücre dışına verilir. Tropokolajen molekülleri düzenli aralıklı diziler halinde bir araya gelerek fibrilleri oluşturur. Fibriller hem doğrusal hem de yatay olarak düzenlenerek daha kalın kolajen fiberleri oluşturur [118].



Şekil 2.13. Kolajenin yapısı [117].

Kolajen sadece yapısal açıdan değil aynı zamanda biyomoleküler fonksiyonları açısından da büyük öneme sahiptir. Kolajen yapısında bulundurduğu DGEA, GFOGER gibi hücre bağlama motifleri ile $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, ve $\alpha 11\beta 1$ gibi integrinlere bağlanarak hücre yapışması, embriyogenez, homeostaz ve dokuların yeniden modellenmesi ile iyileşme gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynar [119, 120].

Son zamanlarda “(GPO) n ” tekrar eden yapısal birim ile kolajen mimetik peptitleri sentezlenmiştir. Özellikle Luo ve ark. kendiliğinden düzenlenme ve biyoaktif epitoplar ile nanoyapıyı ve kimyasal işlevselliğin aynı anda kontrol edildiği daha biyomimetik ve biyoaktif kolajen mimetik peptit amfifileri sentezlemiştir. Şekil 2.14'de gösterildiği gibi, peptit amfifil tipik olarak dört anahtar yapısal bölgeden oluşmaktadır. İlk olarak, hidrofobik karakter taşıyan palmitoil (C16) grubunun uzun bir alkil kuyruğu, lipofilik segmenti oluşturur. Takip eden bölgede katlanma bölgesini oluşturmak için beş ardışık alanin (A) ve yüklü bölgeyi oluşturmak üzere 4 ardışık lisin (K) aminoasitleri kullanılmıştır. Son olarak, epitop segmenti, kolajen üçlü sarmal yapıyı taklit eden birincil sekansı yani Glisin (G) - Prolin (P) - Hidroksiprolin (O) (GPO) ve hücre yapışma ligandı GFOGER ile birlikte tekrarlanır. GPO'nun tekrarları, peptit amfifile üç-sarmal doğasını kazandırır [10].

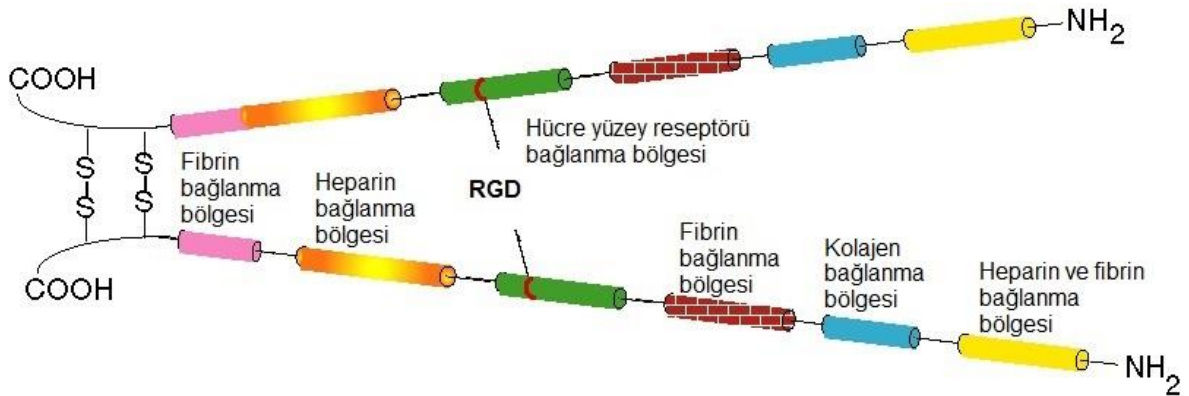


Şekil 2.14. Kolajen mimetik peptit amfifilin kimyasal yapısı [10].

2.6.2. Fibronektin-Mimetik Peptit Amfifiller

Adezyon moleküller hücre dışı matris komponentlerinden biridir. Bağ dokuların temel adezyon molekülü fibronektindir. Fibronektin her biri 2500 kadar aminoasit içeren iki polipeptit zincirinden oluşan dimerik bir glikoproteindir [100, 116] (Şekil 2.15). Fibronektin kan plazmasında çözülmüş formda ya da ECM de disülfid bağları ile çapraz bağlanarak fibril formunda bulunur [121].

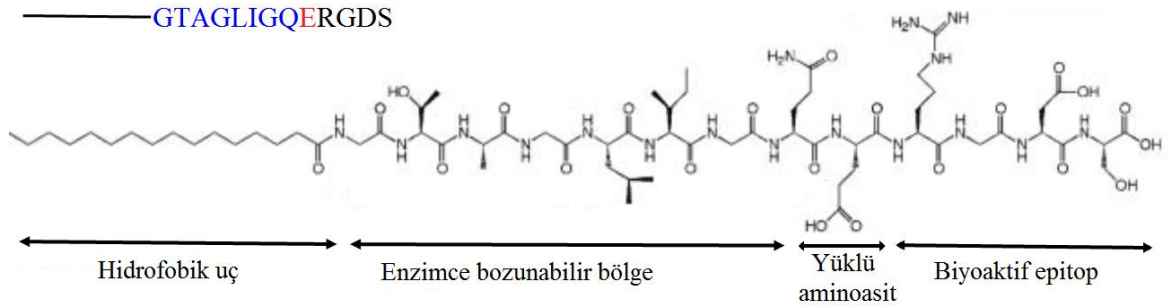
Fibronektin; hem kolajene özgü hem de GAG'lara özgü bağlanma bölgeleri ile hücre dışı matris bileşenlerini birbirine bağlanmasından ve hücre yüzey moleküllerine özgü bağlanma bölgeleri ile hücrelerin hücre dışı matrise bağlanmasından sorumludurlar. Hücreler, amino asit dizisi RGD'ye (arginin-glisin-aspartik asit) bağlanan integrinler adı verilen yüzey reseptörleri aracılığıyla fibronektin ile etkileşime girer. Epitop moleküler olarak tanınan integrin reseptörlerine bağlanarak, hücrelerin hücre dışı matrise yapışmasında ve izleyen karmaşık sinyal yollarında kritik bir rol oynar [116]. Bu sebeple RGD bağlanma dizisi içeren peptit amfifiller doku mühendisliği çalışmalarında en çok kullanılan moleküllerdir.



Şekil 2.15. Fibronektinin yapısı [122].

Tripeptid RGD dizisi biyomateryallerin yüzey özelliklerini geliştirmek için en sık kullanılan moleküller olsa da doğal olarak meydana gelen birçok hücre adezyon molekülünde α_5 , $\alpha_3\beta_1$ ve $\alpha_5\beta_1$ gibi integrin alt gruplarına bağlanarak oluşan hücre etkileşimini ve yapışması daha uzun olan RGDS dizisini içerir [123, 124].

Jun ve ark. hücreye duyarlı PA nanofiber ağları kullanarak doku mühendisliği için yeni bir strateji geliştirmiştir. Geliştirilen peptit amfifil dizisi hücre yapışma sekansı RGDS ek olarak doğal ECM'nin bozunmasında görev alan hücre aracılı enzimlerin tanıma bölgesi GTAGLIGQ sekansını içerir [125] (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Fibronektin mimetik peptit amfifilin kimyasal yapısı [126].

ECM sentez, parçalanma ve yeniden yapılanma süreçlerini hücre aracılı metalloproteinazlar ile düzenler. MMP hücre dışı matriksi parçalayan, nötral pH'da aktif olan, Zn^{2+} ve Ca^{2+} 'a bağımlı bir endopeptidaz ailesidir [127, 128]. Fibroblast, osteoblast, kondrosit, makrofaj, nötrofil ve endotel hücreleri gibi çeşitli bağ dokusu hücreleri tarafından proenzim olarak salgılanırlar. MMP'ler organogenez, vaskularizasyon, yara iyileşmesi, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, ovülasyon ve embriyogenez gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi, aynı zamanda artrit, kanser hücrelerinin uzak doku yayılımları, vaskülerizasyonu ve hücre bölünmesi gibi patolojik süreçlerde de rol oynarlar [129]. Substrat özgüllüklerine göre; kolajenazlar (MMP1, MMP8, MMP13), jelatinazlar (MMP2, MMP9), stromelisinler (MMP3, MMP10, MMP11), matrilisinler (MMP7, MMP26) ve membran tip metalloproteinaz 1-5 (MT-MMP) olmak üzere 5 ana gruba ayrılır [128, 130]. Aktif formu 72 kDa olan jelatinaz A (MMP 2); jelatini, tip IV-V-VII-X kolajeni, elastin, fibronektin ve laminini parçalayan enzimdir [128].

2.7. Vaskülerizasyon

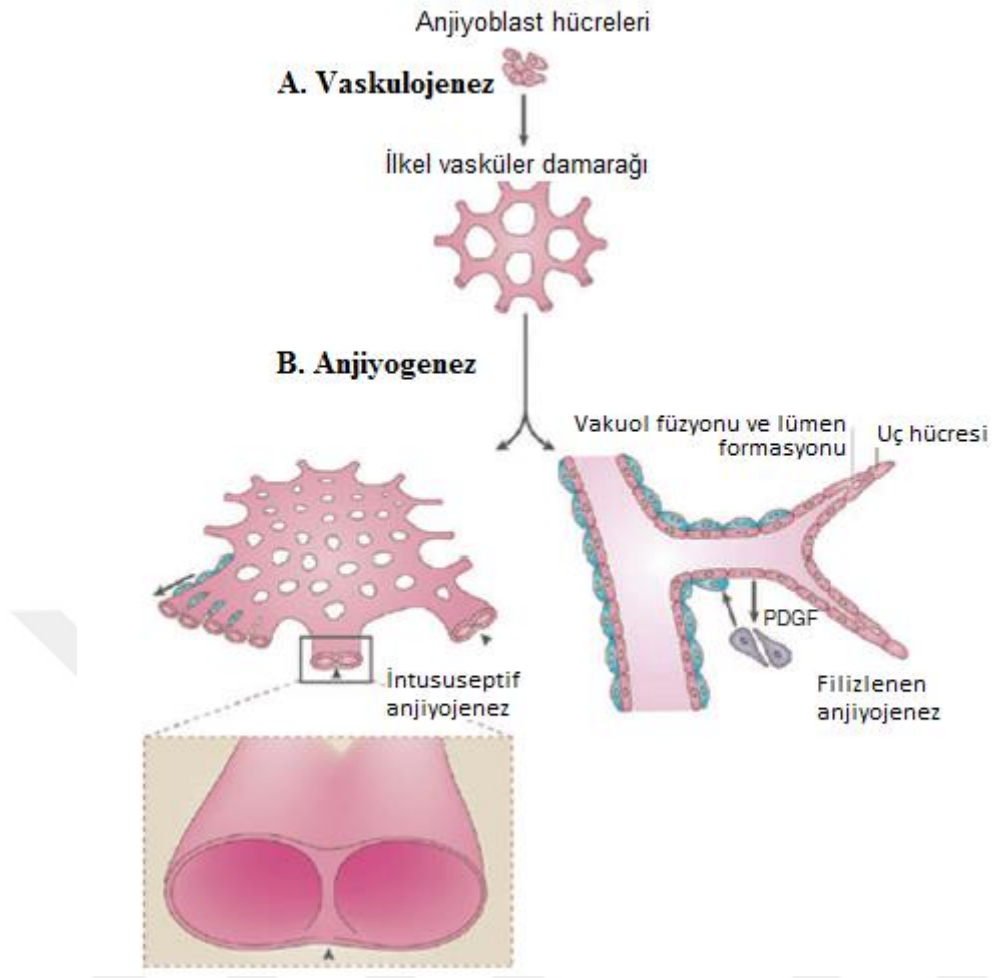
Normal doku fonksiyonlarının devamı için hücrelerin ihtiyaç duyduğu besinler, gazlar (O_2 ve CO_2), biyosinyal molekülleri ve hücre ürünleri dokulara giden kan damarları ile taşınmaktadır. Damarlanmış doku eşleniklerini oluşturmak için insan vücudunda kan

damarlarının oluşumundan sorumlu metabolik olayları daha iyi anlamak gerekir. Yeni damar yapılarının oluşturulması hem sağlıklı hem de patojenik durumlarda ortaya çıkan doğal bir prosestir [131].

Vaskülojenez, embriyoda anjiyoblastik öncül hücreler (angioblastic progenitor cells - APC) ya da endotel öncül hücreler (endothelial progenitor cells-EPC) tarafından yeni kan damarlarının oluşturulmasıdır. Oluşan bu primitif damarların büyümesi, genişlemesi ve yeniden modellenmesi ile ilgili süreç ise anjiyogenezdır [132]. Anjiyogenez erişkinlerde yara iyileşmesi, endometriyum proliferasyonu, folikül olgunlaşması ve koleteral dolaşım gibi fizyolojik süreçlerin yanı sıra tümör büyümesi ve retinal neovaskülarizasyon gibi durumlarda fizyolojik dengenin dışında da ortaya çıkar.

Anjiyogenez ise var olan damar yatağından yeni damar ağının oluşumu filizlenme (sprouting) ve intüssüepsiyon ile gerçekleşir. Filizlenme matrisin yeniden yapılandırılması ile birlikte endotel hücrelerinin dallanmalarına dayanırken; intüssüepsiyon, zıt konumdaki kılcal damar duvarlarının birbirlerine doğru uzanıp, damar içi köprü oluşturarak damar ağının genişlemesidir [133, 134]. Damar oluşumu ve yeni damar ağının şekillenmesi vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) and transform edici büyüme faktörü- β (TGF β) gibi biyosinyal moleküller, hücreler arası adezyon molekülleri ve ECM ile iletilen sinyallerce düzenlenen karmaşık bir süreçtir [132]. Bu süreçte görev alan büyüme faktörlerinin görevleri Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Damardaki endotel hücreler pasif durumda birbirlerine sıkı hücre-hücre bağlantıları ile bağlanmıştır. Endotel hücrelerinin etrafı perisit hücreleri ile sarılmıştır. Endotel hücreler ve perisitler bulundukları durum itibari ile hareketsiz bir membran oluşturmaktadır. Hipoksi ve inflamasyon gibi durumlarda nitrik oksite bağımlı olarak kan damarları duvarında bulunan düz kaslar gevşer ve damar iç çapında artış (vazodilatasyon) gerçekleşir. Anjiyogenez vazodilatasyon ile başlar. Nitrik oksit vazodilatasyonu başlatmasının yanı sıra VEGF gen ifadesini artırır [135]. VEGF, platelet endotel hücre adezyon molekülü (PECAM-1) ve VE-kaderinin yeniden dağılımını sağlayarak ve hücre membranı yapısında bir seri kinaz molekülünün değişimine sebep olur ve sonuçta damar geçirgenliğini sağlar [136].



Şekil 2.17. Kan damarlarının oluşum süreci [137].

Endotel hücreler VEGF, VEGF-C, anjiyopoietin 2 (ANG-2) ve FGF gibi bir sinyal aldıkları zaman, MMP düzeyini arttırırlar. Perisitler MMP aracılığıyla proteolitik bozunmaya uğrar ve bulundukları membran yapısından ayrılır. Buna bağlı olarak olgun damarlar stabilize durumlarını kaybederken, endotel hücreler çoğalma ve göç edebilme yeteğine kavuşur [133]. VEGF, anjiyopoietin 1 (ANG-1) ve TGF- β ve bunların reseptörleri arasında etkileşimler ile çoğalan endotel hücreler yeni damar oluşumunun gerçekleşeceği bölgeye doğru göç eder ve sıralanarak lumen oluşturlar [138]. ANG-1, PI3-kinaz/Akt ve Bcl-2 sinyal yollarını aktive ederken; p53, p21, Bax gibi yolları baskılayarak endotel hücrelerin apoptoza girmesini engeller [135]. Bu durum oluşan damarların kararlı olarak yapılarını koruyabilmesini sağlar. Bazal membran tekrar oluşur ve perisitler damar tüpü yapısına katılır [139]. Perivasküler hücrelerin endotel tüpü çevrelemesi ile damar oluşum süreci tamamlanır.

Çizelge 2.4. Damarlanma için önemli olan faktörler ve kullanım amacı [131, 132]

Faktörler	Görevleri
Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)	Endotel hücrelerin çoğalması, yayılması, farklılaşması ve canlılığını sağlar.
Hipoksi İndükleme Faktörü (α ve β) (HIF)	VEGF, PDGF reseptörler (PDGFR), TGF- α , EGF ve eritropoietinin üretimi için stimüle eder.
Trombosistten kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)	Perisitler ve düz kas hücrelerinin yeniden aktifleşmesi ve çoğalmasını sağlayarak vasküler olgunlaşma ve yeniden modellemede rol oynar.
Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	Endotelyal hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve farklılaşmasını teşvik ederek anjiyogenezin başlatılmasında çoklu rol oynar. Kılcal büyümeyi uyarır ve düz kas hücrelerine olan mitojenik etkisi ile büyük damarların büyümesini sağlar.
Anjiyopoietin 1 (Ang-1)	Damarlarda kararlı durumun korunmasına yardımcıdır.
Anjiyopoietin 2 (Ang-2)	VEGF varlığında endotelyal hücreleri proliferasyon sinyallerine duyarlı hale getirir, bazal laminanın yeniden modellenmesini artırır ve endotelyal hücrelerin göçünü uyarır. VEGF'nin yokluğunda, endotel hücre ölümüne ve damar regresyonuna yol açar.
α-Transforme edici büyüme faktörü (TGF-α)	Anjiyogeneze ve hücre çoğalmasını indükler.
β-Transforme edici büyüme faktörü (TGF-β)	Anjiyogeneze faktörleri, proteinazları ve bazal membran oluşumunu teşvik eder.
Epitel büyüme faktörü (EGF)	VEGF üretimini düzenler.
Matriks Metalloproteinaz (MMP-1, -2 ve -9)	Bazal laminanın parçalanmasını, ekstraselüler matriksin yeniden modellenmesini sağlar.
İnterlökinler (IL-1, -6,-8,-13)	Endotelyal hücre çoğalmasını destekler.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tezin bu bölümünde, çalışma kapsamında kullanılan malzemeler ve yapılan deneyler ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Çalışmanın ilk kısmında, hücre kültür çalışmalarında kullanılan HepG2 ve HUVEC hücre hatlarının karakteristik özellikleri belirlendikten sonra sferoid üretimi yapılmıştır. Üretilen sferoidlerin optik mikroskop görüntülerinin Image J programında analizi ile kürelerin boyutları belirlenmiştir. Sonrasında bu sferoidlerin işlevsellikleri immünofloresan boyama ile gösterilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında fibronektin-mimetik ve kolajen-mimetik peptit amfifillerin morfolojik, kimyasal ve konformasyonel özellikleri belirlenmiştir. Daha sonrasında jelleşme çalışmaları yürütülmüş ve elde edilen hidrojellerin reolojik özellikleri belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü kısmında çip üstü karaciğer sistemi için çip tasarımı yapılmış ve dinamik hücre kültür çalışmalarında kullanılan perfüzyon sistemin düzeneği oluşturulmuştur.

Çalışmanın son kısmında optimum özelliğe sahip peptit amfifil hidrojellerde sferoidlerin statik ve perfüzyon kültürü yapılmıştır. Statik ve dinamik kültür koşullarının hücre canlılığı, albumin salımı, üre sentezi ve gen ifadesi üzerine olan etkisi karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

Hücre kültür çalışmaları süresince kullanılan tüm malzemeler ve elde edildikleri firmalar Çizelge 3.1’de özetlenmiştir. Kullanılan teçhizatın marka ve model numarası ise metin içinde belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan malzemeler

Malzeme	Kod	Firma	Ülke
DMEM (High Glucose)	L0101	Biowest	Fransa
RPMI 1640	L0490	Biowest	Fransa
Fötal Sığır Serum (FBS)	S181H	Biowest	Fransa
L-Glutamin	G7513	Sigma-Aldrich	Almanya
Penisilin – Streptomisin	P4333	Sigma-Aldrich	Almanya
Dulbecco’nun steril fosfat tampon çözeltisi (wo Ca/Mg2+)	BE17-516F	Lonza	İsviçre
Trypsin/EDTA	T9935	Sigma-Aldrich	Almanya
Akutaz	ACC-1B	Capricorn Scientific	Almanya
Heparin	H4784	Sigma	Almanya

Hidrokortizon	H0888	Sigma	Almanya
Askorbik Asit	A4034	Sigma	Almanya
Endotel büyüme faktörü (EGF)	E9644	Sigma-Aldrich	Almanya
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)	P05019	R&D System	ABD
Fibroblastik büyüme faktörü-bazik (bFGF)	9F0291	Sigma Aldrich	Almanya
Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)	ab92846	Abcam	İngiltere
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	1.02378.0500	Merck	Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	1927280	Merck	Almanya
Hidroklorik Asit	07102	Sigma-Aldrich	Almanya
Thizolyl blue tetrazolium bromide - (MTT)	A.2231	AppliChem	İspanya
İzopropanol	P1009	Sigma-Aldrich	Almanya
Calcein Am	C-3099	Thermo Fisher Scientific	ABD
Etidyum Homodimer-1	46043	Sigma-Aldrich	Almanya
Albumin birincil antikor	Y9A2	Abcam	ABD
Cyp redüktaz birincil antikor	4E6.2	Abcam	ABD
Alexa Fluor 488 konjuge anti Rabbit IgG ikincil antikor	A11008	Thermo Fisher Scientific	ABD
Alexa Fluor 488 Phalloidin	A12379	ThermoFisher Scientific	ABD
Alexa Fluor 568 konjuge anti Mouse IgG ikincil antikor	A11004	Thermo Fisher Scientific	ABD
4,6-Diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür (DAPI)	D-1306	Invitrogen	ABD
Sığır Serum Albumin	A2153	Sigma-Aldrich	Almanya
Keçi serumu	G-9023	Sigma-Aldrich	Almanya
Metanol	34885-2.5l-R	Sigma-Aldrich	Almanya
Paraformaldehit	1.04002	Merck	Almanya
Gluteraldehit (%25)	G-6257	Sigma-Aldrich	Almanya
Hekzametildisilazan	8.04324	Merck	Almanya
Etanol	32221	Sigma-Aldrich	Almanya
5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR mix Plus (No ROX)	08-25-00001	Solis BioDyne	Estonya
QIAzol Lysis Reagent	79306	Qiagen	Almanya
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich	Almanya

3.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

İlaçların toksisite düzeylerini belirlemesi öngörülen sistemimiz için karaciğerin fonksiyonel en küçük birimi olan sinusoid taklit edilmeye çalışılmıştır. Bu birimde yer alan hücreler göz önüne alınarak; hücre kültür çalışmaları, insan karaciğer hücreleri (HepG2) ve insan endotel hücreleri (HUVEC) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Hepatosit Hücre Kültürü

Karaciğerde ilaç dönüştürümünün gerçekleştiren hepatositler için model hücre hattı olan insan kanser karaciğer hücreleri (HepG2) ATCC Hücre Bankası'ndan (Amerika) temin edilmiştir. Hücreler %10 (v/v) fetal sıgır serumu (FBS), antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin-100µL/mL streptomisin) ve 2 mM L-glutamin içeren Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM)'dan oluşan büyüme ortamında 37°C'deki %5 CO₂ içeren etüvde (Heraus Instruments, Almanya) çoğaltılmıştır. Her üç günde bir besin ortamı değiştirilmiş ve 6-7 günde bir pasajlama yapılarak kültüre devam edilmiştir.

3.2.2. Endotel Hücre Kültürü

Sinüsoid duvarlarını oluşturmak için insan umbilikal ven endotel hücreleri (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC) kullanılmıştır. Hücreler, %10 (v/v) FBS, antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin-100µL/mL streptomisin) ve 1 mM L-glutamin içeren Roswell Park Memorial Institute Medium 1640'dan (RPMI 1640) oluşan büyüme ortamı içinde CO₂ etüvünde 37°C'de kültüre edilmiştir. Ortam, her iki günde bir taze besin ortamıyla değiştirilmiş ve 3-4 günde bir pasajlama yapılmıştır.

3.3. Hücre Karakterizasyonu

3.3.1. Hücre Sayımı

Hücreye ait spesifik büyüme hızı ve ikilenme süresi gibi karakteristik özellikleri 10 günlük kültür boyunca hücre sayım testleri ile belirlenmiştir. Bu çalışma için, 6 gözlü polistiren doku kültür kabının (TCPS) her bir gözüne hepatositler için 2×10^4 HepG2/cm², endotel hücreler için 1×10^4 HUVEC/cm² konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. Her gün 3 gözdeki hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler %0.25 Tripsin-EDTA çözeltisiyle muamele edilerek yüzeyden kaldırılmıştır. Hücreler tamamen kalktıktan sonra, elde edilen hücreler Tripan mavisi ile boyanmış ve Neubauer lamı kullanılarak canlı hücreler sayılmıştır.

3.3.2. MTT Analizi

Üremesini devam ettiren canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi için 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu

analizde suda çözünür tetrazolyum tuzları hücre içerisinde metabolize edilerek suda çözünmez formazan kristallerine dönüşmektedir. Elde edilen formazan kristallerinin izopropanol içinde çözünmesini takiben spektrofotometrik ölçümlerle elde edilen renk yoğunluğu çoğalan canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır.

MTT çalışmaları için, 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözüne, 2×10^4 HepG2/cm² ve 1×10^4 HUVEC/cm² konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. On haftalık kültür boyunca her gün 4 gözdeki hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Her bir göze 60 µL MTT (2.5 mg/mL, PBS içerisinde) ve 600 µL serumsuz taze besin ortamı eklenmiştir. Örnekler, 37°C’de 3 saat inkübe edildikten sonra, üzerlerindeki MTT içeren ortam uzaklaştırılmış ve her göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen çözeltiden 200 µL alınarak 96-gözlü TCPS’e aktarılmış ve spektrofotometrede (Asys UVM 340, Avusturalya) 690 nm referans olmak üzere 570 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.3.3. Kristal Viyole ile Boyama

Hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasına dair bilgiler elde etmek amacıyla kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde, hücreler kristal viyole ile boyanmıştır. Hücrelerin üzerindeki besin ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile iki kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 1:1 (v/v) oranındaki aseton-metanol çözeltisi ile 4°C’de 20 dk muamele edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra gözlere hücre yüzeylerini kapatacak kadar kristal viyole boyası (%20’lik metanol çözeltisi kullanılarak %0.5’lik, w/v kristal viyole çözeltisi) eklendikten sonra 30 dk inkübe edilerek boyanması sağlanmıştır. Boyanan yüzeyler, akan suyun altında boya kalıntıları tamamen uzaklaşmaya kadar yıkanmış ve hücreler optik mikroskop (Olympus, ABD) altında incelenmiştir.

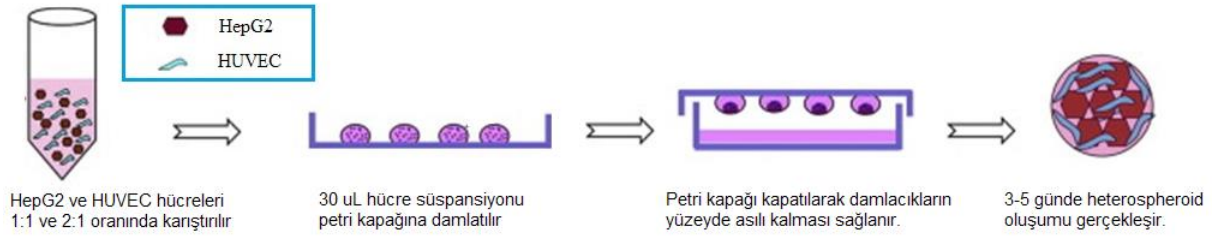
3.3.4. Floresan Boyama

Hücre kültür kabı yüzeyine ekilen hücrelerin hücre iskeleti organizasyonu kültürün 2., 4. ve 6. günlerinde yapılan ikili floresan boyama ile görüntülenmiştir. Hücreler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra PBS (pH 7.4) içerisinde hazırlanmış %4 (v/v) paraformaldehit çözeltisi ile 20 dk muamele edilerek fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra, %0.1 (v/v) Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 10 dk boyunca muamele edilerek hücre membran geçirgenliği arttırılmıştır. Hücrelerin filamentöz aktinleri (F-aktin), %1 (w/v) sığır serum albümin (BSA) içeren PBS (PBS/A) çözeltisinde 1:100 seyreltmede hazırlanan anti F-aktin ile konjuge Alexa Fluor 488 phalloidin sekonder antikoru ile; hücre çekirdeği ise 1:1000 seyreltmede hazırlanan 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorür (DAPI) ile 30 dk boyunca oda

sıcaklığında ve karanlıkta muamele edilerek boyanmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler PBS/A ile 3 kere yıkanarak floresan mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.4. Sferoidlerin Oluşturulması

500-2000 hücre içeren sferoidler asılı damlacık yöntemi kullanılarak oluşturulmuştur. İstenilen sayıda hücre içeren 30 µL hücre süspansiyonu 10 cm çapına sahip TCPS kabının kapağına damlatılmış ve içine DPBS eklenen TCPS kabının üzerine kapatılarak CO₂ etüvünde 37°C’de inkübe edilmiştir. DPBS, buharlaşma ile besin ortamının kaybının ve hücrelerin kurumasının engellenmesi için eklenmiştir. Yerçekiminin etkisi ile damlanın ucunda toplanan hücreler birbirleri ile bağlantı kurmuş ve küresel form almıştır (Şekil 3.1). Beş gün boyunca her gün bir Petri kabının kapağındaki küreler besin ortamı ile yüzeyden toplanarak sferoid oluşumu takip edilmiştir.



Şekil 3.1. Asılı damlacık yöntemi ile sferoid üretimi.

3.5. Sferoidlerin Karakterizasyonu

3.5.1. Sferoid Boyut Analizi

Beş günlük inkübasyon sonunda sferoidler yüzeyden toplanmış ve optik mikroskop görüntüleri alınmıştır. Sferoidlerin optik mikroskop görüntülerinden ImageJ yazılımı (Ulusal Sağlık Enstitüsü, MD, ABD) kullanılarak yapılan analiz sonucu sferoid boyutları belirlenmiştir.

3.5.2. Sferoid Canlılığının Belirlenmesi

Sferoidlerde hücrelerin canlılıkları, Live&Dead (canlı-ölü) analiz kiti (Life Technologies, ABD) ile belirlenmiştir. Kitin, Calcein-AM ve etidyum homodimer-1 (Ethd-1) olmak üzere iki bileşeni vardır. Normalde floresan özelliği olmayan Calcein-AM canlı hücre membranından geçerek hücre sitoplazmasında hücreiçi aktivite (esteraz aktivitesi) ile enzimatik hidrolize uğrar ve floresan özellik kazanır. Floresans mikroskop altında bakıldığında canlı hücre yeşil renkte gözükür. Normal şartlarda canlı hücrenin membranından geçemeyen etidyum homodimer hücre membran bütünlüğü bozulduğunda

(yani hücre öldüğünde) hücre içine girer ve nükleik asitlere bağlanır. Canlılığını yitirmiş hücreler etidyum homodimer ile boyandığında floresans mikroskop altında kırmızı renk verirler.

Analiz, yüzeyden toplanan sferoidler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren DPBS (DPBS+) ile yıkanan örnekler, 2 μ M Calcein AM ve 4 μ M EthD-1 içeren DPBS+ ile 30 dk boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası DPBS+ ile 2 kez yıkanan örnekler üzerinden floresan mikroskop ile hücre canlılığı görüntülenmiştir.

3.5.3. Sferoidlerin Morfolojik Analizi

Hücrelerin organizasyonu ve formu, Taramalı Elektron mikroskobu (SEM, Zeiss Evo 50, Almanya) ile görüntülenmiştir. SEM analizi için sferoidler santrifüj tüpünde toplandıktan sonra santrifügasyon ile üzerinden kültür ortamı uzaklaştırılıp 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyon işlemi için 30 dk boyunca %2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi içerisinde bekletilmiş ve analize kadar PBS içerisinde 4°C’de saklanmıştır. Analize gitmeden önce, örnekler %30, %50, %70, %90 ve %100 (v/v) etanol serisi içerisinde 2’şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra heksametildisilazan (HMDS) içerisinde 5’er dk muamele edilerek kurumaya bırakılmıştır. Örnekler altın-paladyum ile kaplanarak SEM görüntüleri alınmıştır.

3.5.4. Sferoidlerin İmmünofloresan Görüntülenmesi

3.5.4.1. Albumin/Cyp Redüktaz/DAPI Boyama

Beş günlük inkübasyon sonunda yüzeyden toplanan sferoidlerdeki hücrelerin işlevselliği floresan boyama ile gösterilmiştir. Karaciğerin fonksiyonlarını devam ettirdiğini gösteren işlevsel sitokrom p450 redüktaz enzimi ve albumin proteinleri boyanmıştır. Bu boyama için, yüzeyden toplanan sferoidler 3 kere DPBS ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında %4 (v/v) paraformaldehit ile 20 dk boyunca fikse edilen örnekler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. %0.1 Triton X-100 içeren DPBS ile 30 dk inkübe edilerek membran geçirgenliği artırılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 2 kez %0.1 (w/v) BSA içeren PBS (PBS/A) ile yıkanarak fazla Triton X-100 uzaklaştırılmış ve %10 (w/v) PBS/A ile +4 °C sıcaklıkta 30 dk bloklama yapılmıştır. %10 (w/v) PBS/A çözeltisinde 1:100 seyreltmede hazırlanan anti sitokrom p450 redüktaz antikoru ve 1:500 seyreltmede anti insan serum albumin antikoru ile 16 saat (bir gece) boyunca +4 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler %0.1 (w/v) PBS/A ile yıkanmıştır. Hücrelerin albumin ve sitokrom P450 redüktaz proteinleri %1 (w/v) PBS/A çözeltisinde anti albumin ile konjuge 1:400 seyreltmede hazırlanan goat F(ab)2 poliklonal ikincil antikoru, sitokrom P450 redüktaz ile konjuge 1:200 dilüsyonda hazırlanan keçi anti

tavşan IgG(H+L) (FITC) ikincil antikor ve hücre çekirdeği için 1:1000 seyreltmede hazırlanan DAPI ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta muamele edilerek boyanmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler %0.1 (w/v) PBS/A ile yıkanmıştır ve örnekler floresan mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.5.4.2. von Willebrand Faktör/DAPI Boyama

Sferoidlerdeki damarlanmayı göstermek için von Willebrand Faktör (vWF) boyama yapılmıştır. Bu boyama için, sferoidler yüzeyden toplanmış ve 2 kere PBS ile yıkanmıştır. Oda sıcaklığında %4 (v/v) paraformaldehit ile 20 dk boyunca fikse edilen örnekler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. %0.1 Triton X-100 içeren DPBS ile 30 dk inkübe edilerek membran geçirgenliği arttırılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 2 kez %1 (w/v) PBS/A ile yıkanarak fazla Triton X-100 uzaklaştırılmış ve %5 (v/v) keçi serumu ve %1 (w/v) PBS/A ile oda sıcaklığında 30 dk blokama yapılmıştır. Yüzde 5 (v/v) keçi serumu ve %1 (w/v) PBS/A kullanarak 1:400 seyreltmede hazırlanan anti vWF antikor ile 16 saat (bir gece) boyunca +4°C inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler %1 (v/v) PBS/A ile yıkanmıştır. Yüzde 5 (v/v) keçi serumu ve %1 (w/v) PBS/A kullanarak vWF ile konjuge 1:500 seyreltmede hazırlanan keçi anti tavşan IgG(H+L) (FITC) ikincil antikor ve hücre çekirdeği için 1:1000 seyreltmede hazırlanan DAPI ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta muamele edilerek boyanmıştır. İnkübasyon sonrası örnekler %1 (w/v) PBS/A ile yıkanmış ve örnekler floresan mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.6. Peptit Amfifillerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada iki farklı tür peptit amfifil dizisi kullanılmıştır. Kullanılacak peptit amfifiller hücrelerin ihtiyaç duyduğu ECM yapısında bulunan bileşenleri taklit edecek şekilde kolajen-mimetik ve fibronektin-mimetik olarak tasarlanmıştır. Peptit amfifiller standart Fmoc kimyası kullanılarak katı-faz peptit sentezi yöntemiyle ile Genecust (Lüksemburg) firması tarafından üretilmiştir. Sentezin başarısı kütle spektroskopisi ile belirlenmiştir. Çalışma için sentezlenen peptit amfifiller yeterli biyoyoumluluğa sahip olması için HPLC yöntemiyle saflaştırılmıştır.

Tez kapsamında kullanılan kolajen-mimetik peptit amfifil (PA-GFOGER), fibronektin-mimetik peptit amfifil (PA-RGDS) ve bu iki yapının karıştırılmasıyla elde edilen peptit amfifillerin (PA-GFOGER+RGDS (1:4)) karakterizasyonuna yönelik çalışmalar bu bölümde sunulmuştur. Peptit amfifil karışımı hazırlanırken ilk olarak PA-GFOGER ve PA-RGDS çözeltileri ayrı ayrı hazırlanmıştır ve sonrasında hacimsel oran 1:4 olacak şekilde karıştırma gerçekleştirilmiştir.

3.7. Peptit Amfifil Hidrojelinin Hazırlanması

PA-GFOGER hidrojel elde etmek için literatürde yer alan prosedüre göre 5 mM kolajen ultra saf suda çözündürülmüştür [114]. Jelleştirme çalışmalarına geçilmeden önce çözelti +4 °C'de 2 gün bekletilmiştir. Ardından peptit amfifilden 4 kat derişik sodyum fosfat ile (20 mM Na₃PO₄) 1:1 oranında karıştırılmıştır. Çözelti tuz ile indüklenerek kendiliğinden düzenlenmesi sağlanmıştır. Fakat kararlı jel yapısına ulaşılmadığı için genipin (1, 2 ve 4 mM), riboflavin A (1%, 0.1% ve 0.01% w/v), β gliserol fosfat (10, 20 ve 40 mM) ve bunların ikili karışımları kullanılarak jelleşme çalışmaları yürütülmüştür.

PA-RGDS, ağırlıkça %0.5, %1 ve %2 (w/v) olacak şekilde deiyonize su içerisine eklenmiş ve 0.1 M NaOH ile çözelti pH'sı 7'ye ayarlanarak PA'ların suda çözülmesi sağlanmıştır. PA jelleşmesi, bulundukları ortamın çözelti pH'sının asidik hale getirilerek veya ortama artı yüklü inorganik tuzlar eklenerek gerçekleşir. Hücreler pH'ya karşı çok duyarlı olduklarından, *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında kültür ortamının pH'sını değiştirmek mümkün değildir. Bu nedenle, PA'lar hücreler üzerinde olumsuz bir etki göstermediği bilinen CaCl₂ çözeltisi ile jelleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PA çözeltisi 48 gözlü plakalar içine mikropipet yardımıyla konulmuş, bu PA çözeltisine 0.1 M CaCl₂ eklenerek en kararlı jel yapısı belirlenmiştir.

Sonrasında ECM benzeri hidrojin oluşturulması için %2'lik (w/v) PA-GFOGER ile %2'lik (w/v) PA-RGDS peptit amfifil çözeltileri 1:4 oranında karıştırılmış ve 0.1 M CaCl₂ peptit çözeltisine 1:1 oranında eklenerek PA-GFOGER+RGDS hidrojel elde edilmiştir.

3.8. Peptit Amfifil Hidrojellerin Karakterizasyonu

3.8.1. Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi

Peptit amfifillere ait kimyasal yapı ATR-FTIR (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) analizi ile incelenmiştir. Örnekler Bölüm 3.8'de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra -20 °C'de dondurulmuş ve sonrasında dondurarak kurutma yöntemiyle (Christ, Almanya) -80 °C'de liyofilize edilmiştir. Analiz 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Peptit amfifillerin kendiliğinden düzenlenme süreci sonunda fiber yapısı geçirimli elektron mikroskobu (TEM, FEI Tecnai Spirit G2 Biotwin, Hollanda) ile görüntülenmiştir. 2 mM PA-RGDS, PA-GFOGER ve bunların karışımından oluşan peptit distile suda çözülmüştür. Elde edilen çözeltiler pH 7'ye ayarlandıktan sonra bakır metal üzerine eklenmiştir. PA-RGDS ve PA-GFOGER+RGDS (1:4) üzerine 10 µL 100 mM CaCl₂ çözeltisi damlatılmış

ve kendiliğinden düzenlenme sağlanmıştır. Fazla su kağıt mendil aracılığıyla uzaklaştırılmış ve örnekler uranil asetat çözeltisi (%2'lik (w/v), distile su içinde) ile 5 dk boyanmıştır. Örnekler DPBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve fazla sıvı kağıt mendil ile uzaklaştırıldıktan sonra havada kurumaya bırakılmıştır. Kuru örnek 80 kV'da TEM ile analiz edilmiştir.

3.8.3. Dairesel Dikroizm (CD) Analizi

Peptit amfifillerin dairesel dikroizm (CD) analizi ile konformasyonel yapıları incelenmiştir. Peptit amfifillerin CD spektrası JASCO J-815 (JASCO Analytical Instruments, ABD) spektropolarimetresi ile belirlenmiştir. PA-RGDS ve PA-GFOGER örneklerine ait çözeltiler 0.1 mM derişime sahip olacak şekilde hazırlanmış ve 100 mM NaOH kullanılarak pH 7'ye ayarlanmıştır. Daha sonra, PA-RGDS içeren örneklerden (PA-RGDS ve PA-GFOGER+RGDS (1:4)) 950 µL Eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 50 µL 100 mM CaCl₂ çözeltisi eklenmiştir. Analiz, 190 – 300 nm dalga boyu aralığındaki uzak UV bölgesinde, 1 mm ışık yoluna sahip kuartz küvetler içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.8.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

PA-RGDS ve PA-GFOGER+RGDS (1:4) hidrojenlerinin morfolojisi Taramalı Elektron mikroskobu (SEM, Zeiss Evo 50, Almanya) ile görüntülenmiştir. PA-GFOGER ile kararlı bir jel yapısı elde edilemediği için SEM analizi gerçekleştirilememiştir. PA-RGDS ve PA-GFOGER+RGDS (1:4) hidrojenler %2 (w/v) derişime sahip olacak şekilde hazırlandıktan sonra fiksasyon işlemi için 30 dk boyunca %2.5'luk (v/v) glutaraldehit çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Yıkama sonrasında örnekler analize kadar DPBS (pH 7.4) içerisinde 4 °C'de saklanmıştır. Analiz öncesi örnekler %30, %50, %70, %90 ve %100 (v/v) derişime sahip etanol serisi içerisinde 2'şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler kritik nokta kurutucusu (Emitech K850, İngiltere) ile kurutulduktan sonra altın-paladyum ile kaplanarak SEM görüntüleri alınmıştır.

3.8.5. Reolojik Analiz

Hidrojenlerin viskoelastik özellikleri reometre (Ares Instruments, ABD) ile belirlenmiştir. Analiz için PA-GFOGER ve PA-RGDS çözeltileri %1'lik (w/v) ve %2'lik (w/v) derişime sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca %1'lik (w/v) çözeltiler ve %2'lik (w/v) çözeltiler kendi aralarında PA-GFOGER/ PA-RGDS hacimsel oranı 1:4 olacak şekilde karıştırılarak 2 farklı peptit amfifil karışımı elde edilmiştir. Çözeltiler 100 mM CaCl₂ ile çapraz bağlandıktan sonra 8 mm çapındaki paralel plaka ile reolojik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Analizi yapılan örneklerin depo modül (G') ve kayıp modül (G'') değerleri 25°C sıcaklıkta, 0-10 rad/s değişen frekansta yapılan dinamik ölçümler sonucu belirlenmiştir.

3.9. Sferoidler ile Hücre Kültür Çalışmaları

3.9.1. Besin Ortamının Belirlenmesi

Karaciğer organoidlerinin geliştirilmesi için kullanılacak en uygun özelliklere sahip ortamın belirlenmesi için 1:1 oranında karıştırılan HepG2 ve HUVEC hücreleri, ekim yoğunluğu 20000 hücre/göz olacak şekilde 48 gözlü plakalara ekilmiştir. Hücreler 5 gün boyunca 3 farklı ortam içinde kültüre edilmiştir ve besin ortamının hücre canlılığına etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir. Kullanılan besin ortamlarına ait içerikler aşağıda sunulmuştur:

- %10 (v/v) FBS, antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin-100 µL/mL streptomisin) ve 4 mM L-glutamin içeren DMEM
- %10 (v/v) FBS, antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin-100 µL/mL streptomisin) ve 1 mM L-glutamin içeren RPMI 1640
- Bu iki ortamın 1:1 karışımından oluşan besin ortamı (DMEM+RPMI)

Çalışmada ulaşılmak istenen hedeflerden biri de vaskülarizasyonun sağlanmasıdır. Vaskülarizasyonu indükleyen bileşenleri içeren ticari ürünler bulunmaktadır. Bu ürünlerin içeriğindeki büyüme faktörleri DMEM besin ortamı içine eklenerek kültür çalışmaları yürütülmüştür. Besin ortamının vaskülarizasyon üzerine etkisi Matrigel® üzerinde tübüler yapı oluşum analizi ile incelenmiştir. Bu çalışma için Matrigel® ile yüzeyi kaplanan 96 gözlü TCPS kaplara HUVEC hücreleri (10^4 hücre/göz) ekilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca 3 farklı ortam içinde kültüre edilmiş ve tübüler yapı oluşumu 24. saatte optik mikroskop ile görüntülenmiştir. Sözü edilen ortam bileşenleri aşağıda sunulmuştur:

- %10 (v/v) FBS, antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin-100 µL/mL streptomisin) ve 4 mM L-glutamin içeren DMEM (hücre büyüme ortamı)
- Vaskülarizasyonu sağlamak için Promocell (ABD) firması tarafından geliştirilen ticari besin ortamlarından Endotelyal Hücre Üreme Ortamı 2'nin (Endothelial Cell Growth Medium 2) içeriğine uygun şekilde hazırlanan vaskülarizasyon ortamı: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF, 5 ng/mL), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF, 5 ng/mL), Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF, 5 ng/mL), İnsulin Büyüme Faktörü (IGF-1, 15 ng/mL), heparin sülfat (0.75 birim/mL), hidrokortizon (1 µg/mL), askorbik asit (50 µg/mL), L-glutamin (4 mM), %2 (v/v) FBS ve antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin-100 µL/mL streptomisin) içeren DMEM
- %10 (v/v) FBS içeren vaskülarizasyon ortamı (yukarıda belirtilen)

3.9.2. Sferoidlerin Durgun Kùltürü

Sferoidlerin durgun koşullarda kùltürü, biyolojik olarak uyumlu ve inert olan agaroz kaplı 24 gözlü plakalarda gerçekteştirilmiştir. Agarozun biyoinert yapısı hücrelerin yüzeye tutunmasını engelleyerek kùltür boyunca küresel yapının korunmasını sağlamaktadır. Agaroz otoklav ile sterilize edildikten sonra, 50 µL/göz olacak şekilde 24 gözlü TCPS gözlerine kaplanmıştır ve soğutulmaya bırakılmıştır. Agaroz, sıcaklık duyarlı bir polimer olup oda sıcaklığında çapraz bağlanmaktadır. Sferoidler, her bir sferoid içinde 1500 hücre olacak şekilde, HepG2 ve HUVEC hücrelerinin 2:1 oranında karıştırılmasıyla asılı damlacık yöntemi ile oluşturulmuştur. Agaroz kaplı gözlerle 100 sferoid/göz olacak şekilde hücre ekimi gerçekteştirilmiş ve durgun olarak kùltüre edilmiştir. Her üç günde bir ortam değişimi yapılmıştır.

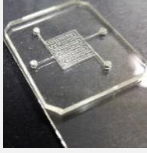
Peptit amfifillerin sferoid gelişimine etkisini incelemek için sferoidler peptit amfifil hidrorellere enkapsüle edilerek durgun kùltür çalışmaları yürütölmüştür. Bu amaca yönelik olarak PA-RGDS ve PA-GFOGER peptit amfifil çözeltileri %2 (w/v) konsantrasyona sahip olacak şekilde distile suda çözülmüştür. Çözeltilerin pH değeri 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile 7.4'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 30 dk UV ışık altında gerçekteştirilmiştir ve sonrasında peptit amfifil çözeltileri 1:4 oranında (PA-GFOGER: PA-RGDS) karıştırılmıştır. Beş günlük kùltür sonunda yüzeyden toplanan sferoidler steril peptit amfifil karışımı ile karıştırılmıştır. Hücreli peptit amfifillerden 100 µL alınarak, karışım 100 sferoid/örnek olacak şekilde 24 gözlü kùltür kabının gözlerine dağıtılmıştır. Sonrasında gözlerle 100 µL 100 mM CaCl₂ çözeltilisi eklenerek çapraz bağlanma sağlanmıştır. Her üç günde bir ortam değişimi yapılarak kùltüre devam edilmiştir.

3.9.3. Sferoidlerin Dinamik Kùltürü

3.9.3.1. Çip-üstü-Karaciğer Sisteminin Geliştirilmesi

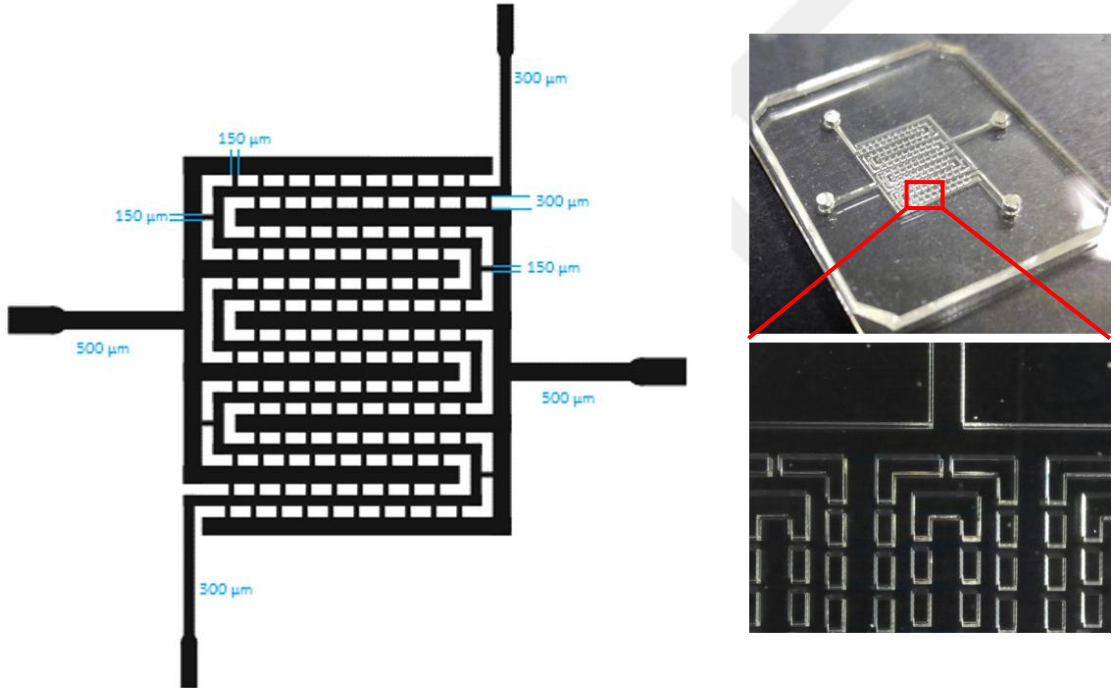
Perfüzyon sistemi; akış hızını ve yönünü etkin bir şekilde kontrol etme imkanı tanıyan şırınga pompası, hücrelerin kùltüre edileceği çip, çipin içinden geçen kùltür ortamının toplanacağı rezervuar ve bu temel elemanların bağlantısını sağlayan bağlantı elemanlarından (silikon tüpler, iki ve üç yollu vana, iğnesiz vana) oluşmaktadır. Karaciğer çipi kurulumu için kullanılan tüm malzemelerin kullanım amaçları ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.2'de detaylı olarak tanıtılmıştır.

Çizelge 3.2. Perfüze karaciğer çipi sistemine ait malzeme ve ekipmanlar

Ekipman/Malzeme/Firma	Kullanım Amacı
 Şırınga pompası New Era (ABD)	Ortam akış hızının ve yönünün kontrolünü sağlayarak sisteme besin ortamının dağıtılmasını sağlayan ana parçadır. Sekiz enjektör ile çalışmaya izin vermektedir.
 Doku Çipi Nehir Biyoteknoloji (Türkiye)	Sferoidlerin için üretilen bu tek kullanımlık çip steril olması, kontaminasyonu önlemesi, sızıntıları engellemesi, şeffaf yapısı, manipülasyon ve sisteme yerleştirme kolaylığı ile çalışma boyunca doku iskelelerine steril ve güvenli bir kültür ortamı sağlar.
 Plantinyumlu silikon tüp (0.76 mm ve 1.6 mm) Cole Parmer (ABD)	Silikon tüpler, sistem parçaları arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. Uzunlukları, perfüzyon çemberi ve diğer sistem bileşenleri arasındaki uzaklıklara ve CO2 inkübatörü ile laminar akışlı kabin arasındaki mesafe dikkate alınarak düzenlenmiştir.
 Dişi ve erkek luer kilitler Value Plastics (ABD)	Platinli silikon tüplerin sistemin diğer bileşenleri ile olan bağlantısını sağlar. Dişi ve erkek luer kilitler birbirlerine bağlanırlar ve sisteme sızdırmazlık kazandırır.
 Luer kilit uçlu şırınga Fisher Scientific (ABD)	Şırınga pompasına yerleştirilen enjektör ile sisteme taze besin ortamı sağlanır. Çip sonrasında sisteme ters olarak bağlanan enjektör ile çipin içinden geçen kültür ortamı için rezervuar görevi görür. Kilitli özel ucu aracılığıyla sistemdeki bağlantılara sızdırmazlık kazandırır ve sterilitenin bozulmasını engeller.
 İğnesiz vana (Smartsite) Smiths Medical (ABD)	Ortam değişiminde ve bağlantıların manipülasyonu sırasında sistemin steril kalmasını sağlar.
 Tek yönlü vana Fisher Scientific (ABD)	Tek yönlü vanalar, pompa kapalı iken kültür ortamının kontrolsüz bir şekilde akmasını engeller.
 Üç yönlü vana Fisher Scientific (ABD)	Üç yönlü vana rezervuarda toplanan besin ortamından belirlenen günlerde örnek alınmasına izin verir.
 Hidrofobik filtre MilliPore (ABD)	Ortam rezervuarında gaz alışverişinin steril olarak gerçekleşmesini sağlar.
 Bağlantı Elemanları Nehir Biyoteknoloji (Türkiye)	Platinli silikon tüplerin çip ile olan bağlantısını sağlar

Perfüzyon biyoreaktör düzeneğinin en önemli bileşeni sferoidlerin kültürünün gerçekleştirileceği doku çipidir. Lee ve ark. (2007) karaciğerin fonksiyonel en küçük birimi olan sinüsoid yapısını taklit etmek için en uygun modelin endotelyal benzeri bariyere sahip sinüsoidal konfigürasyon olduğunu belirttiği için çalışmamızda sinüsoidal konfigürasyona sahip çip tasarımı yapılmıştır (Şekil 3.2). Mikroakışkan çip, fotolitografi yöntemi kullanılarak Nehir Biyoteknoloji (Türkiye) firması tarafından üretilmiştir.

PDMS çipler, 9,000 x 10,300 x 500 μm boyutlarda doku odası ve doku odasına acılan besin ortamı ve hücresel bileşenler için giriş ve çıkış portlarına sahiptir. Çipin doku odasında hücrelerin yerleşeceği kısım 500 μm genişliğindedir. Doku odası içindeki kanallar 300 μm genişliğe sahip olup sinüsoidal konfigürasyondadır. Akışkan kanal ile hücrelerin yerleşeceği bölgeler arasında besin ve oksijen geçişleri için 150 μm aralıklı duvar bulunmaktadır.

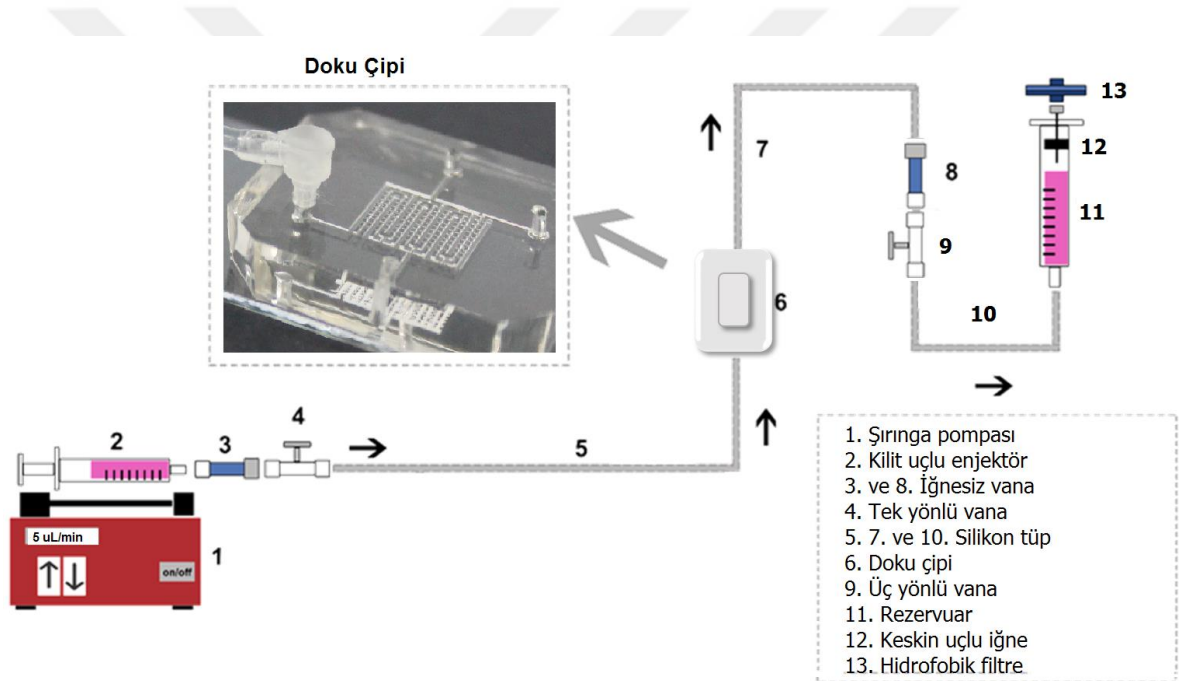


Şekil 3.2. Karaciğer çipinin konfigürasyonu ve boyutları.

3.9.3.2. Çip-üstü-Karaciğer Sisteminde Sferoidlerin Dinamik Kültürü

Karaciğer çipi çalışmalarında kullanılmak üzere tasarlanan ve kurulumu gerçekleştirilen perfüzyon biyoreaktör sistemine ait şema Şekil 3.3'te verilmiştir. Sistemde kullanılan çipler ve silikon tüpler otoklav ile 121°C'de 30 dk boyunca sterilize edilmiştir. Diğer elemanlar tek kullanımlık olup steril olarak satın alınmıştır.

Çip içinde kan akışının taklit edilmesi ve difüzyon kısıtlamalarının aşılması için, akış hızını ve yönünü etkin bir şekilde kontrol etme imkanı tanıyan şırınga pompası ve pompaya yerleştirilen luer uçlu şırınga ile kültür ortamı perfüzyon hattına 5 µL/dk akış hızında kontrollü bir şekilde dağıtılmıştır. Asılı damlacık yöntemi ile 5 günde oluşturulan sferoidler (100 sferoid/çip) pipet yardımı çip içine yerleştirilmiş ve bağlantı elemanları ile sisteme entegre edilmiştir. Pompaya takılı olan şırıngadaki kültür ortamı sisteme verildiğinde ortam doku çipinden geçerek rezervuarda (ters çevrilmiş luer uçlu şırınga) toplanmıştır. Doku çipi ve ortam rezervuarının inkübatöre yerleştirilmesi ile kontrollü çevre şartlarında (37°C %5 CO₂) *in vitro* kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kültürün belirli günlerinde üç yönlü vana vasıtası ile alt akımdan örnek alınmış ve albumin ve üre miktarı analiz edilmiştir.



Şekil 3.3. Dinamik hücre kültürü çalışmalarında kullanılan karaciğer çipi sistemine ait şema.

3.10. Sferoidlerin Analizi

3.10.1. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Kültürdeki sferoidlerin değişen günlere bağlı çoğalmaları MTT analizi ile Bölüm 3.3.2’de açıklandığı gibi analiz edilmiştir.

3.10.2. Albumin Salımının İncelenmesi

Sferoidlerden besin ortamına salınan albumin miktarı özgül antijen-antikor arasındaki reaksiyona dayanan enzime bağlı immünosorban analizi (ELİSA) ile belirlenmiştir.

Kültürün belirlenen günlerinde besin ortamından alınan örnekler Ependorf tüp içinde -80 °C’de analiz gününe kadar muhafaza edilmiştir. Albumin miktarı Albumin Human ELISA kiti (Abcam, ABD) ile ölçülmüş ve analizler kitin içeriğine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Optik yoğunluk kolorimetrik spektrofotometre (ASYS, Hitech UVM 340 plate reader, Avusturya) ile 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Albumin miktarı kalibrasyon grafiği (Ek-1) kullanılarak belirlenmiştir.

3.10.3. Gen İfadesinin Belirlenmesi

Geliştirilen sferoidlerin işlevselliğini gen ifadesi düzeyinde incelemek için gerçek zamanlı polimeraz zincir aktivitesi (RT-PCR) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda HepG2 hücrelerinde ilaç biyotransformasyonunun gerçekleştiği metabolik yol izinde yer alan sitokrom p450 1A2 (*CYP1A2*), sitokrom p450 2E1 (*CYP 2E1*) ve *ALBUMİN* genleri için bağıl gen ifadeleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen	Erişim Numarası	Primerler (5’-3’)	
β-aktin	NM_007393.5	Forward	GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG
		Reverse	GATGCCACAGGATTCCATACCC
CYP1A2	NM_000761.4	Forward	GCCTTCATCCTGGAGACCTT
		Reverse	AGCGTTGTGTCCCTTGTTG
CYP2E1	NM_000773.3	Forward	TTCAGCGGTTTCATCACCTT
		Reverse	GAGGTATCCTCTGAAAATGGTGTC
Albumin	HQ537426.1	Forward	GCACAGAATCCTTGGTGAACAG
		Reverse	ATGGAAGGTGAATGTTTCAGCA

Gerçek zamanlı polimeraz zincir aktivitesi analizi için kültürün belirli günlerinde örnekler DPBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve mikrotüpler içinde analiz gününe kadar -80°C’de saklanmıştır. Analiz günü örnekler oda sıcaklığında çözüldükten sonra 200 µL Trizol (Invitrogen, ABD) eklenmiştir. Vorteksleyici kullanılarak karıştırılan örneklerden tek basamaklı asit-fenol guanidinyum metodu kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA saflaştırılması için ise RNEasy kit (Qiagen, ABD) kullanılmıştır. İzole edilen RNA’nın konsantrasyonu ve saflaştırılma oranı Nanodrop (Thermoscientific 2000c, ABD) ile belirlenmiştir. RNA izolasyonu sonrası üretici firmanın kit için önerdiği protokol kapsamında yüksek kapasite cDNA reverse transkripsiyon kiti (Applied Biosystem, ABD)

kullanarak programlanabilir termal kontrol cihazında (Life Technologies, ABD) cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizi, SolisBioDyne 5 Hot FirePol® EvaGreen®, qPCR Mix Plus (Estonia) kitleri ile LightCycler® NanoInstrument (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. “Housekeeping gen” olarak kullanılan β -*AKTIN* ve *CYP1A2*, *CYP 2E1* ve *ALBUMIN* genleri için primer dizileri (Oligomer, Türkiye) Çizelge 3.3’te verilmiştir.

3.10.4. Üre Sentezinin İncelenmesi

Sferoidlerin sentezlediği üre miktarı Urea Assay Kit (abcam, ABD) ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Kültürün belirlenen günlerinde besin ortamından alınan örnekler -80 °C’de analiz gününe kadar muhafaza edilmiştir. Üre miktarı kit içeriğine uygun olarak analiz edilmiştir ve optik yoğunluk kolorimetrik spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sentezlenen üre miktarı kalibrasyon grafiği (Ek-2) kullanılarak belirlenmiştir.

3.11. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçları Graph-Pad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi, *Tukey-Kramer Multiple Comparison Test* kullanılmış ve p-değerinin 0.05’ten az olduğu değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Hücre Hatlarının Karakterizasyonu

Sunulan tez çalışması kapsamında hepatosit için HepG2 ve endotel için HUVEC hücre hatları kullanılmıştır. Hücrelerin 10 günlük *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin morfolojik incelemeleri optik ve floresan mikroskop altında yapılmış, üreme davranışları ise hemositometrik hücre sayımı ve MTT analizleri ile belirlenmiştir.

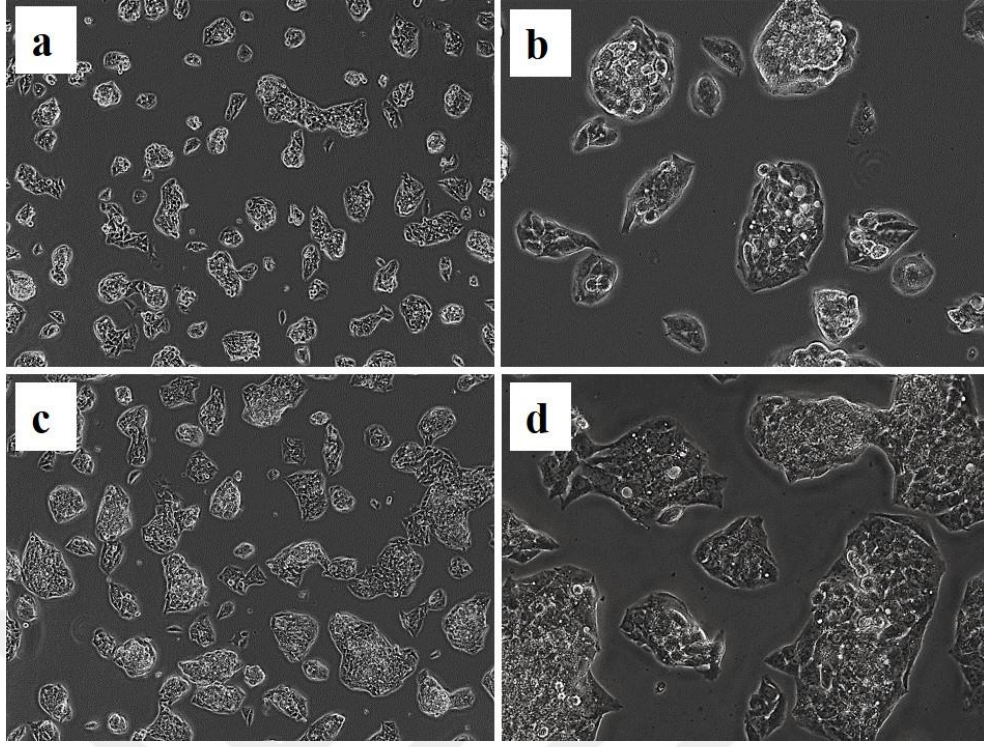
4.1.1. Hepatosit Hücre Karakterizasyonu

HepG2 hücre hattı insan karaciğerinden izole edilmiş hepatositlerdir. HepG2 birçok kaynakta hepatoselüler sarkom olarak belirtilse de yapılan moleküler genetik testler sonucunda hepatoblastoma (HB) olduğu gösterilmiştir. HB, hepatoselüler kaynaklı bir embriyonal malignitedir ve sıklıkla yaşamın ilk yıllarında ortaya çıkan ve çocuklukta en sık görülen primer karaciğer tümörüdür. Hepatoselüler karsinom, HB'ye göre çok daha kötü prognoz ve agresif davranış gösteren ve kemoterapiye daha az yanıt veren nadir bir tümördür [140].

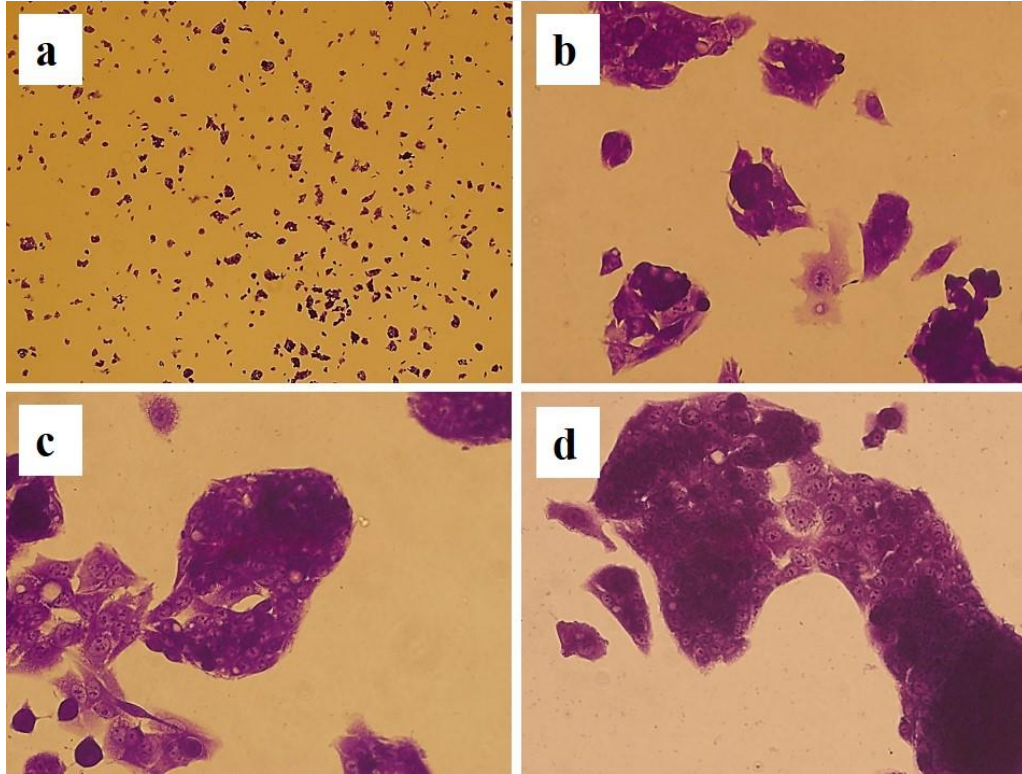
HepG2 hücrelerinin; albümin, globülin gibi kan plazmasında bulunan proteinleri sentezleyebilmesi, hepatosit hücrelerine benzerlikleri, bünyesinde CYP450 bağımlı monooksijenaz enzimlerini içermesi ve glukuronat-sülfatla birleşerek detoksifikasyon reaksiyonlarında görev alabilmesi sebebiyle karaciğer *in vitro* doku modeli geliştirilmesi çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir [141].

4.1.1.1. Hücrelerin Morfolojik Analizi

HepG2 hücrelerinin tek tabakalı kültürdeki optik mikroskop görüntüleri; hücrelerin yüzeye bağımlı ve adacıklar halinde üreyen, $24,0 \pm 4,8$ µm boyutlarında ve poligonal morfolojiye sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.1). Hücre boyutları ve morfolojik görüntüsü literatür ile uyum içindedir [142].

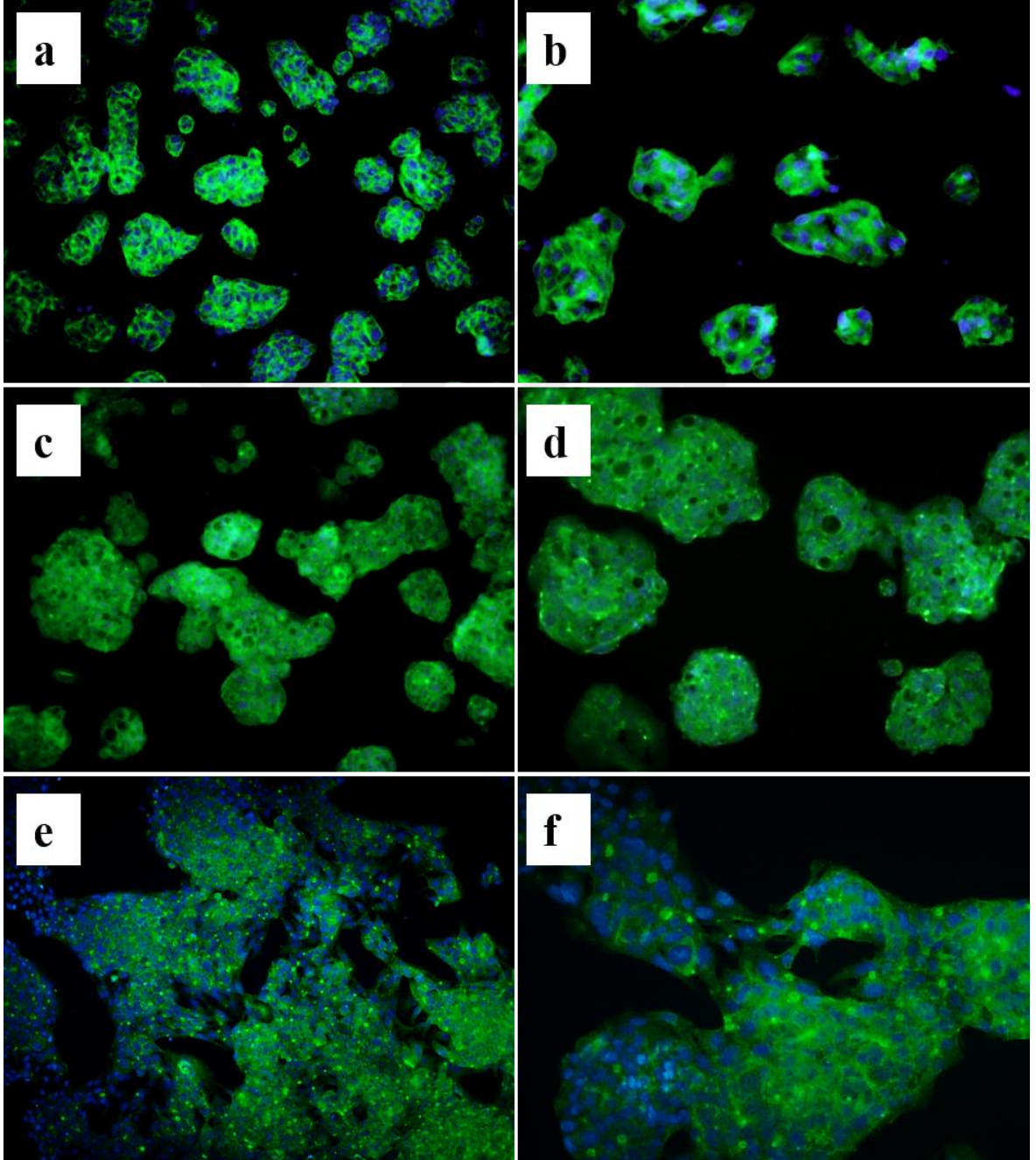


Şekil 4.1. TCPS yüzeylerde kültüre edilen HepG2 hücrelerinin farklı büyütme ve günlerde optik mikroskop görüntüleri; 1. gün a)10X ve b) 32X, 5. gün a)10X ve b) 32X.



Şekil 4.2. Kristal viyole ile boyanan HepG2 hücrelerinin farklı günlerde optik mikroskop görüntüleri; 1. gün a)10X ve b) 40X, c) 3. gün 40X, d) 5. gün 40X

Hücre morfolojisi ve çekirdeğini incelemek için kültürün 1., 3. ve 5. günlerindeki kristal viyole ile boyanan hücrelere ait farklı büyütmelelerdeki görüntüler Şekil 4.2’de verilmiştir. Elde edilen görüntülerden hücrelerin poligonal morfoloji içinde çoğunlukla bir bazen iki büyük çekirdeği olduğu görülmektedir. Ayrıca adacıklar halinde çoğalan hücrelerin artan kültür günlerine bağlı olarak daha sıkı ve birden fazla tabaka halinde çoğaldıklarını görülmektedir.



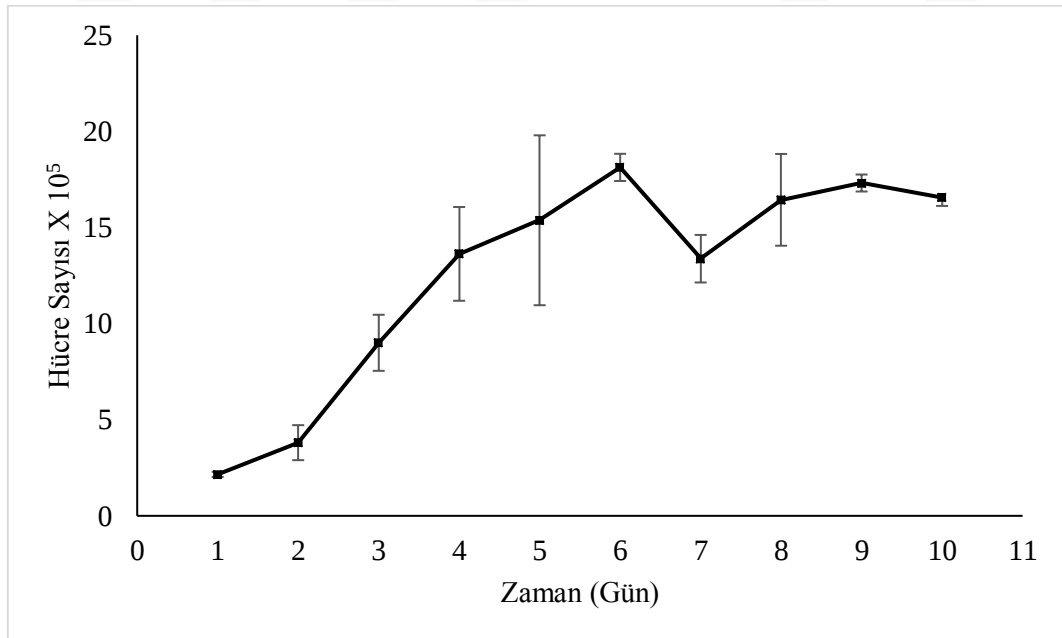
Şekil 4.3. TCPS yüzeylerdeki HepG2 hücrelerinin kültürün farklı günlerindeki floresan mikroskop görüntüleri; 2. gün a) 20X ve b) 32X, 4 gün c) 20X ve d) 32X, 6. gün e) 20X ve f) 32X.

Hücre çekirdeği ve hücre iskelet organizasyonunu incelemek amacıyla Alexa Fluor 488 phalloidin ve DAPI ile ikili boyama yapılmıştır. Floresan mikroskop görüntülerinde hücre çekirdeği mavi, aktin filamentler ise yeşil olarak görülmektedir Şekil 4.3'te kültürün 2., 4. ve 6. günlerine ait farklı büyütmelelerdeki hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir.

Hücreler karakteristik epitelyal hücre morfolojisi sergilemiştir. Hücrelerin tek çekirdek ve yoğun bir aktin filament ağına sahip olduğu gösterilmiştir. Kültürün 4. gün görüntülerinde hücrelerin daha yoğun bir hücre iskeletine sahip olduğu ve hücrelerin sıkılaştığı görülmüştür. Bu durum HepG2 hücrelerinin adacıklar halinde üreme özelliğini bir sonucu olup, özellikle bu hücrelerin sferoid üretimi için uygun bir hücre hattı olduğunu göstermektedir.

4.1.1.2. Hücre Üreme Davranışının Analizi

Hücrelerin kültür kaplarındaki üreme davranışları 10 günlük kültür boyunca her gün hemositometrik hücre sayımı ve MTT analiziyle takip edilmiştir. Hemositometrik sayım sonucu hesaplanan hücre sayısı değerlerinin (Şekil 4.4) ve MTT analizinden elde edilen optik yoğunluk değerlerinin (Şekil 4.6) zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle hücre büyüme eğrisi elde edilmiştir.



Şekil 4.4. TCPS yüzeylerdeki HepG2 hücrelerinin hemositometrik sayım sonucu elde edilen üreme grafiği.

Şekil 4.4'te verilen grafiğe göre hücreler ilk gün kültüre adapte olduktan sonra (gecikme fazı) aktif üreme fazına (logaritmik faz) geçmiştir. Dört gün aktif olarak çoğalan hücrelerde kültürün 6. gününden sonra besin ortamı bileşenlerinin difüzyon sınırlaması ve kontak inhibisyona bağlı olarak hücre çoğalması yavaşlayarak hücreler durgun faza girmiştir.

Hücre üremesi logaritmik fazdaki özgül hücre üreme hızı (μ) ve hücre ikilenme süresi (t_d) ile karakterize edilmektedir. Logaritmik fazdaki hücreler için üreme hızı Eşitlik 4.1 ile ikilenme süresi ise Eşitlik 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

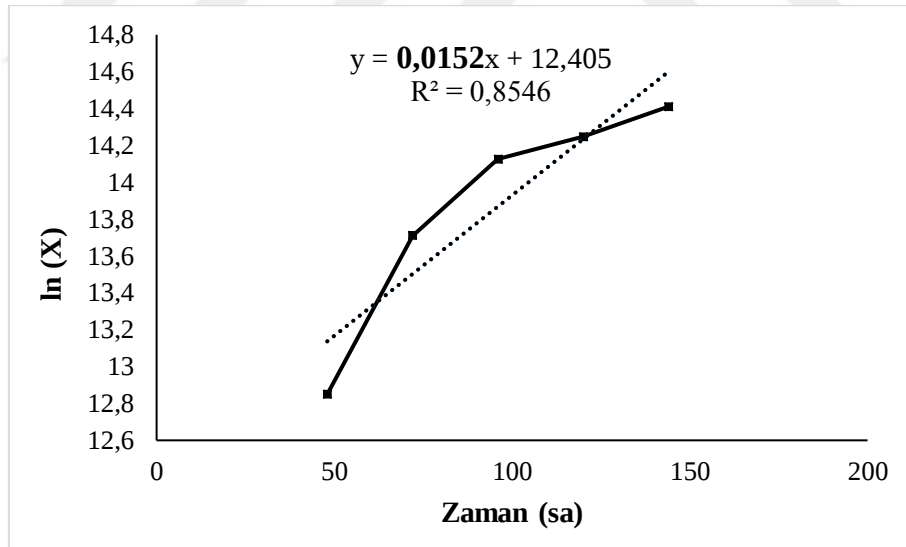
$$dx/dt = \mu x \quad (\text{Eşitlik 4.1})$$

Burada x , hücre sayısını, μ , özgül üreme hızını ve t de zamanı ifade etmektedir. Eşitlik 4.1 düzenlendiğinde Eşitlik 4.2 elde edilir.

$$\ln x = \mu t \quad (\text{Eşitlik 4.2})$$

Hücre ikilenme süresi, hücre sayısının iki katına çıkmasından dolayı x yerine 2 yazılması ile hesaplanır.

$$t_d = \ln(2)/\mu \quad (\text{Eşitlik 4.3})$$

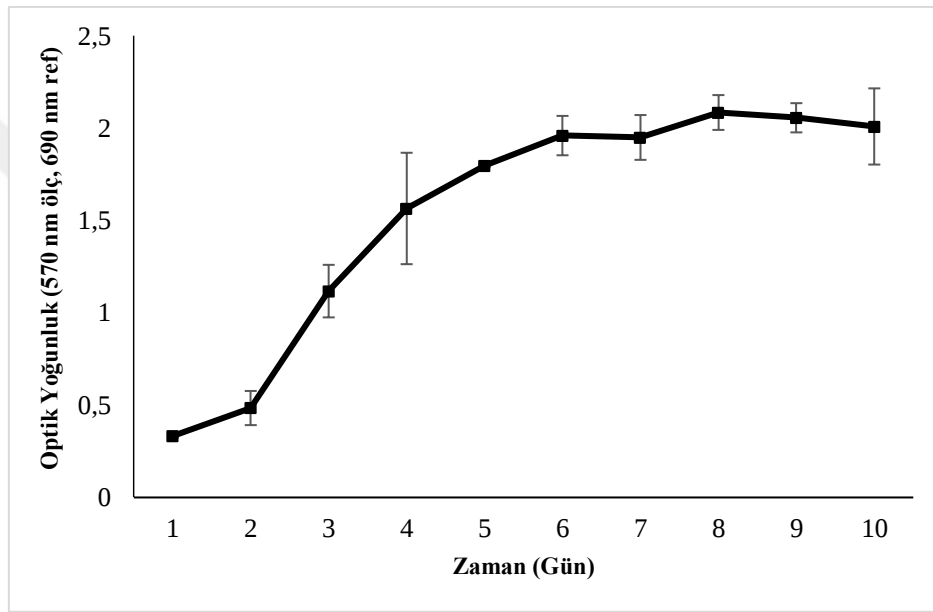


Şekil 4.5: HepG2 hücrelerine ait $\ln(X)$ - t grafiği.

Eşitlik 4.2'de belirtildiği üzere $\ln x$ 'e karşı zaman grafiğinin eğimi hücrelerin özgül üreme hızını vermektedir. Şekil 4.5'te verilen grafiğe göre HepG2 hücrelerinin özgül üreme hızı 0.015 sa^{-1} , ikilenme süresi ise 45 sa olarak hesaplanmıştır. İlgili literatür incelendiğinde HepG2 hücrelerinin ikilenme süresinin 41-48 saat civarında olduğu belirtilmiştir [143, 144].

Karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen ikilenme süresinin literatürde belirtilen aralıkta olduğu görülmüştür.

Şekil 4.6'da mitokondriyal aktivite analizi sonucunda elde edilen optik yoğunluk değerlerine karşı zaman grafiği verilmiştir. MTT analizi ile oluşturulan hücre üreme grafiği hemositometrik sayım sonucu elde edilen grafik ile benzer bir profil sergilemektedir. Hücre sayısına karşılık elde edilen MTT değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Her iki üreme grafiğinde de gecikme, logaritmik artış ve durgun faz yer alırken 10 günün sonunda ölüm fazı gözlenmemiştir.



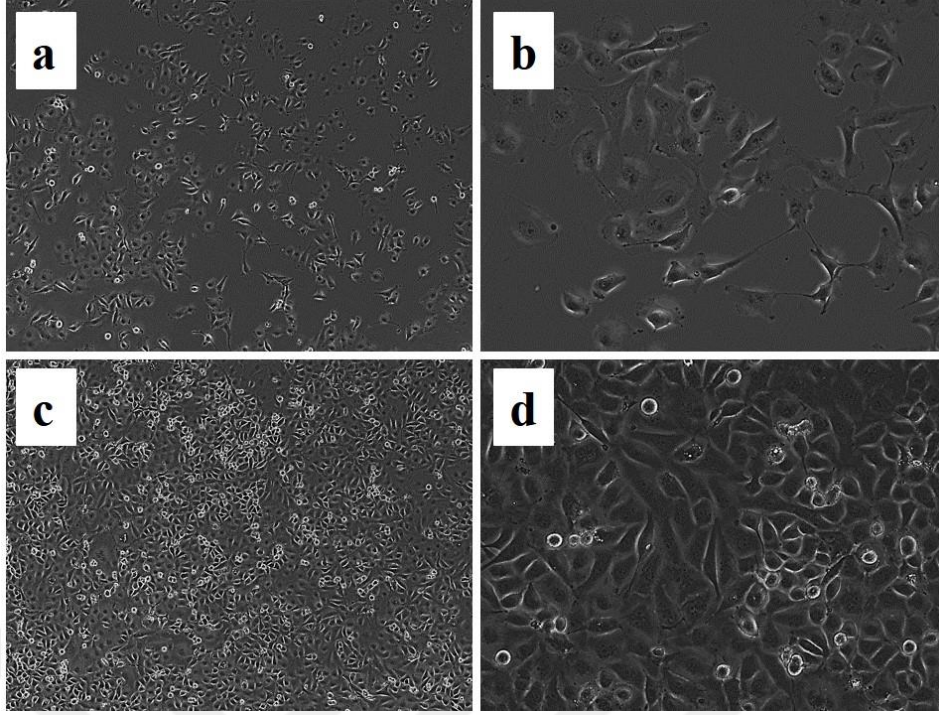
Şekil 4.6. TCPS yüzeylerdeki HepG2 mitokondriyal aktivite analizi sonucu elde edilen üreme grafiği.

4.1.2. Endotel Hücre Karakterizasyonu

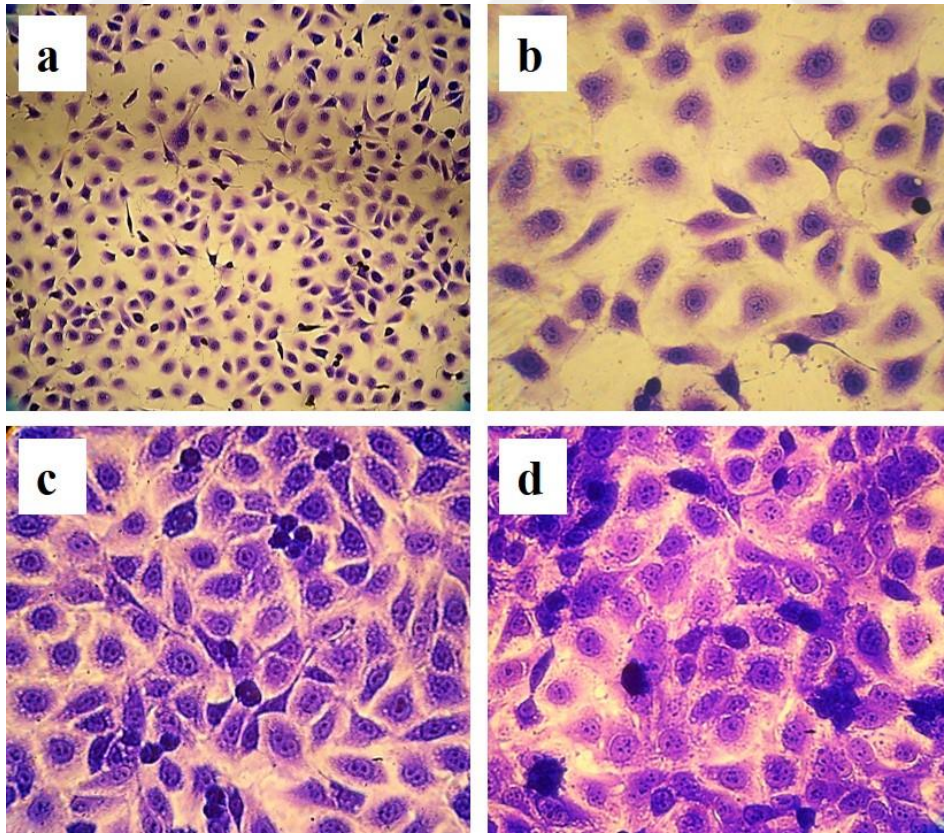
İnsan göbek kordonundan izole edilen insan göbek kordonu ven endotel (HUVEC) hücreleri, uzun zamandan beri damar oluşumu çalışmalarında sıklıkla kullanılan endotel hücre hattıdır.

4.1.2.1. Hücrelerin Morfolojik Analizi

Optik mikroskop görüntüleri hücrelerin yüzeye bağımlı olarak üreyen, tek katlı, yassı, 37 ± 7 μm boyutlarında, poligonal morfolojiye sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7).

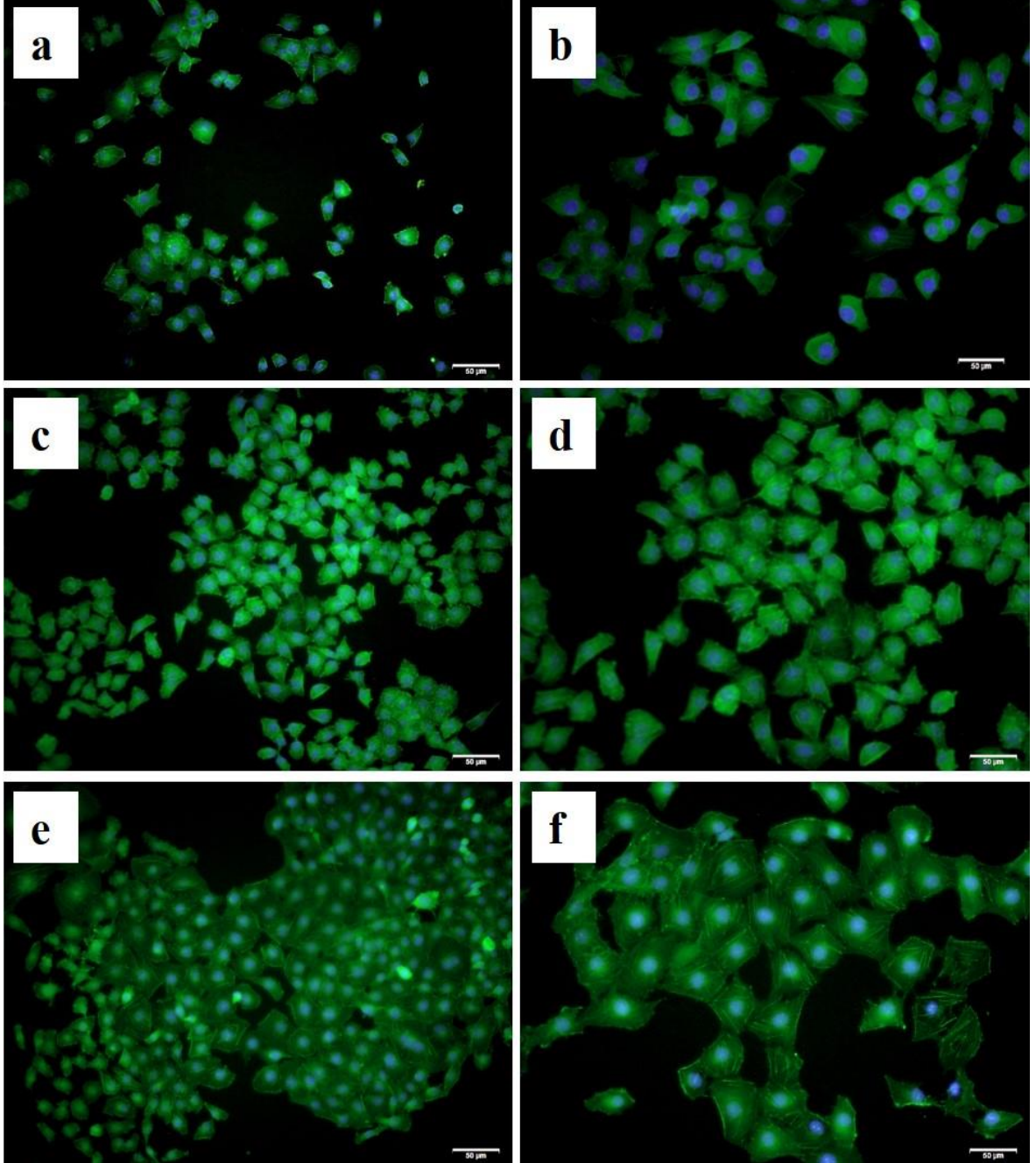


Şekil 4.7. TCPS yüzeylerde kültüre edilen HUVEC hücrelerinin farklı günlerdeki optik mikroskop görüntüleri; 1. gün a)10X ve b) 32X, 5. gün a)10X ve b) 32X.



Şekil 4.8. Kristal viyole ile boyanan HUVEC hücrelerinin farklı günlerdeki optik mikroskop görüntüleri; 1. gün a)10X ve b) 40X, c) 3. gün 40X ve d) 5. gün 40X.

Hücre morfolojisi ve çekirdeğini incelemek için kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde kristal viyole boyaması yapılmıştır. Şekil 4.8’te verilen görüntülerde hücre çekirdeklerinin, hücre sitoplazmasından daha koyu boyandığı görülmektedir [145]. Elde edilen görüntüler hücrelerin poligonal morfolojide olduklarını ve hücre çekirdeklerinin lümeneye doğru kabarık, yassı ve oval olduklarını göstermiştir.



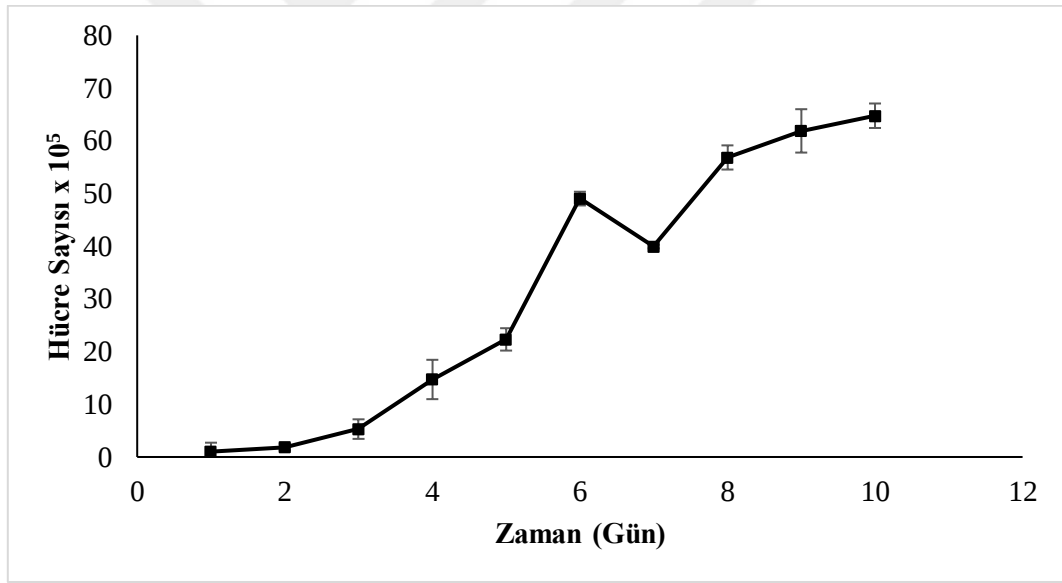
Şekil 4.9. TCPS yüzeylerdeki HUVEC hücrelerinin kültürün farklı günlerindeki floresan mikroskop görüntüleri; 2. gün a) 20X ve b) 32X, 4 gün c) 20X ve d) 32X, 6. gün e) 20X ve f) 32X.

Hücre çekirdeği ve hücre iskelet organizasyonunu incelemek amacıyla Alexa Fluor 488 phalloidin ve DAPI ile ikili boyama yapılmıştır. Floresan mikroskop görüntülerinde hücre çekirdeği mavi, aktin filamentler ise yeşil olarak görülmektedir. Kültürün 2., 4. ve 6. günlerine ait hücrelerin farklı büyütmelerdeki floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.9’da verilmiştir.

Hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri optik mikroskop ile benzer şekilde karakteristik endotel hücre morfolojisi sergilemiştir. Hücreler merkezde tek çekirdek ve çevresinde hücrelere yapısal destek sağlayan yoğun bir aktin filament ağı sahiptir.

4.1.2.2. Hücre Üreme Davranışının Analizi

HUVEC hücrelerine ait büyüme eğrileri; hemositometrik sayım sonucu hesaplanan hücre sayısının (Şekil 4.10) ve MTT analizinden elde edilen optik yoğunluk değerlerinin (Şekil 4.12) zamana karşı çizilen grafikleri ile elde edilmiştir.

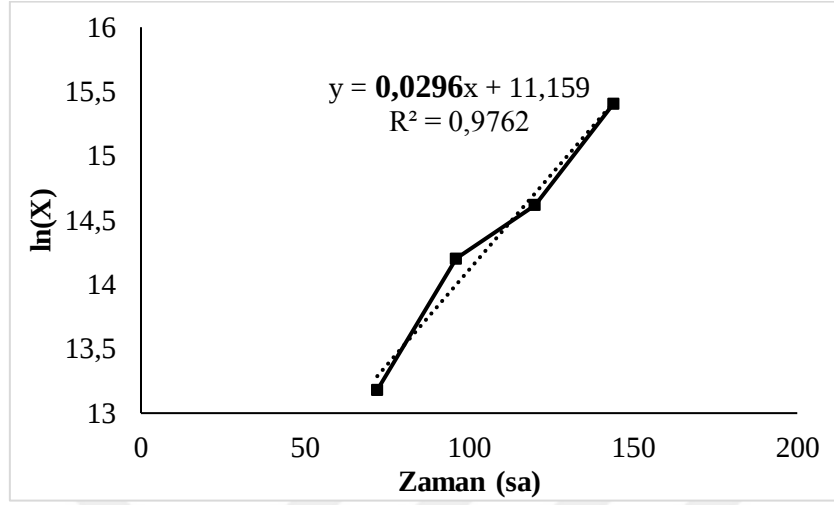


Şekil 4.10. TCPS yüzeylerdeki HUVEC hücrelerinin hemositometrik sayım sonucu elde edilen üreme grafiği.

Şekil 4.10’da verilen grafiğe göre hücreler 2 günlük gecikme fazından sonra 3. günden itibaren logaritmik faz geçmiştir. Hücrelerde kültürün 6. gününden sonra kontak inhibisyona bağlı olarak hücre çoğalması yavaşlamış ve durgun faza geçmiştir.

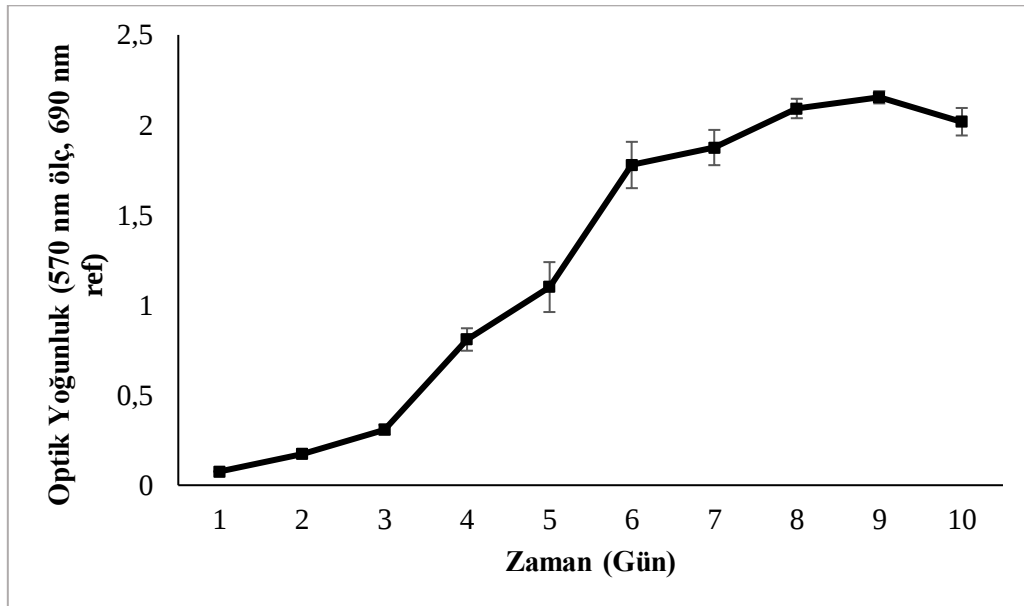
Şekil 4.11’de yer alan $\ln(X) - t$ grafiğinden HUVEC hücrelerinin özgül üreme hızı 0.0296 sa^{-1} , ikilenme süresi ise Bölüm 4.1.3’te yer alan eşitlikler kullanılarak 23 saat olarak

hesaplanmıştır. Daha önce grubumuz tarafından yürütülen karakterizasyon çalışmaları sonucu elde edilen ikilenme süresi 24 sa olarak bulunmuş olup literatür ile uyumludur [145].



Şekil 4.11. HUVEC hücrelerine ait ln(X) - t grafiği.

HUVEC'lerin ait mitokondriyal aktivitelere bağlı olarak oluşturulan üreme grafiği hücre sayımı ile uyumlu olarak, hücrelerin kültüre 2 günde adapte oldukları ve arkasında 4 gün boyunca aktif olarak çoğaldıkları gözlenmiştir. Kültürün 6. ve 10. günleri arasında hücre üremesi yavaşlamış ve 10. günden itibaren hücreler ölüm fazına girmiştir.

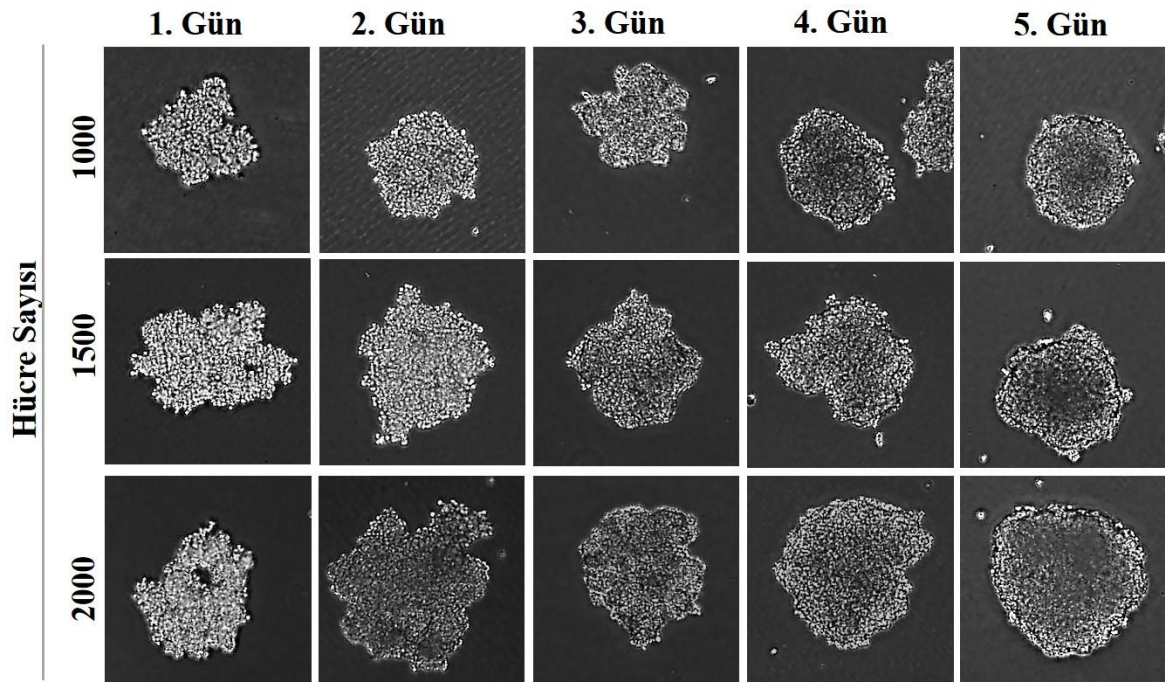


Şekil 4.12. TCPS yüzeylerdeki HUVEC hücrelerinin mitokondriyal aktivite analizi sonucu elde edilen üreme grafiği.

4.2. Sferoidlerin Oluşturulması ve Karakterizasyonu

Hücre süspansiyonunda sferoid oluşturmak için çok çeşitli yöntemler mevcut olup bu yöntemler içinde asılı damlacık yöntemi çok sayıda sferoidi kolay, ucuz ve homojen boyut dağılımına sahip şekilde üretimine izin verdiği için avantajlıdır. Bu nedenle tez kapsamında asılı damlacık yöntemi ile sferoid üretimine karar verilmiştir.

Sferoidler ile yapılacak çalışmalarda sferoid boyutu, bileşimi ve üretim süresi hücrelerin canlılığı ve işlevselliği açısından önemlidir. Uygun bileşim ve sferoid boyutuna ulaşmak için öncelikle optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla HepG2 hücreleri ve HUVEC hücreleri 1:1 oranında karıştırılmış ve 1000, 1500 ve 2000 hücre içerecek şekilde sferoid üretimi yapılmıştır. Sferoid oluşumu 5 gün boyunca optik mikroskop altında takip edilmiştir.



Şekil 4.13. Farklı sayıda hücre içeren HepG2+HUVEC (1:1) sferoidlerin 5 günlük optik mikroskop görüntüleri (10X).

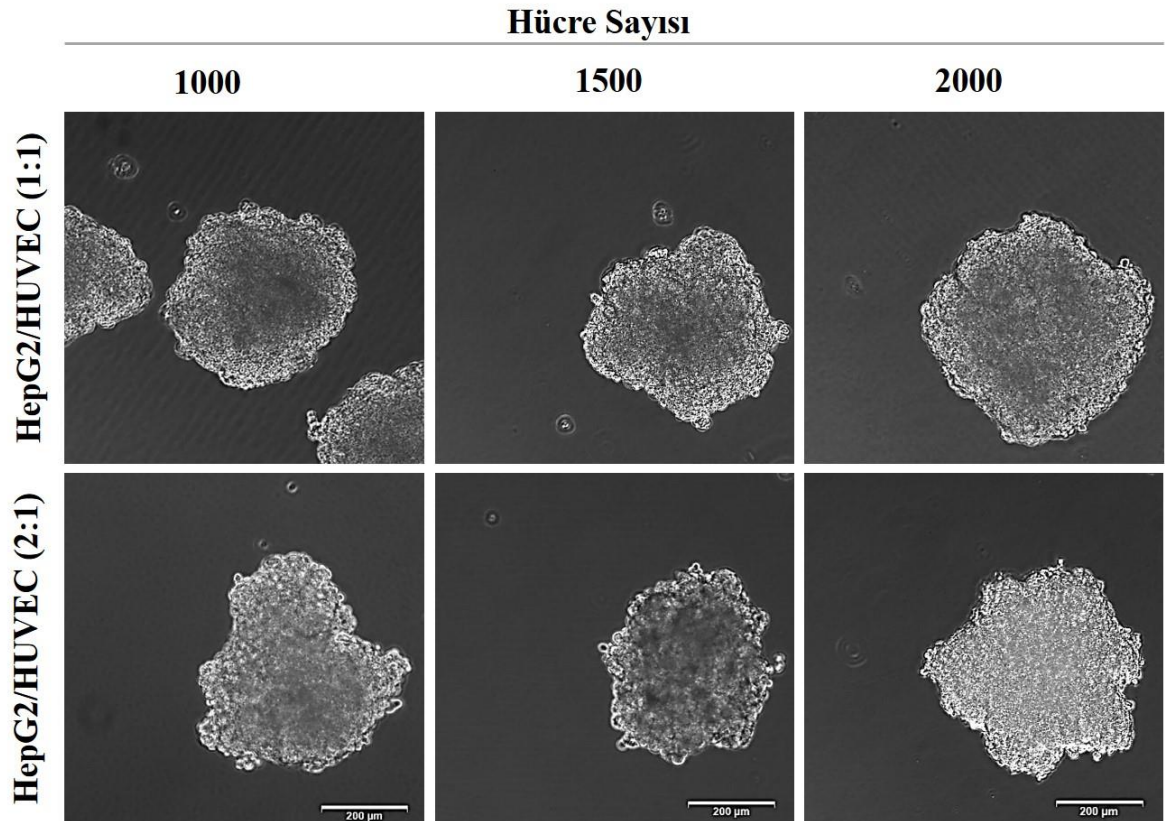
Sferoid üretimi birbirini takip eden 3 fazdan oluşmaktadır. Şekil 4.13’de verilen optik mikroskop görüntüleri incelendiğinde bütün gruplar için ilk gün hücrelerin bir araya geldiği agregasyon fazı gerçekleşmiştir. Hücre sayısı arttıkça agregasyon fazının süresi artmaktadır. Agregasyon fazından sonra hücre sayısına bağlı olarak değişen sürelerde gecikme fazı gerçekleşmiştir. Bu süre 1000 hücre için 1 gün iken, 2000 hücre içeren sferoidler için 2 gündür. Gecikme fazı sonrasında sferoidler tam bir küresel forma ulaşmıştır. Bu fazda hücre-

hücre bağlantıları artmış olduğu için yapı sıkılaşır ve sferoid yüzeyinde optik mikroskop ile bakıldığında bir çizgi çizilmiş gibi sınır oluşur. Bu sınır 1000 hücre içeren sferoid için 4. günde gözlenirken 1500 ve 2000 hücre için 5. günde gözlenmiştir.

Yip ve ark. 2 günlük inkübasyon sonucu, Kelm ve ark. ise 5 günlük inkübasyon sonunda ise fonksiyonel sferoidler elde etmiştir [146, 147]. Çalışmamızda sferoid üretimi için 5 gün inkübasyon süresinin homojen ve küresel form kazanması için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2.1. Sferoid Çapının Belirlenmesi

HepG2 ve HUVEC hücreleri ile sferoid üretimi için 5 günlük inkübasyon süresine karar verildikten sonra optimizasyon çalışmalarına sferoid bileşiminin belirlenmesine yönelik olarak devam edilmiştir. Bu amaçla 1000, 1500 ve 2000 hücre içeren sferoidler 1:1 ve 2:1 (HepG2:HUVEC) oranında karıştırılarak üretilmiştir. Sferoidler 5 gün inkübe edildikten sonra optik mikroskop görüntüleri alınmış ve bu görüntüler Image J programında analiz edilerek sferoid çapı belirlenmiştir.

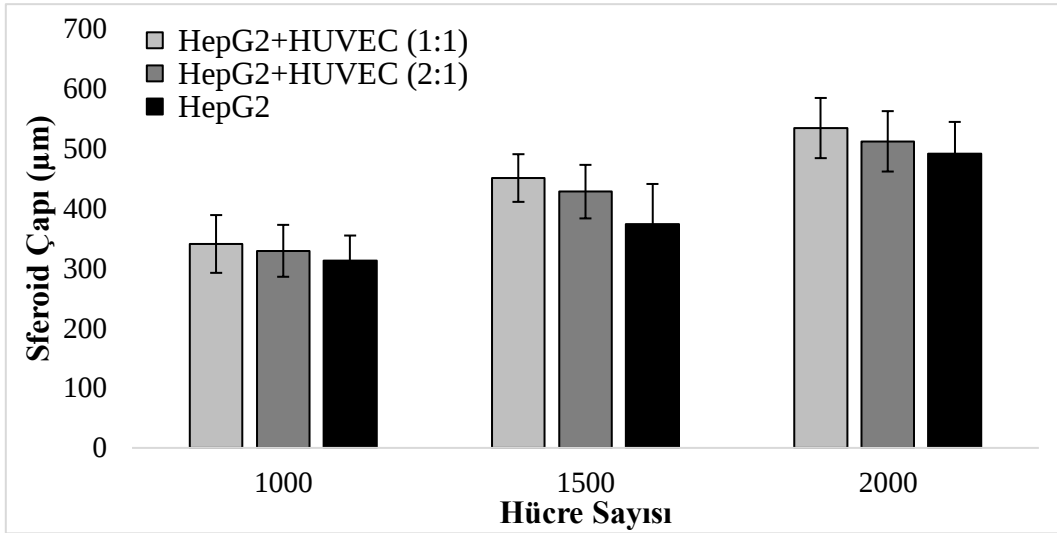


Şekil 4.14. Farklı sayıda ve oranda hücre içeren sferoidlerin optik mikroskop görüntüleri (10X).

Doğal dokularda çok sayıda ve farklı tipteki hücreler organize olarak çoklu işlevleri yerine getirmektedir. Geliştirilmekte olan *in vitro* model sistemler; hücrelerin çeşidi, sayısı, konumu, birbirleri ve çevreleri ile olan etkileşimler dikkate alınarak dizayn edilmektedir. Önemli tasarım parametrelerinden biri olan farklı tipteki hücrelerin oranı; albümin ve üre sentezi gibi hepatositlerin işlevlerine ve polarizasyonuna etki etmektedir. Sağlıklı bir karaciğerin yapısında hepatositlerin endotel hücreye oranı 10:1'dur [148, 149]. Ucciferri ve ark. *in vitro* kokültür çalışmalarında hücrelerin birbirine olan oranının belirlenmesi için i) hücre metabolizma ve yüzey oranı (hepatosit basal metabolizma ve endotel yüzey alanına göre ölçeklendirme) ve ii) hücre sayılarının oranı olmak üzere iki farklı yaklaşım olduğunu ve bu yaklaşımlardan hücre sayısına göre oranlamanın daha uygun olduğunu belirtmiştir [148]. Guzzardi ve ark. karaciğerdeki hücre sayısı oranını dikkate alarak tasarladıkları çalışmada farklı tipteki hücrelerin birbiri ile olan etkileşiminin hücre işlevselliğini arttırdığını ortaya koymuştur [149]. Chiew ve ark. ise hücre oranının etkisini endotel hücre farklılaşması ve vaskülarizasyon açısından incelemiştir. En yüksek endotel hücre farklılaşması ve en hızlı tübüler yapı oluşumu 2:1 (HepG2:HUVEC-C3) oranında gerçekleşmiştir [150].

Şekil 4.14'te yer alan optik mikroskop görüntülerinde artan hücre sayısına bağlı olarak sferoidlerde çap artışı dışında morfolojik olarak bir fark gözlenmemiştir. Fakat HepG2 ve HUVEC hücrelerinin TCPS yüzeylerde kültürü yapılırken HUVEC hücrelerinin çok hızlı çoğalarak hepatositleri baskıladığı gözlenmiştir. Hücre karakterizasyon çalışmalarında HUVEC hücrelerinin ikilenme süresinin HepG2 hücrelerinden daha kısa bulunmuş olması TCPS yüzeylerde görülen bu davranışın sebebini açıklamaktadır. HUVEC hücrelerinin hepatositleri baskılaması ve literatürde yer alan çalışmalar göz önünde bulundurularak tezin ilerleyen çalışmalarında HepG2: HUVEC oranının 2:1 olmasına karar verilmiştir.

Sferoid çapı hücrelerin canlılığını etkileyen en önemli parametredir. Dokular için 200-250 µm boyut difüzyon limiti olup 400-500 µm çapından büyük sferoidlerin kullanımı sferoidin iç bölgelerinde hipoksi ile sonuçlanarak nekrotik bir bölge oluşmasına neden olur [47]. Optik mikroskop görüntülerinin Image J programında analiz edilmesi sonucu bulunan çap değerleri Şekil 4.15'te verilmektedir. Üretilen sferoidlerin ortalama çapları HepG2+HUVEC(1:1) için sırasıyla 340±48, 451±40 ve 534±50 µm; HepG2+HUVEC(2:1) için 329±43, 428±45 ve 512±50, µm ve HepG2 için 313±41, 374±66 ve 491±53 µm olarak bulunmuştur.

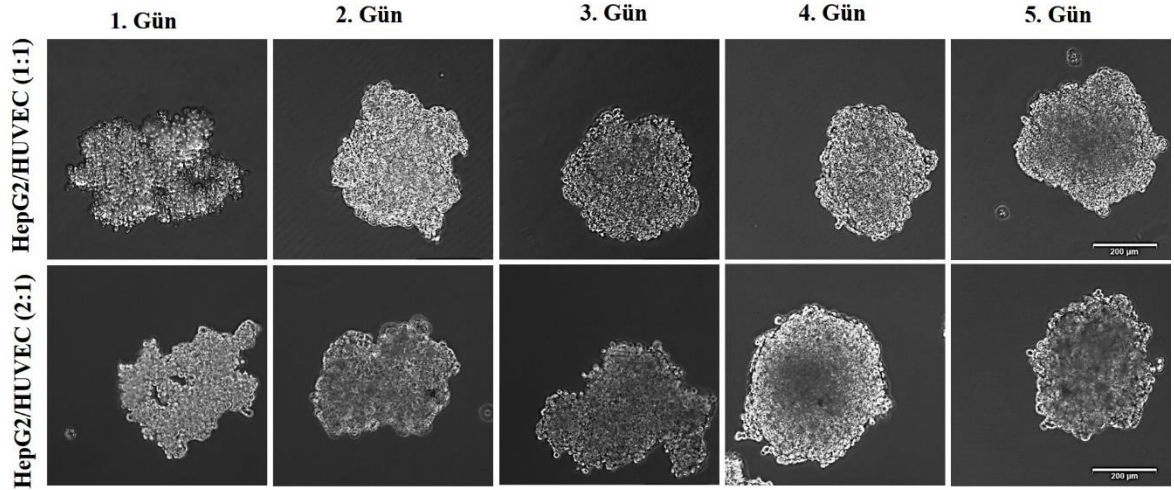


Şekil 4.15. Farklı sayıda ve oranda hücre içeren sferoidlerin çap değerleri.

Optik mikroskop görüntüleri ile benzer şekilde artan hücre sayısına bağlı olarak sferoid çapı artmıştır. Difüzyon limiti göz önünde bulundurulduğunda 1500'den fazla hücre içeren sferoidlerin kullanılamayacağına karar verilmiştir. Tezin ilerleyen kısımlarında 2:1 oranında 1500 hücre içeren sferoidler ile çalışılmıştır.

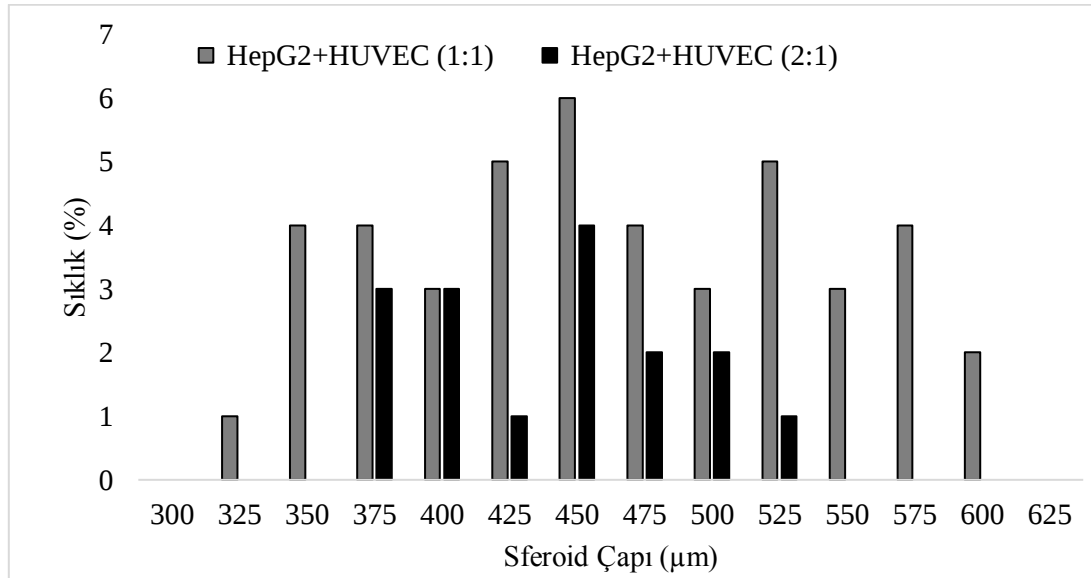
Şekil 4.15'ten çıkarılacak bir başka sonuç ise aynı sayıda hücre içermesine rağmen farklı oranda hücre içeren sferoidlerin çaplarının farklı olmasıdır. Farklı hücre sayısı içeren tüm gruplarda 2:1 oranında karıştırılan sferoidlerin 1:1 oranında karıştırılan sferoidlerden daha küçük çapa sahip olduğu görülmüştür. Heterosferoidlerde toplam hücre sayısı sabit tutulduğu için hücre oranı 1:1 den 2:1 değiştirildiğinde hepatosit sayısında artış gerçekleşmiştir. Farklı oranda karıştırılan bu sferoidlerdeki çap değişimi hücre boyutları ile ilişkilendirilebilir. Yapılan karakterizasyon çalışmalarında HepG2 hücreleri 24 µm boyutlarında iken HUVEC'ler 37 µm'dir. HUVEC sayısının azalması sferoid çapının azalmasına sebep olmuştur.

Sferoidlerin farklı oranda karıştırılmasının sferoid morfolojisine olan etkisini gözlemlemek için 5 gün boyunca optik mikroskop ile inceleme yapılmıştır. Hücre oranının değiştirilmesinin morfolojik ve inkübasyon süresi açısından bir farklılık oluşturmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Farklı oranda karıştırılmış 1500 hücre içeren heterosferoidlerin 5 günlük optik mikroskop görüntüleri (10X).

Tezin ilerleyen aşamalarında üretilen sferoidler mikroakışkan bir cihazın kanallarına yerleştirileceği için aynı büyüklükte olmaları gerekmektedir. Şekil 4.17’de 1500 hücre içeren sferoidlerin optik mikroskop görüntülerinden elde edilen sferoid çap dağılım grafiği bulunmaktadır. HepG2+HUVEC 2:1 oranında karıştırıldığında 375-525 µm aralında dağılım gösterirken 1:1 oranında karıştırıldığında 325-600 µm aralında dağılım gösterir. Sferoid yapısına katılan HUVEC miktarı arttıkça sferoid çapı daha geniş bir aralıkta dağılım göstermiştir.



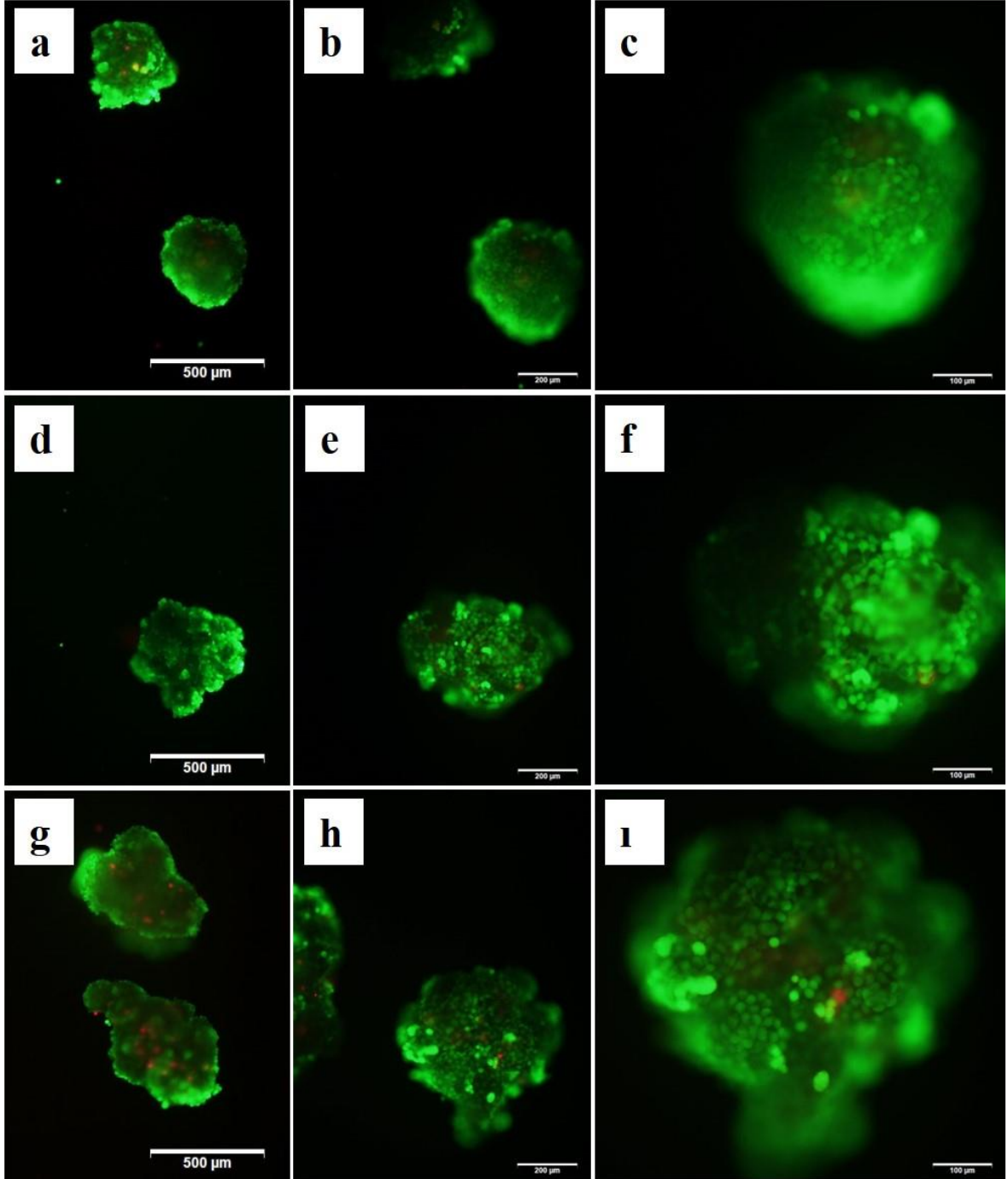
Şekil 4.17. Farklı oranda karıştırılmış 1500 hücre içeren heterosferoidlerin çap dağılımı.

4.2.2. Sferoid Canlılığının Belirlenmesi

İnsan vücudunda dokular ihtiyaç duydukları besinler (glikoz, aminoasit vb.), gazlar (oksijen, karbondioksit), biyosinyal moleküller (büyüme faktörleri, hormonlar vb.), metabolitler (albümin, üre vb.) ve uzaklaştırmak istedikleri atıkları (amonyak, laktat vb.) vasküler sistem aracılığı ile taşımaktadır. Vücudumuzdaki hemen her hücre bir kan damarına yakındır. Genel olarak, bir dokunun 200 μm 'nin ötesinde büyümesi için yeni kan damarı oluşumu gereklidir. Laboratuvarı üretilen *in vitro* doku mühendisliği ürünlerinin vasküler ağdan yoksun olması sebebiyle 200 μm bu dokular için difüzyon limitidir [151].

Sferoidlerin önemli bir özelliği 200 μm mesafelerdeki difüzyon limitine bağlı oksijen, besin dağılımı, metabolik atık birikimi ve proliferasyon profili gradyanları göstermeleridir. Sferoid çapı 400 - 500 μm 'den daha yüksek olduğunda; nekrotik bir çekirdek onu çevreleyen canlı hücreler ve en dışta proliferasyon yapan hücrelerin oluşturduğu küresel bir yapı ortaya çıkar. Buna dayanarak 500 μm avasküler sferoidler için bir sınır oluşturur [47].

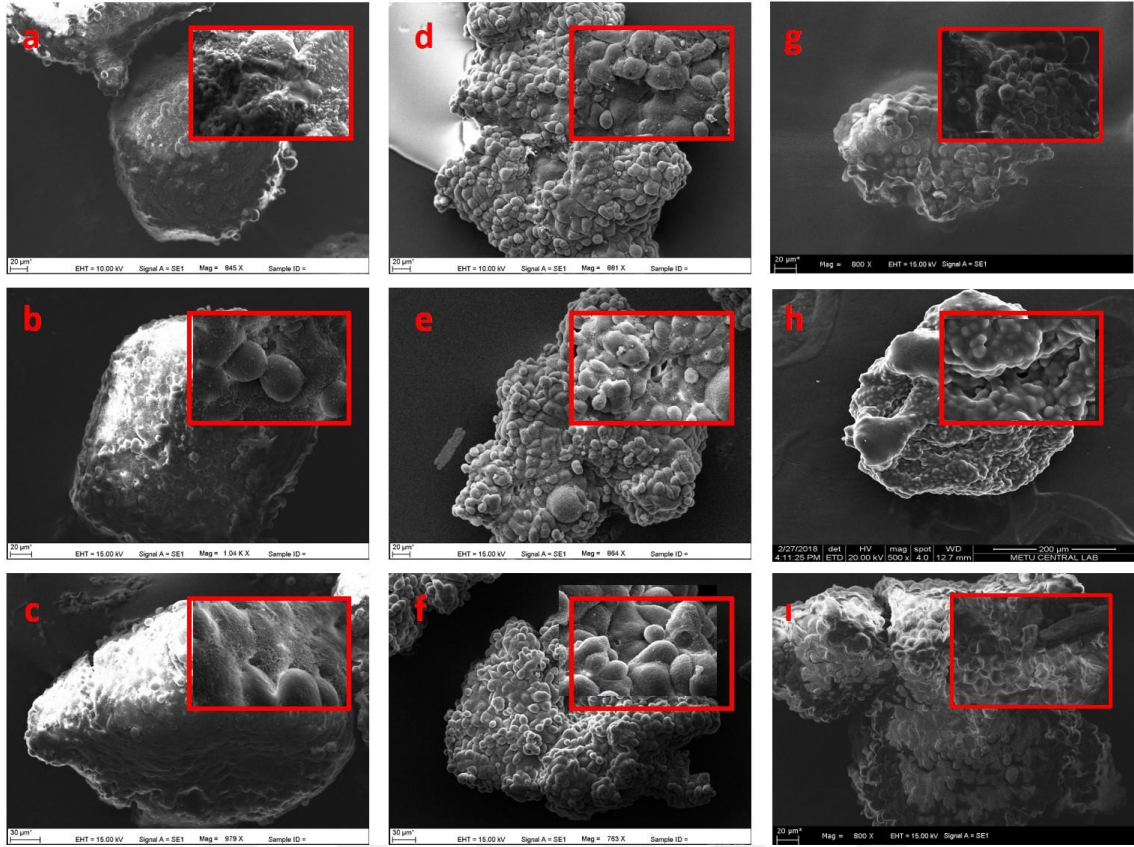
Sferoidi oluşturan hücrelerin canlılıklarını belirlemek için canlı – ölü boyama yapılmıştır. Floresan mikroskop görüntülerinde canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı renkte boyanırlar. Şekil 4.18'de verilen mikroskop görüntülerinde bütün gruplarda canlı hücre oranının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Grupları kendi aralarında karşılaştıracak olursak hücre sayısı arttıkça ölü hücre sayısı artmıştır. Özellikle 2000 hücre içeren sferoidlerde merkezde ölü hücrelerin yoğunlaşması difüzyon limitine bağlı hücre ölümlerinin başladığını göstermektedir.



Şekil 4.18. Farklı sayıda hücre içeren HepG2+HUVEC (2:1) sferoidlerinin canlı ölü boyama floresan mikroskop görüntüleri; 1000 hücre/sferoid a) 4X, b) 10X ve c) 20X; 1500 hücre/sferoid d) 4X e) 10X ve f) 20X; 2000 hücre/sferoid g) 4X, h) 10X ve i) 20X.

4.2.3. Sferoidlerin Morfolojik Analizi

Sferoidlerin morfolojisini incelemek amacıyla 1000, 1500 ve 2000 hücre içeren 1:1 ve 2:1 oranında birleştirilmiş HepG2+HUVEC heterosferoidleri ile sadece HepG2 hücrelerinden oluşan homosferoidleri SEM ile analiz edilmiş ve görüntüler Şekil 4.19’da sunulmuştur.

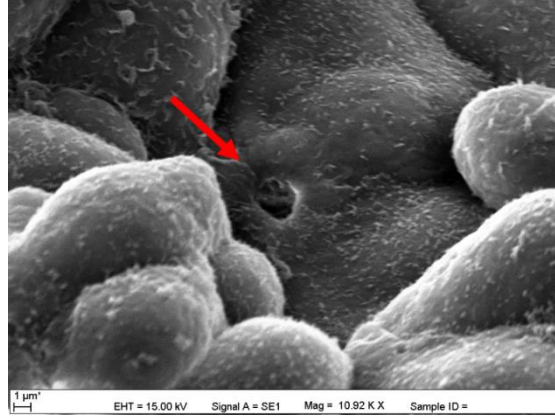


Şekil 4.19. Farklı sayıda ve oranda hücre içeren sferoidlerin SEM görüntüleri: HepG2 a) 1000, b) 1500 ve c) 2000; HepG2+HUVEC (1:1) d) 1000, e) 1500 ve f) 2000; HepG2+HUVEC (2:1) g) 1000, h) 1500 ve i) 2000.

Sferoidlerin küresel yapılarını incelediğimizde optik mikroskop görüntüleri ile benzer şekilde artan hücre sayısına bağlı olarak sferoid çapının arttığı göze çarpmaktadır. HepG2 sferoidlerinin HepG2+HUVEC sferoidlerine göre sınırlarının daha belirgin ve daha küresel yapıda oldukları görülmektedir. HepG2+HUVEC sferoidlerinin bu küresellikten sapan yapısının HepG2 ile HUVEC hücreleri arasında gerçekleşen hücre sıralanma prosesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sferoid yüzeyinde yer alan hücrelerin farklı yüzeye sahip olması HUVEC'lerin dış yüzeye doğru hareket ederek hücre sıralanma davranışı gösterdiğini doğrular niteliktedir.

Ayrıca SEM görüntülerinde yer alan kürenin dış yüzeyindeki porlar kürenin merkezine doğru açılan kanalların varlığını göstermektedir (Şekil 4.20). Bu kanallar vasıtasıyla hücresel kürenin merkezine doğru besin, oksijen akışı ve atıkların uzaklaştırılması gerçekleşmektedir. Ayrıca bu porların çapı 2-3 µm olarak bulunmuş olup karaciğerdeki safra

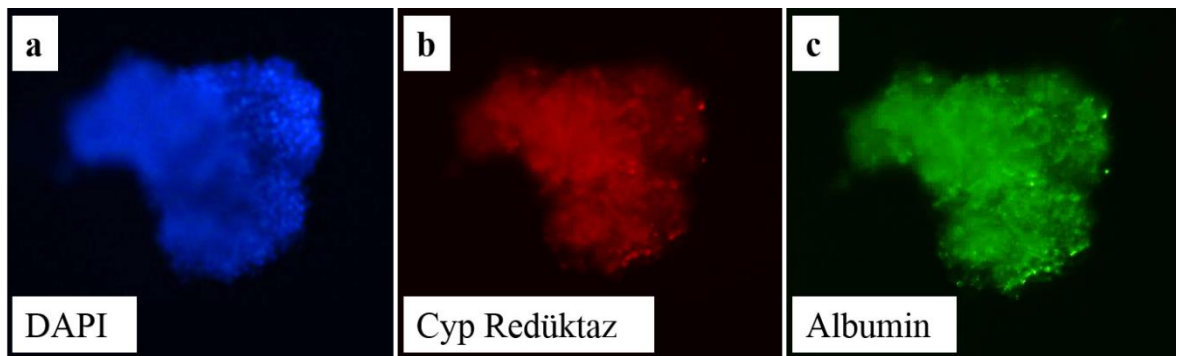
kanalcıkları (1-3 μm) ile benzer özelliktedir [152]. Literatür ile uyumlu elde edilen sonuçlar çalışmamız kapsamında fonksiyonel hücresel küreler elde edeceğimizi göstermektedir.



Şekil 4.20. Sferoid yüzeyindeki gözenegin SEM görüntüsü.

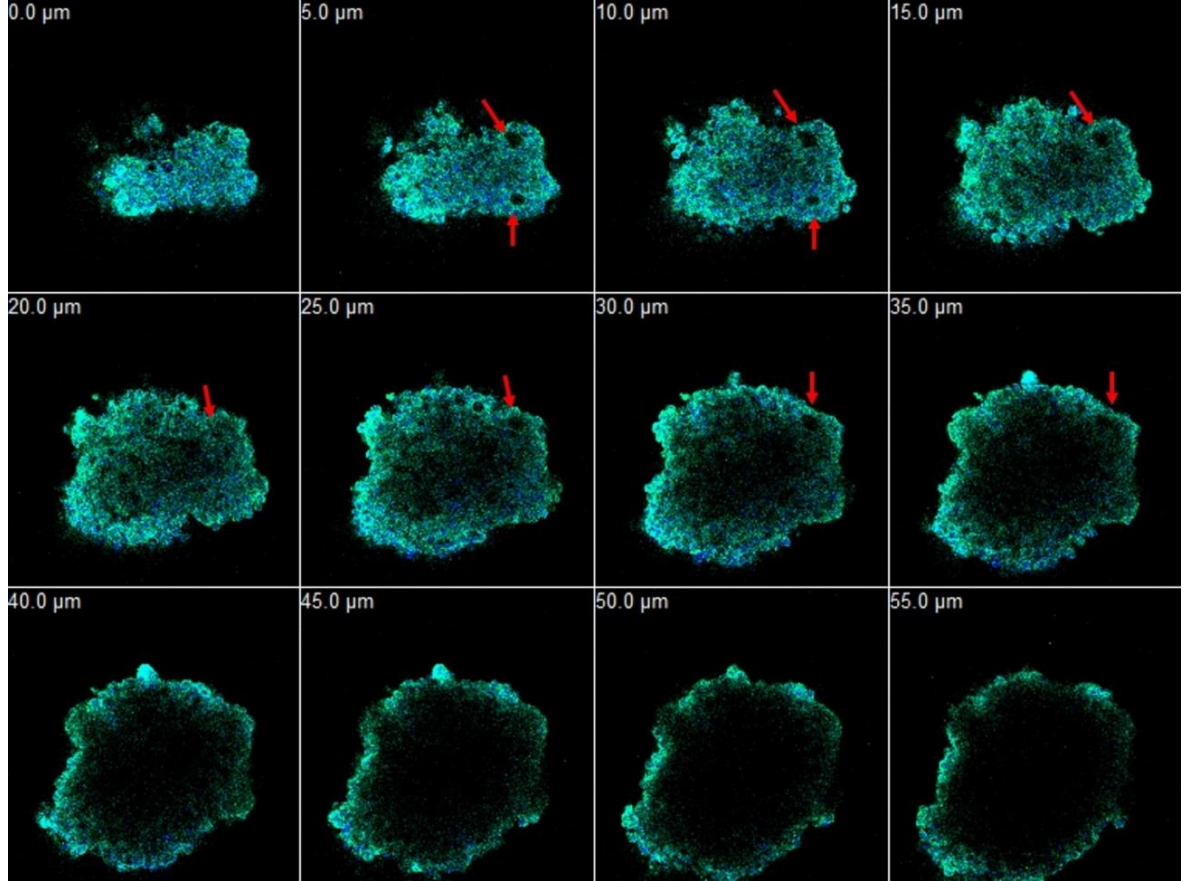
4.2.4. Sferoidlerin İmmünohistokimyasal Görüntülenmesi

Geliştirilmek istenen karaciğer modelinin fonksiyonalitesini ve etkinliğini değerlendirmek için antikor boyama yapılmıştır. Karaciğerin spesifik fonksiyonu olan albümin sentezini ve ilaç dönüşümünü devam ettirdiğini belirlemek için albumin proteinine ve ilaç dönüşümünden sorumlu sitokrom p450 redüktaz enzimine spesifik antijenler bağlanmış ve floresan mikroskopta görüntülenmiştir. Floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.21’de verilmiştir. Elde edilen görüntüler sferoidlerdeki albumine özgü kırmızı renk boyamanın ve sitokrom p450 redüktaza özgü yeşil renk boyamanın varlığı hepatositlerin işlevselliğini koruduğunu göstermiştir.



Şekil 4.21. Sferoidlerin immünohistokimya analizi floresan mikroskop görüntüleri; a) hücre çekirdeği DAPI boyama (mavi), b) albümin proteini (kırmızı), c) sitokrom p450 redüktaz proteini (yeşil).

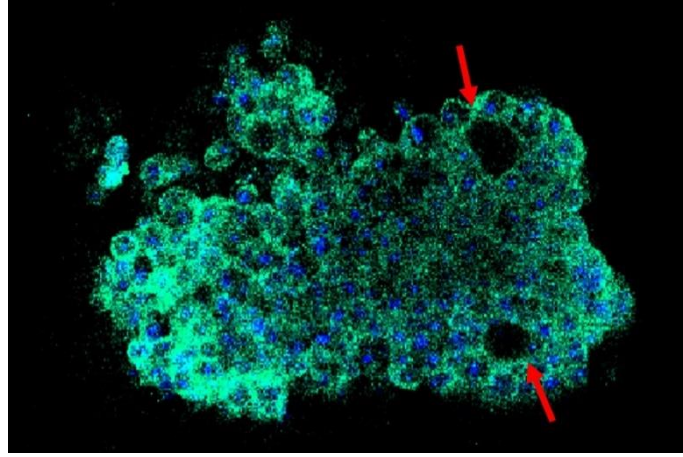
Ayrıca sferoidlerdeki HUVEC'lerin organizasyonunu belirlemek için endotel hücrelerinde bulunan spesifik von Willebrand Faktör (vWF) proteinleri boyanmıştır. Konfokal mikroskop altında 3B tarama yapılan sferoidin z ekseni boyunca görüntüleri Şekil 4.22'de verilmiştir. Görüntülerdeki mavi renk Pİ ile boyanan çekirdeği, yeşil renk ise vWF proteinini göstermektedir.



Şekil 4.22. Sferoidlerin immünohistokimya analizi konfokal mikroskop görüntüleri; hücre çekirdeği (mavi) ve vWF (yeşil). Fotoğrafların sol üst köşesinde yer alan rakamlar yüzeyden merkeze olan uzaklığı göstermektedir.

Şekil 4.22'de yer alan konfokal mikroskop görüntülerinden sferoid çevresinden merkeze doğru vWF bulunmaması HUVEC hücrelerinin sferoid dış yüzeyini kapladığını göstermektedir. Konfokal görüntüleri HepG2 ile HUVEC arasındaki kendiliğinden düzenlenme ve hücre sıralanma prosesinin gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Şekil 4.22'de yüzeyden 35 µm derinliğe kadar oklarla belirtilen bölgelerde endotel hücrelerin içi boş silindirik şekilde organize olduğuna dikkat çekmektedir. Şekil 4.23'te yer alan 5 µm derinlikten alınmış kesit görüntüsünden bu hücrelerin tübüler bir yapı oluşturmak üzere organize olduğu açıkça görülmektedir.



Şekil 4.23. Sferoid yüzeyinden 5 µm derinlikteki sferoid kesitinin konfokal mikroskop görüntüsü.

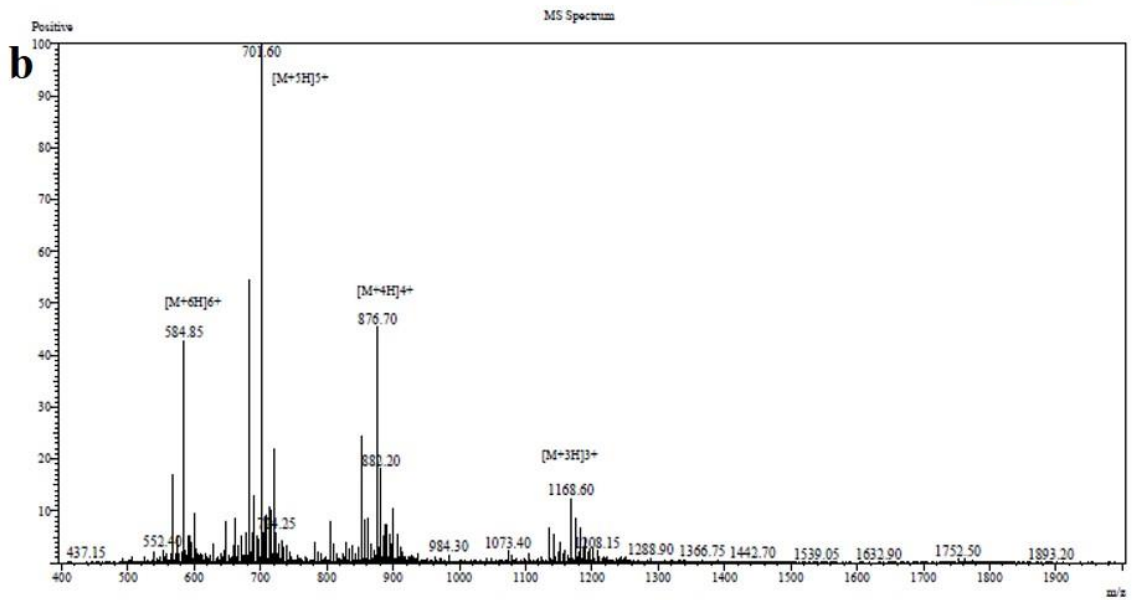
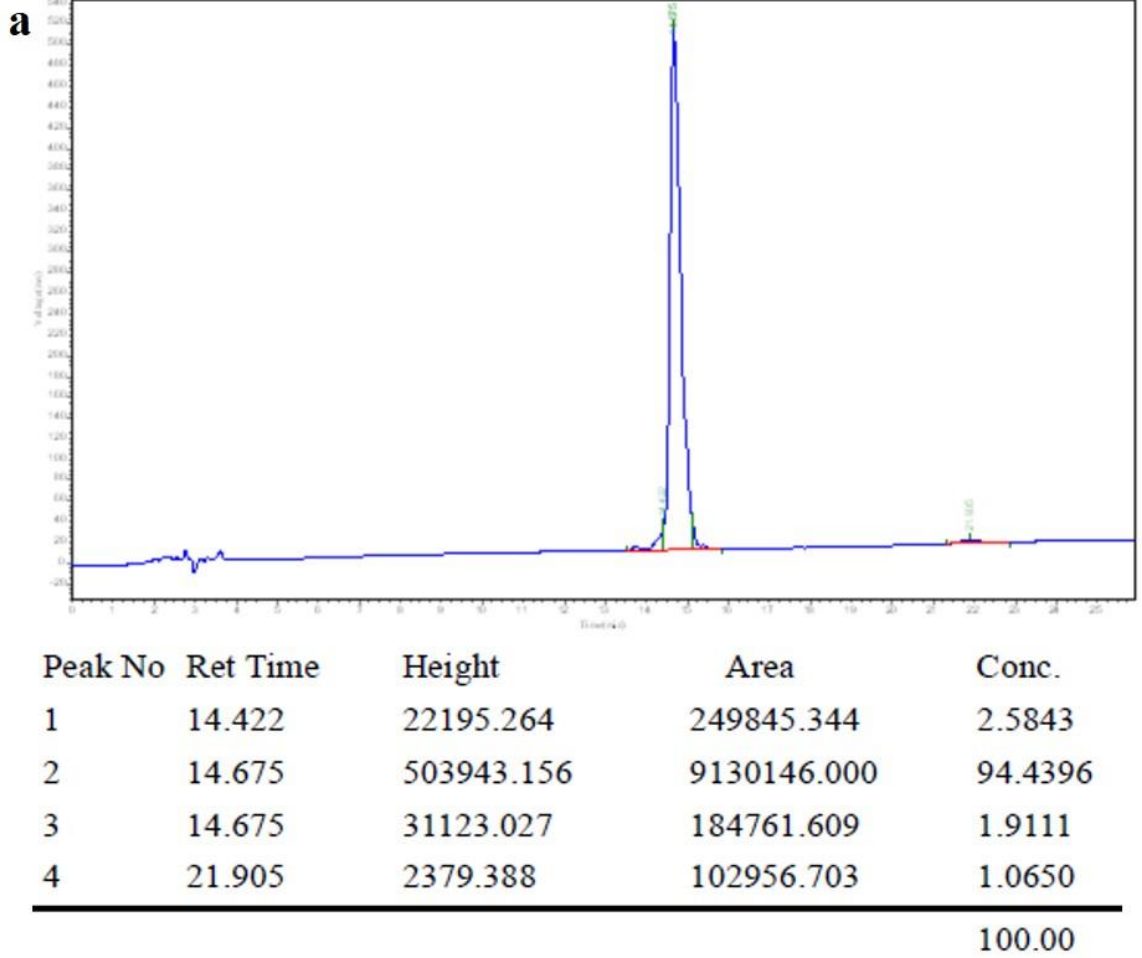
4.3. Peptit Amfifillerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada iki farklı tür peptit amfifil molekülü kullanılmıştır. Peptit amfifiller hücrelerin ihtiyaç duyduğu ECM yapısını taklit etmesi için geliştirilmiştir ve yapısı ECM’de bulunan bileşenleri taklit edecek şekilde kolajen mimetik (PA-GFOGER) ve fibronektin mimetik (PA-RGDS) olarak tasarlanmıştır. Peptit amfifiller standart Fmoc kimyası kullanılarak katı-faz peptit sentezi yöntemiyle ile Genecust (Lüksemburg) firması tarafından üretilmiştir. Firma sentezin başarısını kütle spektroskopisi ile belirlemiş ve yeterli biyoyumumluluğa sahip olması için sonuç ürünü HPLC yöntemiyle saflaştırmıştır.

4.3.1. Kolajen-Mimetik Peptit Amfifil

Tez kapsamında kullanılan kolajen mimetik peptit amfifil Luo ve ark. tarafından dizayn edilmiştir [10]. Peptit amfifil yapısında; 16 karbonlu palmitik asitten oluşan hidrofobik kısım, onu takip eden bölüm β -tabaka düzenlenmeyi sağlayan 5 tane alanin (AAAAA), daha sonra yüklü bölgeyi oluşturmak üzere 4 ardışık lizini (KKKK) ve en son kısım ise kolajenin üçlü sarmal yapısını taklit eden glisin-prolin-hidroksiprolinin (GPO) hücre yapışma ligandı GFOGER ile birlikte üçlü tekrarını içeren sekansları bulundurur (Çizelge 4.1).

Şekil 4.24.b’de yer alan kütle spektroskopisi analizine göre, PA-GFOGER’nin molekül ağırlığı 3503.22 g/mol olarak bulunmuştur. Şekil 4.24.a’da yer alan HPLC kromatogramına göre PA-GFOGER %94.439 saflık derecesine sahip olup *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar için kullanılabilir özelliktedir.

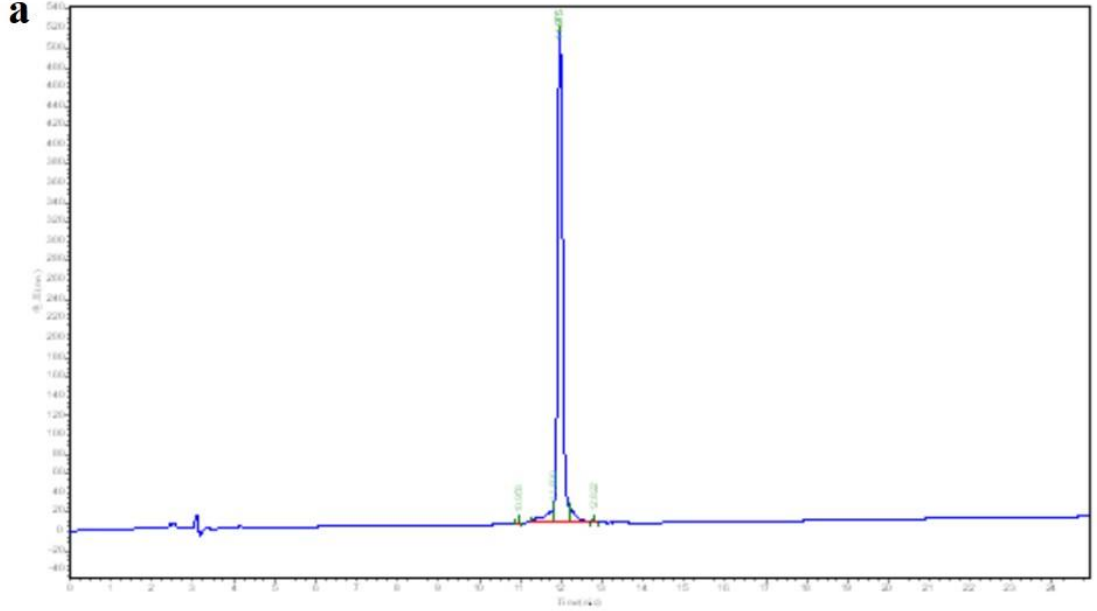


Şekil 4.24. PA-GFOGER'e ait a) HPLC analizi ve b) kütle spektroskopisi sonuçları.

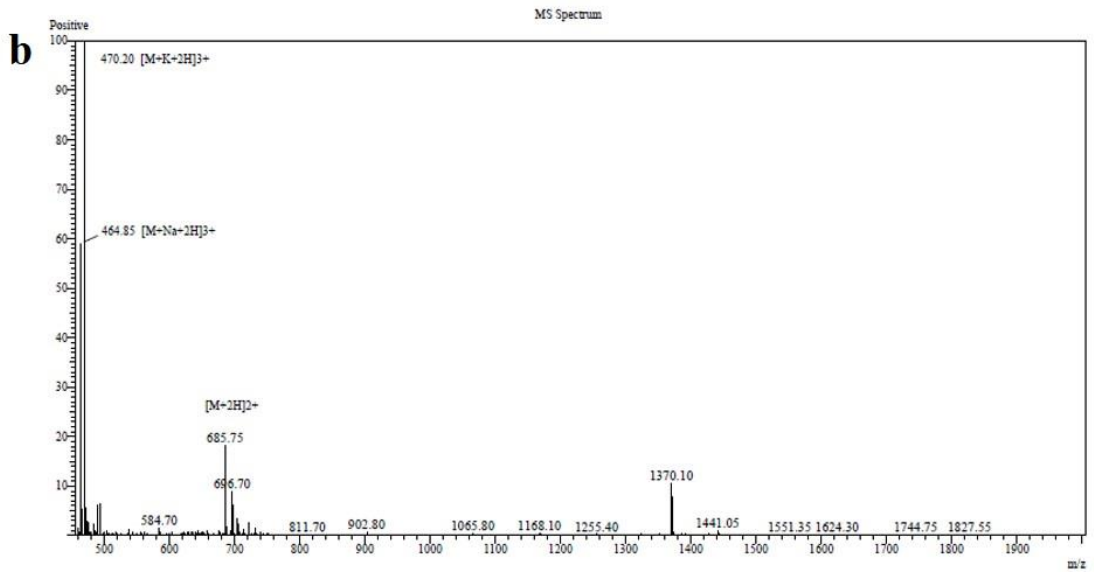
4.3.2. Fibronektin-Mimetik Peptit Amfifil

Fibronektin mimetik peptit amfifil ilk kez Jun ve ark tarafından dizayn edilmiştir [125]. Peptit amfifilin kimyasal yapısı, N-ucuna bağlı 16 karbonlu hidrofobik alkil zincir, onu takip

eden bölümde MMP-2 tarafından spesifik olarak parçalanabilen GTAGLIGQ aminoasit sekansı, çözünürlüğü ve yük kontrolünü sağlayan yüklü aminoasit (E) ve en son hücre yapıştırıcı RGDS sekansından oluşmaktadır (Çizelge 4.1).



Peak No.	Ret Time	Height	Area	Conc.
1	10.958	191.247	844.549	0.0179
2	11.800	13006.091	189792.281	4.0280
3	11.975	506619.656	4374630.500	92.8448
4	11.975	14616.146	140912.656	2.9907
5	12.822	964.086	5588.853	0.1186
Total				100.00



Şekil 4.25. PA-RGDS'e ait a) HPLC analizi ve b) kütle spektroskopisi sonuçları.

Şekil 4.25'te yer alan PA-RGDS molekülüne ait kütle spektroskopisi sonuçlarına göre; peptit amfifil 1369.64 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Peptit amfifile ait HPLC kromatogramına göre moleküllerin %92.844 saflıkta olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.1. Peptit amfifillerin kimyasal yapısı ve özellikleri

Peptit Amfifil	Aminoasit Dizisi	Molekül Ağırlığı (g mol^{-1})	Saflık Derecesi (%)	Net Yük (pH 7)
PA-GFOGER	C16-AAAAAKKKK(GPO) ₃ GFOGER(GPO) ₃ G	3503.22	94.439	-4
PA-RGDS	C16-GTAGLIGQERGDS	1369.64	92.844	+1

4.4. Peptit Amfifil Hidrojelinin Hazırlanması

PA-GFOGER peptit amfifillerden hidrojel elde etmek için literatürde yer alan prosedür dahilinde 5mM PA-GFOGER ultrasaf suda çözülmüştür. Jelleştirme çalışmalarına geçilmeden önce 2 gün +4°C derecede bekletilmiş ve 4 kat derişik sodyum fosfat ile (20 mM Na₃PO₄) 1:1 oranında karıştırılmıştır [153]. Çözelti tuz ile indüklenerek kendiliğinden düzenlenmesi sağlanmıştır. Fakat bu son çözelti hidrojel çalışmalarında kullanılacak yeterli mekanik özelliklere sahip olmadığı belirlenmiştir. Çözeltinin mekanik özelliklerini arttırmak için peptit amfifil konsantrasyonu (10 mg/mL, 20 mg/mL ve 50 mg/mL), Na₃PO₄ konsantrasyonu (22.8 mM ve 56 mM) ve karıştırma oranı değiştirilerek optimum mekanik özelliklere ulaşılmaya çalışılmıştır. Tüm denemeler sonucunda bu yaklaşımlarla hidrojel elde edilemeyeceğine karar verilmiş ve farklı yaklaşımlar araştırılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan kolajen mimetik peptit amfifil; tip1 kolajenden tasarlandığı için çapraz bağlama için tip 1 kolajende kullanılan yöntemler denenmiştir. Literatürde kolajeni çapraz bağlamak için gluteraldehit, genipin [154], karbodiimit hidroklorür (EDC), 1-etil-3-diaminopropil-karbodiimid (EDC)/N-hidroksisüksinimid (NHS) (EDC/NHS) [155], riboflavin A [156] ve gliserol fosfat [157] kullanılmıştır.

Krawetz ve ark. 3 mg/mL sığır tip 1 kolajenini 10 mM beta-gliserol fosfat (β GP) (4:1 oranında) kullanarak çapraz bağlamıştır [157]. Çalışmamızda 10 mM, 20 mM ve 40 mM konsantrasyona sahip β GP, 10 mg/mL ve 20 mg/mL derişimdeki peptit amfifil ile farklı oranlarda (4:1, 2:1 ve 1:1) karıştırılarak çapraz bağlanmaya çalışılmıştır. 20 mM derişimdeki β GP 1:4 oranında peptit amfifil ile karıştırıldığında pH değeri 7'ye yükselmiş ve çözelti rengi

ve viskozitesinde artış gözlenmiştir. Fakat çözeltinin son yapısı yeterli mekanik özelliklere sahip olmadığı için çalışmalarda kullanılamayacağına karar verilmiştir.

Ahearne ve ark. farklı dokulardan izole edilen tip 1 kolajeni %1, %0.1 ve %0.01 riboflavin ile 350-370 nm dalga boyunda 15-30 dk çapraz bağlamıştır [158]. Bu çalışma referans alınarak 364 nm dalga boyunda UV uygulaması ile çapraz bağlanma çalışmaları yürütülmüştür. Çalışma için farklı konsantrasyonda peptit amfifiller farklı oranlarda riboflavin ile karıştırılmıştır. Aynı zamanda peptit amfifil çözeltisinin pH değerini yükseltmek için Na_3PO_4 veya βGP farklı oranlarda eklenmiştir. Yapılan tüm denemeler sonucunda çapraz bağlanma gerçekleşmemiştir.

Çizelge 4.2 : PA-GFOGER peptit amfifilinin çapraz bağlama yöntemleri

Peptit Amfifil Konsantrasyonu (mg/mL)	Çapraz Bağlayıcı Ajan	Çapraz Bağlanma
10, 20, 50	Na_3PO_4 (22,8 mM)	X
10, 20	βGP (10, 20, 40 mM)	X
10, 20	Genipin (1, 2, 4 mM)	X
10, 20, 50	$\beta\text{-GP}$ + Genipin	X
10, 20	Riboflavin A	X
10, 20, 50	Riboflavin A+ βGP (10, 20 mM)	X
10, 20	Riboflavin A+ Na_3PO_4	X

Zhang ve ark. ise kolajeni kimyasal olarak çapraz bağlamak için genipin kullanmıştır [159]. Benzer şekilde 1 mM, 2 mM ve 4 mM genipin stok çözeltileri farklı oranlarda farklı derişime sahip peptit amfifiller ile karıştırılarak 37°C de çapraz bağlanma çalışmaları yapılmıştır. Peptit amfifillere paralel olarak mevcut çapraz bağlanma mekanizmasının etkinliği doğal tip 1 kollajen ile karşılaştırmalı olarak yürütülmüştür. Çalışma sonucunda 2 mM ve 4 mM genipin 1:3 oranında doğal kolajen ile karıştırıldığında jelleşme sağlanırken peptit amfifillerde jelleşme gözlenmemiştir. Bu çalışma mevcut jelleştirme yöntemlerinin doğal kolajende etkin olmasına rağmen kolajen mimetik peptit amfifil için yetersiz olduğu sonucuna götürmüştür.

Literatürde yer alan çalışmalarda peptit amfifillerin kalsiyum iyonları varlığında kolay bir şekilde jelleşme sağlandığı rapor edilmiş ve hücre enkapsülasyonu ve doku mühendisliği çalışmalarında bu yaklaşım sıklıkla kullanılmaktadır[160]. Bu çalışmada hücreler için uyumlu olan ve nötral pH da çalışma imkânı sağlayan kalsiyum iyonu, PA-RGDS peptit

amfifili için kendiliğinden düzenlenme ve jelleştirici ajan olarak kullanılmıştır. PA-RGDS molekülleri nötral pH'da yapısındaki glutamik asidin karboksil grubuna bağlı olarak net negatif yüke sahiptir. Bu nedenle kalsiyum iyonu varlığında jelleşmeye başlamaktadır. Kütlece % 0.5, 1 ve 1.5 PA-RGDS distile su içerisine eklenmiş ve 100 mM NaOH ile pH'sı 7'ye ayarlanarak çözünmesi sağlanmıştır. Farklı derişimdeki PA-RGDS çözeltileri 100 mM'lık CaCl_2 çözeltilisine eklenmiş ve en kararlı jel oluşumu için gereken minimum derişimin kütlece %1 olması gerektiği gözlenmiştir.

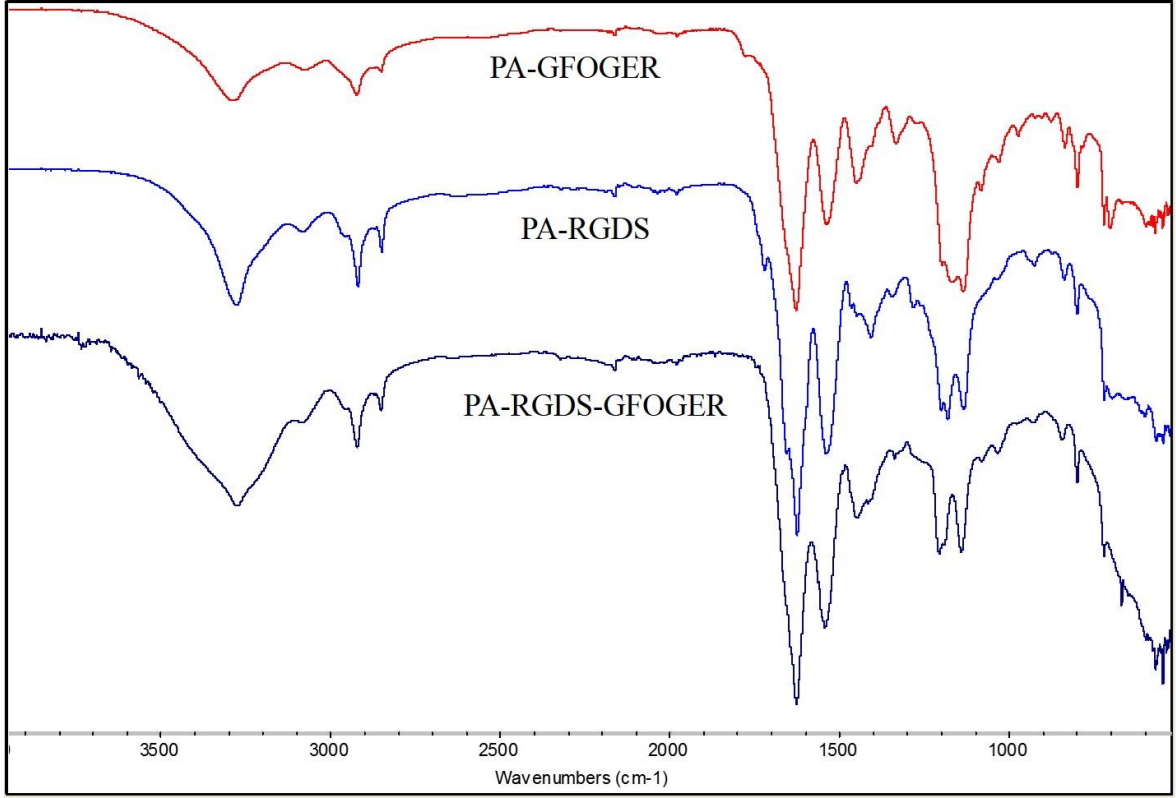
Tez kapsamında ECM yapısında bulunan kolajen ve fibronektin bileşenleri taklit edilerek hücreler için daha biyomimetik bir mikroçevre oluşturulması amaçlanmıştır. Bu sebeple PA-GFOGER ve PA-RGDS peptit amfifillerinin karıştırılması ile ECM mimetik hidrojel elde edilmesi planlanmıştır. Zıt yüklü peptit amfifillerin yük miktarlarına göre hacimsel olarak karıştırılması ile kendiliğinden düzenlenme prosesinin indüklenmesi oldukça güncel bir yaklaşımdır. Bu amaçla -4 yüklü PA-GFOGER ile +1 yüklü PA-RGDS peptit amfifilleri 1:4 hacimsel oranında karıştırılarak kendiliğinden düzenlenmenin indüklenmesi planlanmıştır. ECM mimetik hidrojel (PA-GFOGER+RGDS) elde etmek için PA-GFOGER ve PA-RGDS peptit amfifilleri ayrı ayrı %2 (w/v) derişimde ultra saf suda çözdürülmüş 100 mM NaOH ile pH ayarlaması yapıldıktan sonra 1:4 hacim oranında karıştırılmıştır. Jelleşmenin sağlanması için 48 gözlü kültür kabı içine 100 μL peptit amfifil çözeltilisi eklenmiş, üzerine 100 mM'lık CaCl_2 çözeltilisinden 100 μL ilave edilmiştir. PA-GFOGER+RGDS hidroجلي başarı ile elde edilmiştir.

4.5. Peptit Amfifil Hidrojelin Karakterizasyonu

Bu bölümde PA-GFOGER, PA-RGDS ve bu iki yapının karıştırılmasıyla elde edilen PA-GFOGER+RGDS (1:4) peptit amfifil hidrojinin karakterizasyonuna yönelik gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

4.5.1. Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi

Peptit kullanılarak oluşturulan malzemelerin birincil ve ikincil yapıları, elde edilen son ürünün morfolojisi açısından önemli bir faktördür. Bu oluşumları değerlendirmek için FTIR analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.26 'da sunulmuştur.



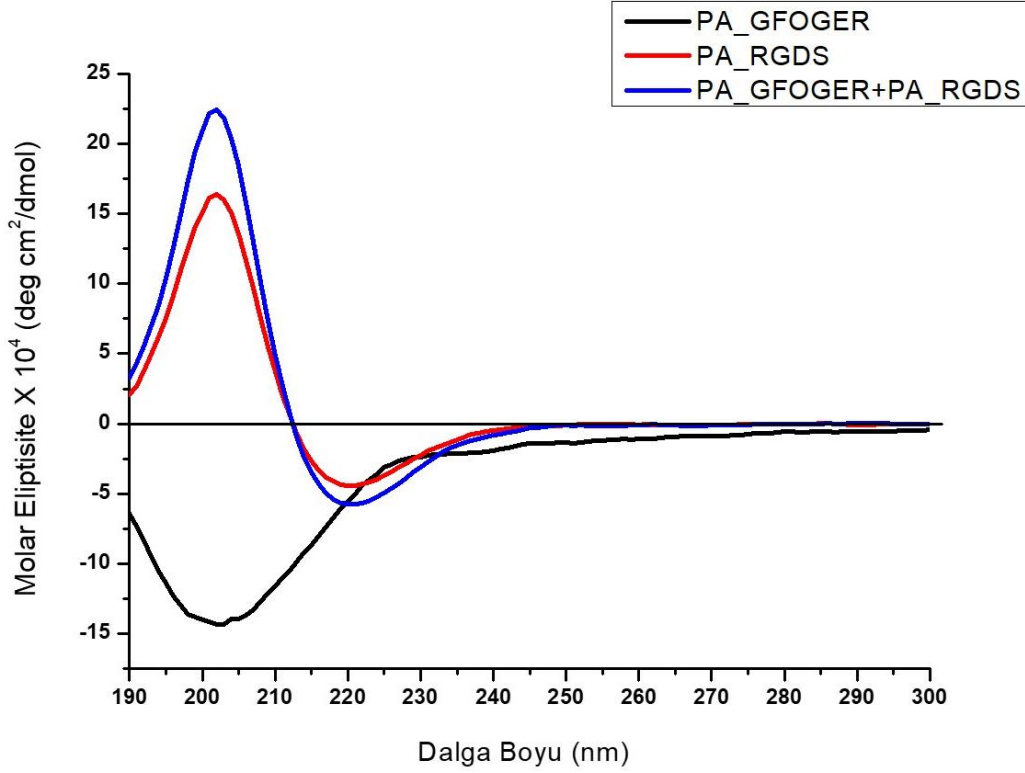
Şekil 4.26. Peptit amfifillere ait FTIR spektrumları.

Şekil 4.26’da verilen FTIR spektrumları incelendiğinde, 3290 - 3280 cm^{-1} aralığındaki amid A (proteinlerdeki N-H gerilmesi) ve 1625-1630 cm^{-1} aralığında görülen amid I (proteinlerdeki C=O gerilmesi) bantları peptit amfifillerin β -tabaka üzerinden nanofiber yapıları oluşturduğunu göstermektedir. PA-RGDS örneğinde 1720 cm^{-1} dalgasayısında görülen pik palmitik asitin C=O titreşim bandına aittir. Bununla birlikte, 2 peptit amfifilin karıştırılmasıyla elde edilen PA-RGDS+GFOGER örneğinde 1690 cm^{-1} dalgasayısında pik görülmemesi bu karışım içinde PA-RGD moleküllerinin β -tabaka yapısı sayesinde paralel düzen oluşturduğunu göstermektedir [161]. Ayrıca 2920 cm^{-1} dalgasayısındaki $-\text{CH}_2$ gerilim piki ise, alkil gruplarının birbirlerine yakın olacak şekilde yığın oluşturup nanofiberlerin iç kısmında bulunduklarını göstermektedir [162]. ATR-FTIR analizinden elde edilen sonuçlar, literatür ile uyumlu şekilde hidrofobik uçların nanofiberlerin iç kısmında, hücrelerle ilk karşılaşmayı sağlayacak biyoaktif epitop olan RGDS’nin ise nanofiberlerin dış kısmında yer alarak peptit amfifillerin arzu edilen şekilde sentezlendiğini göstermiştir [160, 163].

4.5.2. Dairesel Dikroizm (CD) Analizi

Peptit moleküllerinin ikincil yapıları ve moleküler oryantasyonu CD analiziyle incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.27’de sunulmuştur. PA-RGDS ve PA-GFOGER+RGDS (1:4)

örneklerine ait CD spektrumlarına göre, 220 nm dalga boyundaki geniş negatif bant ve 201 nm'deki büyük pozitif bant, moleküllerin kalsiyum eklenmesi sonrası β -tabaka yapılanmasında olduğunu göstermektedir [160, 164].

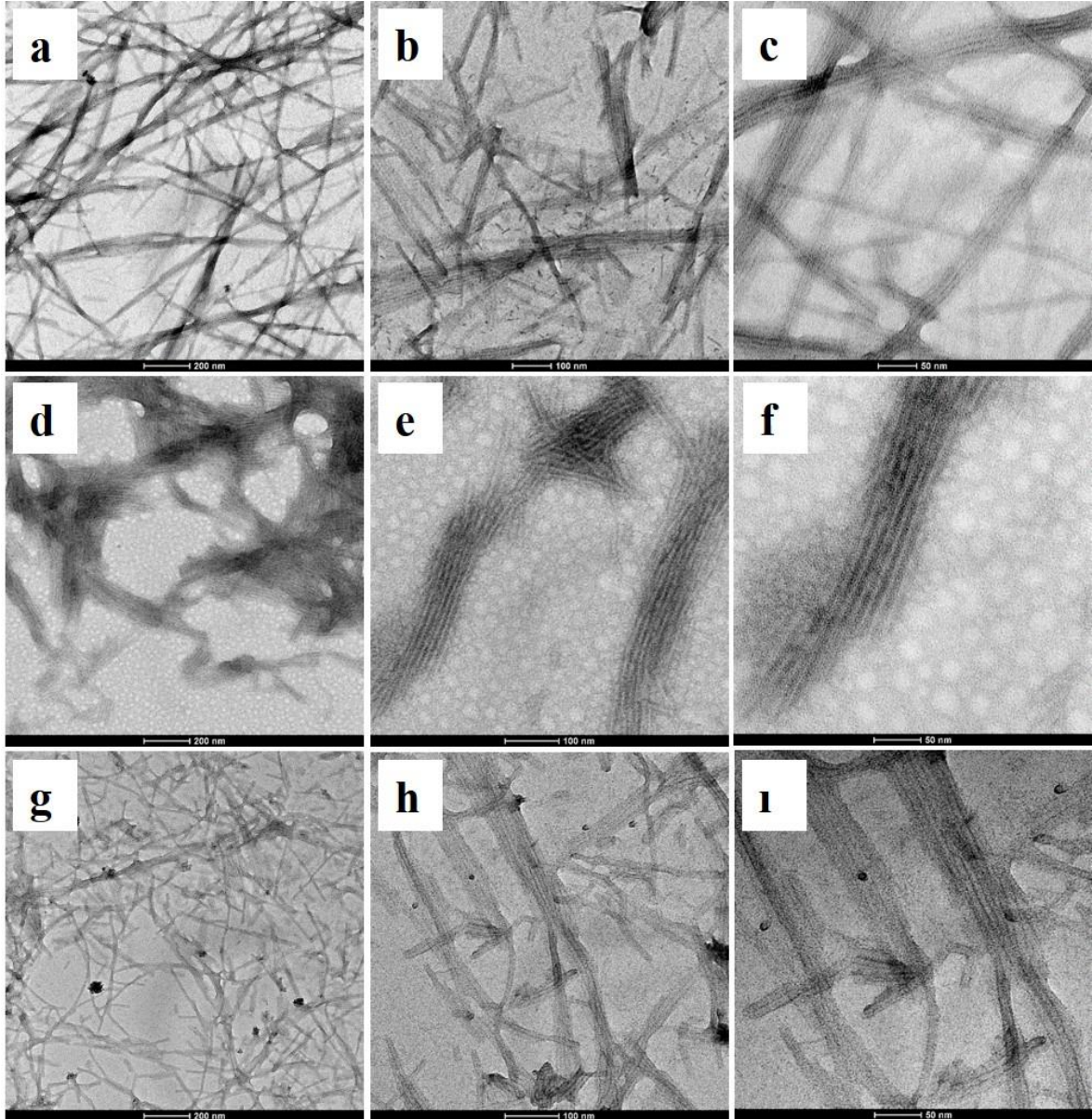


Şekil 4.27. Peptit amfifillere ait katlanma grafiği

Kolajen-mimetik peptit amfifillerin üçlü-sarmal yapısı 200 nm'de büyük negatif bir pik ve yaklaşık 220 nm'de pozitif bir pik ile karakterize edilen spesifik bir CD spektrumunu sergiler. Şekil 4.27'de verilen PA-GFOGER'e ait CD spektrumuna bakıldığında 220 nm civarında pozitif pikin görülmemesi yapının üçlü sarmal olarak düzenlenmediğini göstermektedir [10]. Sundar ve ark. kolajen mimetik peptit amfifili Na_3PO_4 , Jingnan ve ark. ise NH_4OH kullanarak indüklediğinde kolajenin karakteristik sarmal yapıya ulaştığını göstermiştir [10, 114]. Tez kapsamında ECM mimetik peptit amfifil elde edilmeye çalışılmış ve bu peptit amfifilin Ca^{2+} iyonları varlığında hidrojel yapıya ulaşması temel alındığı için sodyum fosfat tuzu kullanılmamıştır. Kolajen mimetik peptit amfifil ile fibronektin mimetik peptit amfifilin karışımı ile oluşturulan hidrojelde β -tabaka yapılanması Ca^{2+} iyonları varlığında gözlenmiştir.

4.5.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Kendiliğinden düzenlenen peptit amfifillerin fiber yapısı TEM analizleriyle de incelenmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 4.28’de verilmiştir.



Şekil 4.28. Peptit amfifillerin TEM görüntüleri. (a–c) PA-RGDS; (d–f) PA-GFOGER; (g–i) PA-GFOGER+RGDS (1:4).

TEM analizi sonucu, kalsiyum iyonu varlığında kendiliğinden düzenlenen PA-RGDS nanofiberlerin 11.0 ± 2.6 nm çapında ve yüzlerce nanometre uzunluğunda olduğu görülmektedir (Şekil 4.28 a-c). PA-GFOGER nanofiberlerin ise 9.0 ± 1.6 nm çaplarında oldukları görülmektedir (Şekil 4.28 d-f). Literatürde PA-GFOGER peptit amfifilleri ile yapılan çalışmalarda, kendiliğinden düzenlenme NH_4OH ve Na_3PO_4 gibi bazlarla

indüklendiğinde oluşan fiberlerin 16 nm çapta olduğu bildirilmiştir. Bu çap değerleri bizim çalışmamızda elde edilenden daha yüksektir [10]. Fiberlerin uzunlukları karşılaştırıldığında ise PA-GFOGER nanofiberlerinin PA-RGDS fiberlerine göre daha kısa olduğu görülmüştür. PA-GFOGER+RGDS (1:4) nanofiberlerine ait TEM görüntüleri fiberlerin 10.0 ± 1.3 nm çapında ve mikrometrelerce uzunlukta olduğunu göstermektedir (Şekil 4.28 g-h). Peptit karışımına ait örneklerde çap değerleri homojen bir dağılım göstermekle birlikte PA-GFOGER nanofiberlerdekinden daha büyük, PA-RGDS nanofiberlerdekinden ise daha küçüktür. Fiber uzunlukları karşılaştırıldığında ise peptit karışımına ait örneklerde fiber uzunluğunun PA-GFOGER'dekinden daha büyük olduğu görülmüştür. Bu durum yapıya katılan PA-RGDS peptit amfifilin karışımın yapısına katıldığını ve β -tabaka tipi hidrojen bağları ile fiberlerin uzamasını sağladığını kanıtlar niteliktedir [10].

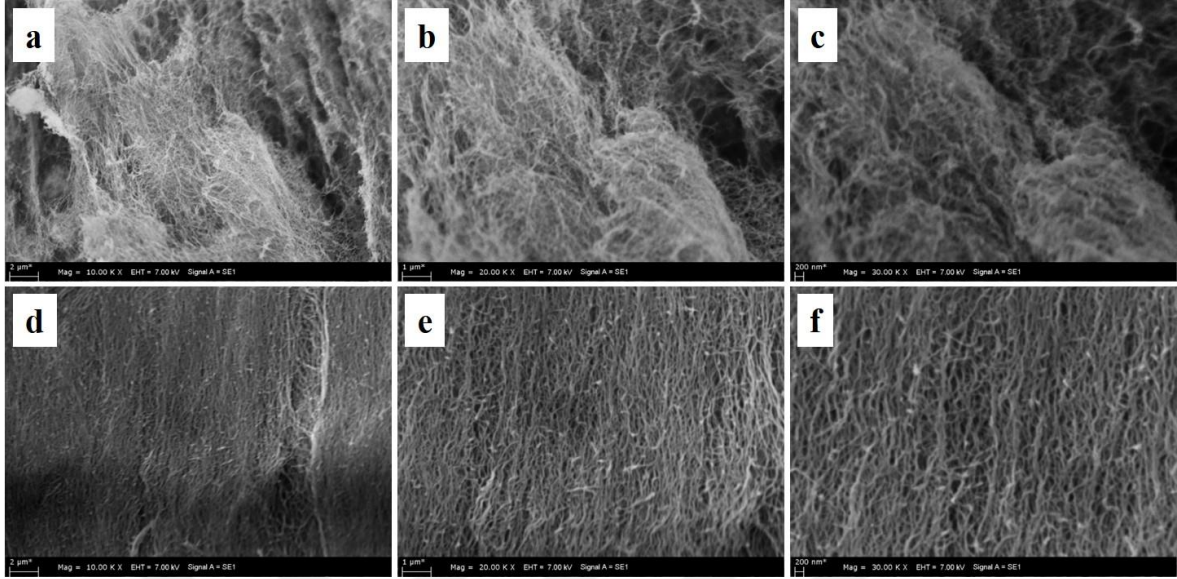
Peptit amfifillerle gerçekleştirilen çalışmalarda, hücre dışı matris (ECM) yapısını taklit ederken fiber yapılarının elde edilmesinin yanında önemli olan bir diğer nokta, ECM bileşenlerinin hiyerarşik organizasyonunun sağlanmasıdır. Doğal ECM yapısında kolajen fibriller düzenlenerek (birleşerek) büyük kolajen fiberlerini oluşturmaktadır. TEM görüntüleri PA-GFOGER (Şekil 4.28 e ve f) ve PA-GFOGER+RGDS (1:4) (Şekil 4.28 e ve f) örneklerinden nanofiberlerin birleşerek fiber demetlerini oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 3-h ve ı). PA-GFOGER için fiber demetlerinin 75-100 nm aralığında çapa sahip olduğu, bununla birlikte PA-GFOGER+RGDS (1:4) örneğinde oluşan demetlerin daha ince olduğu görülmüştür.

4.5.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

PA-RGDS ve PA-GFOGER+RGDS (1:4) hidrojellerinin morfolojisi, fiber yapısı ve organizasyonunu incelemek için SEM analizi yapılmıştır. PA-GFOGER ile stabil bir jel yapısı elde edilemediği için bu örneğe SEM analizi yapılamamıştır.

Hidrojeller *in vitro* kültürlerde difüzyon kısıtlamalarına sebep olmayacak gözenek yapısına ve mekanik özelliklere sahip olmalıdır. Bu gereklilikler, kültür ortamında bulunan besinlerin ve oksijen gibi bileşenlerin hücrelere yeterince ulaştırılabilmesi ve atık maddelerin hücrelerden uzaklaştırılabilmesi açısından önemlidir. SEM görüntüleri incelendiğinde PA-RGDS hidrojelinin ortalama 57 ± 8 nm çapa sahip fiberlerden oluşan ağsı yapıya sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.29 a-c). PA-GFOGER+RGDS (1:4) hidrojelinde ise 70 ± 12 nm çapındaki fiberler ağsı yapıyı oluşturmaktadır (Şekil 4.29 d-f). PA-GFOGER+RGDS örneklerinde PA-RGDS'in yapısına PA-GFOGER'in katılması fiber demetlerinin daha

düzenli bir şekilde oluşmasını sağlamıştır. Elde edilen hidrojel, yüksek gözenekliliğe ve yüzey alanı/hacim oranına sahip oluşları ile doğal ECM yapısına benzerlik göstermiştir.

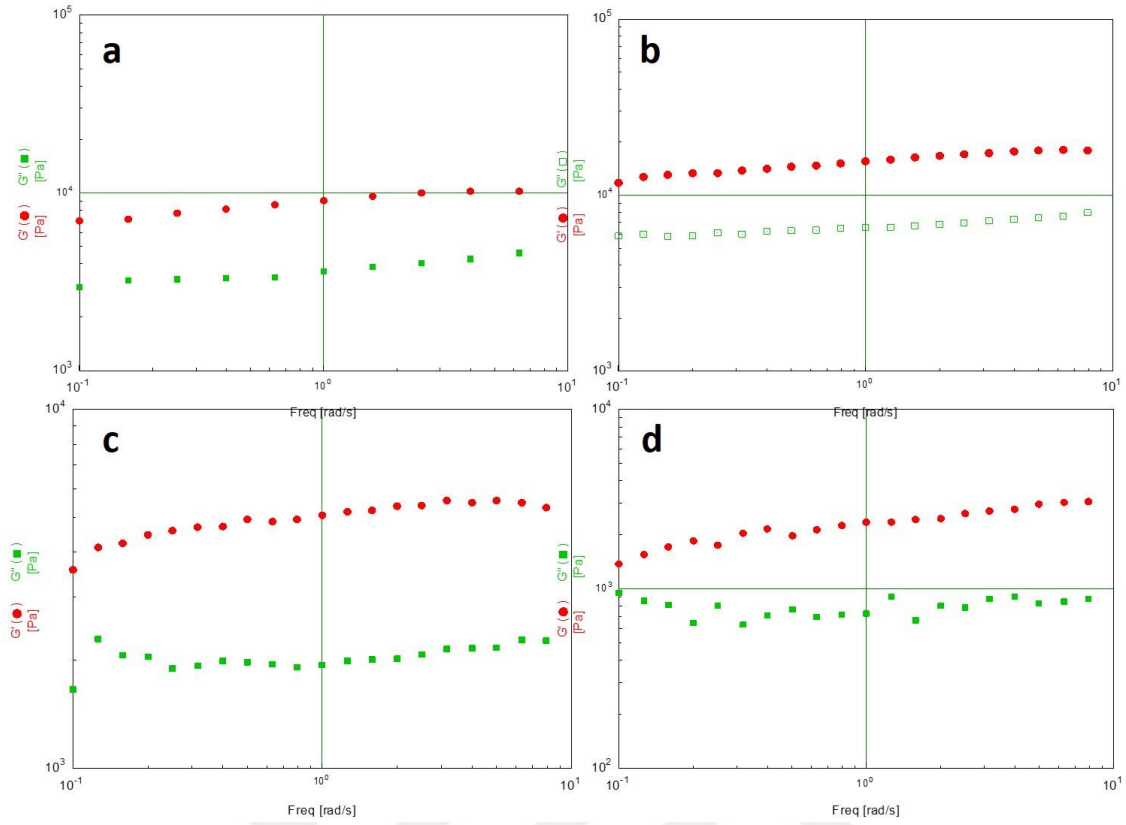


Şekil 4.29. Hidrojellere ait SEM görüntüleri: PA- RGDS: a) 10000, b) 20000X, c) 30000X; PA-GFOGER+RGDS (1:4): d) 10000X, e) 20000X, f) 30000X.

4.5.5. Reolojik Analiz

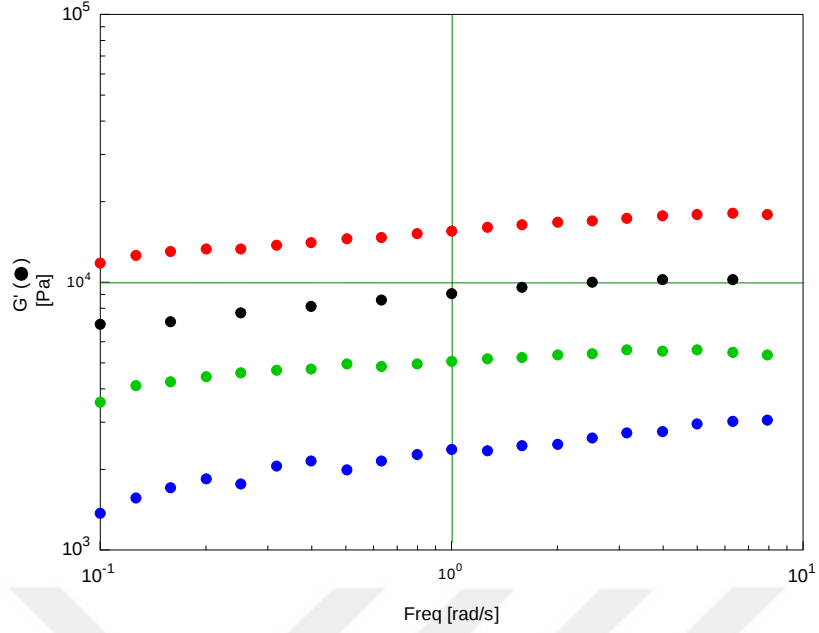
Hidrojellerin mekanik özellikleri hidrojel içine enkapsüle edilen hücre davranışını doğrudan etkilemektedir. PA-RGDS ve PA-GFOGER+RGDS hidrojellerinin viskoelastik özelliklerinin belirlenmesi ve çapraz bağlanmış ağısı jel yapının üç boyutlu karakteristiğinin tanımlanması için reolojik analiz yapılmış, 0-10 rad/s aralığında değişen frekansta yapılan dinamik ölçümler sonucu depolama modülü ve kayıp modül belirlenmiştir.

Depo modülü (G') bir malzemenin depoladığı enerji miktarını ifade etmekte ve elastik gerilimin gerinime oranı şeklinde hesaplanmaktadır. Kayıp modül (G'') ise bir döngü içinde malzemenin kaybettiği enerjiyi ifade etmekte ve depo modülünden farklı olarak viskoz gerilimin gerinime oranıyla hesaplanmaktadır [165, 166]. Depo ve kayıp modül değerleri genel olarak düşük viskoziteli sistemlerin elastik ve viskoz gerilimlerinin düşük olması sebebiyle düşük viskoziteli sistemlerde daha düşük çıkarken jelleşme arttıkça bu değerler de artmaktadır [167]. Şekil 4.30'da yer alan grafiklerde tüm grupların salınım frekansı arttıkça depo modül değerleri artmaktadır. Hidrojel gruplarında, frekans arttıkça depo modülünde gözlenen artışın, kayıp modüldeki artışa göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. $G' > G''$ olduğu durumda malzeme viskoelastik özellik göstermedir [166]. Dolayısıyla tüm grupların viskoelastik karaktere sahip oldukları gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Çapraz bağlanan peptit amfifillerin depo modülleri (G') ve kayıp modülleri (G''): (a) %1'lik (w/v) PA-RGDS, (b) %2'lik (w/v) PA-RGDS, (c) %2'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4), (d) %1'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4).

Grupları kendi içinde değerlendirdiğimizde en kararlı jel yapısı %2'lik (w/v) PA-RGDS örneğinde görülmüştür. PA-RGDS hidrojel örneklerinde peptit konsantrasyonu azaldıkça reolojik özelliklerinde azalma görülmüştür. Fibronektin mimetik peptit amfifile kolajen katkılanması yapının depo modülünde azalmaya sebep olmuştur. Depo modülüne göre hidrojelleri en yüksekten en düşüğe doğru sıralayacak olursak; sıralama %2'lik (w/v) PA-RGDS, %1'lik (w/v) PA-RGDS, %2'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4), %1'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4) şeklindedir (Şekil 4.31).

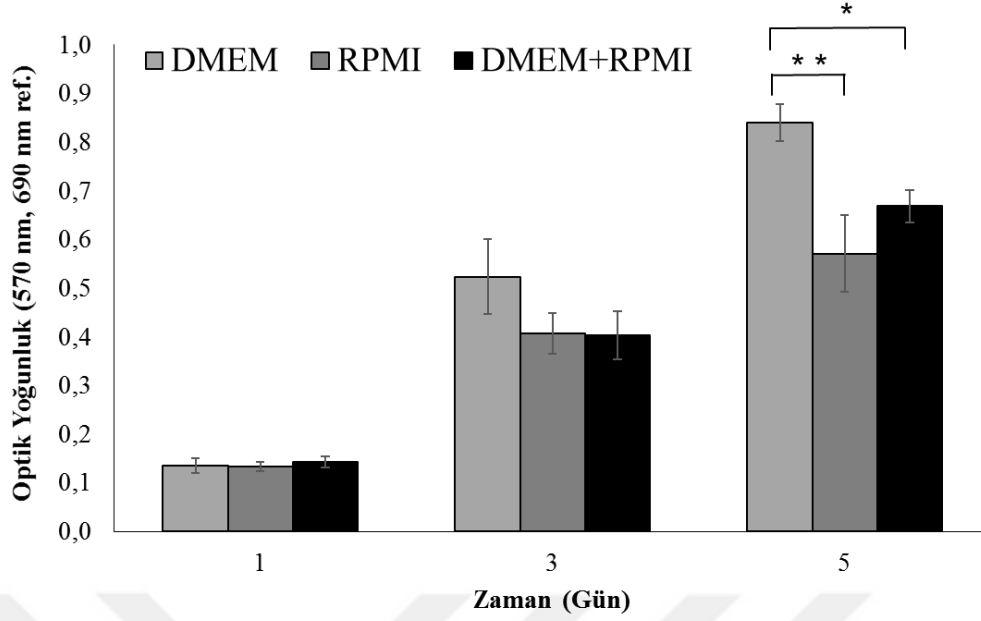


Şekil 4.31. Hidrojellerin depo modülü karşılaştırılması. Kırmızı noktalar: %2'lik (w/v) PA-RGDS; siyah noktalar: %1'lik (w/v) PA-RGDS, yeşil noktalar: %2'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4), mavi noktalar: %1'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4).

4.6. Sferoidlerin Hücre Kültür Çalışmaları

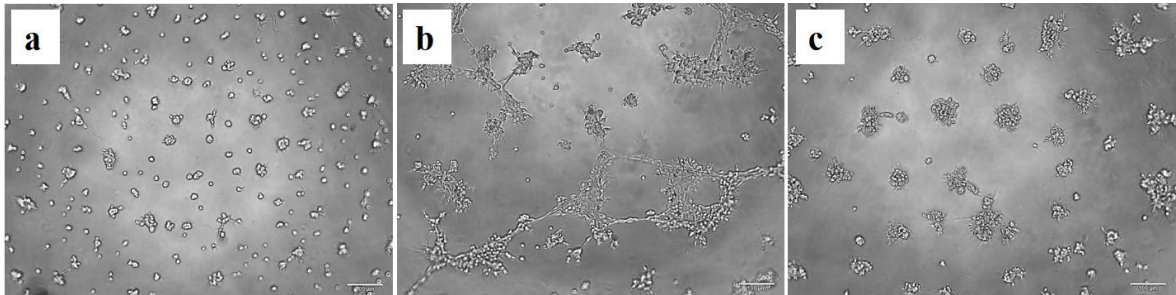
4.6.1. Besin Ortamının Belirlenmesi

Kokültür çalışmalarında kullanılan besin ortamının, her hücre tipi için gereken canlılığı ve işlevselliği sağlaması gerekmektedir. Karaciğer organoidlerinin geliştirilmesi için kullanılacak en uygun özelliklere sahip ortamın belirlenmesi için 1:1 oranında karıştırılan HepG2 ve HUVEC hücreleri; DMEM, RPMI ve bu iki ortamın 1:1 oranında karıştırılması ile elde edilen besin ortamlarında 5 gün kültür edilmiş ve kullanılan besin ortamının hücre mitokondriyal aktivitesine olan etkisini belirlemek için MTT analizi yapılmıştır. Şekil 4.37'de sunulan analiz sonuçlarına göre HepG2 ve HUVEC hücrelerinin DMEM besin ortamında aktivitesinin daha fazla olduğu görülmektedir. DMEM besin ortamındaki hücrelerin kültürün 5. günündeki aktivitesi incelendiğinde, RPMI besin ortamına göre istatistiksel olarak çok anlamlı ($p < 0.01$) ve DMEM+RPMI besin ortamına göre ise istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0.05$) farklı olduğu bulunmuştur. Bu sebeple DMEM besin ortamının kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.32. Hücrelerin farklı besin ortamları içinde mitokondriyal aktiviteleri (n=3 * p<0.05, ** p<0.01 istatistiksel önemi temsil etmektedir).

İnsan vücudunda damarlanma, çoklu sinyal yollarının farklı biyosinyal moleküller ile indüklenmesi ile gerçekleşmektedir. Doku mühendisliği teknikleri ile geliştirilen dokularda vaskülarizasyonun sağlamak için damarlanma prosesinde yer alan bileşenlerin besin ortamına eklenmesi gerekmektedir. Damarlanmayı indükleyen büyüme faktörleri DMEM besin ortamı içine eklenerek en uygun besin ortamı belirlenmiştir. Besin ortamının vaskülarizasyon üzerine etkisi Matrigel® üzerinde tübüler yapı oluşum analizi ile incelenmiştir.



Şekil 4.33. Tübüler yapı oluşum analizi 24. saat optik mikroskop görüntüleri: a) DMEM; b) %2 (v/v) FBS içeren vaskülarizasyon ortamı; c) %10 (v/v) FBS içeren vaskülarizasyon ortamı.

Matrijel üzerinde kültüre edilen HUVEC hücrelerinin farklı besin ortamlarındaki kültürünün 24. saatinde alınan optik mikroskop görüntülerinden sadece %2 (v/v) FBS içeren vaskülarizasyon ortamında kültüre edilen hücrelerde tübüler yapı oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.33 b). DMEM (büyüme faktörü içermeyen büyüme ortamı) (Şekil 4.33 a) ve %10 (v/v) FBS içeren vaskülarizasyon ortamında (Şekil 4.33 c) hücrelerin tübüler organizasyonuna ilişkin bir oluşum gözlenmemiştir. Huttala ve ark. besin ortamı bileşenlerinin tübüler yapı oluşumuna olan etkisini incelemek için yaptıkları çalışmada yüksek serum içeriğinin tübüler yapıda kırıklar meydana getirdiğini bu sebeple kültür ortamının düşük oranda serum içermesinin ya da insülin-transferrin-sodyum selenit ya da albümin gibi besin ortamı katkı bileşenlerinin kullanımının vaskülarizasyon için daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir [168]. Büyüme faktörü ve %10 (v/v) FBS içeren ortamda kültüre edilen hücrelerde ise 16. saatte kadar tübüler organizasyon gözlemlenmesine rağmen ilerleyen saatlerde hücreler toplanmıştır ve 24. saatte bu yapıların bozulduğu görülmüştür. Tübüler organizasyonun bozulmasının nedeni yapıdaki yüksek FBS içeriği olup elde edilen bu sonuç literatür ile uyumludur. Bu analiz sonuçlarından yola çıkarak hücre kültür çalışmalarına Çizelge 4.3’de verilen bileşimde devam edilmiştir.

Çizelge 4.3. Besin ortamı bileşenleri

Bileşen	Miktar
DMEM	% 93 (v/v)
FBS	% 2 (v/v)
L glutamin	4 mM
rh VEGF	5 ng/mL
rh EGF	5 ng/mL
rh FGF basic	5 ng/mL
rh IGF	15 ng/mL
Heparin sülfat	0.75 Units/mL
Hidrokortizon	1 µg/mL
Askorbik asit	50 µg/mL
100 birim/mL penisilin-100 µL/mL streptomisin	% 1 (v/v)

4.6.2. Durgun Hücre Kültür Çalışmaları

Peptit amfifillerin organoid gelişimine etkisini incelemek için %2’lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS (1:4) hidroveli ile enkapsüle edilerek 10 gün durgun kültür çalışmaları yürütülmüştür. Hücrelerin canlılıkları MTT analizi, işlevselliği ise albümin ve üre salım miktarlarının analizi ve gen ifadeleri için RT-PCR analiziyle incelenmiştir.

PA-RGDS ve PA-GFOGER peptit amfifil çözeltileri %2 (w/v) konsantrasyona sahip olacak şekilde distile suda çözülmüştür. Çözeltilerin pH değeri 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl ile 7.4'e ayarlanmıştır. Sterilizasyon 30 dk UV ışık altında gerçekleştirilmiştir ve sonrasında peptit amfifil çözeltileri 1:4 oranında (PA-GFOGER: PA-RGDS) karıştırılmıştır. Beş günlük kültür sonunda yüzeyden toplanan sferoidler steril peptit amfifil karışımı ile karıştırılmıştır. Hücreli peptit amfifillerden 100 µL alınarak, karışım 100 sferoid/örnek olacak şekilde 24 gözlü kültür kabının gözlerine dağıtılmıştır. Sonrasında gözlere 100 µL 100 mM CaCl₂ çözeltisi eklenerek çapraz bağlanma sağlanmıştır. Şekil 4.34'te çapraz bağlanma sonrası sferoidlerin görüntüsü bulunmaktadır. Sferoidlerin peptit amfifil ile enkapsülasyonundan sonra 0,01 mM CaCl₂ içeren vaskülarizasyon ortamında kültürü gerçekleştirilmiştir. Besin ortamı içindeki Ca²⁺ iyonları peptit amfifillerin çapraz bağlanmasını ve kültür boyunca kararlı kalmasını sağlamıştır. Her üç günde bir ortam değişimi yapılarak kültüre devam edilmiştir.



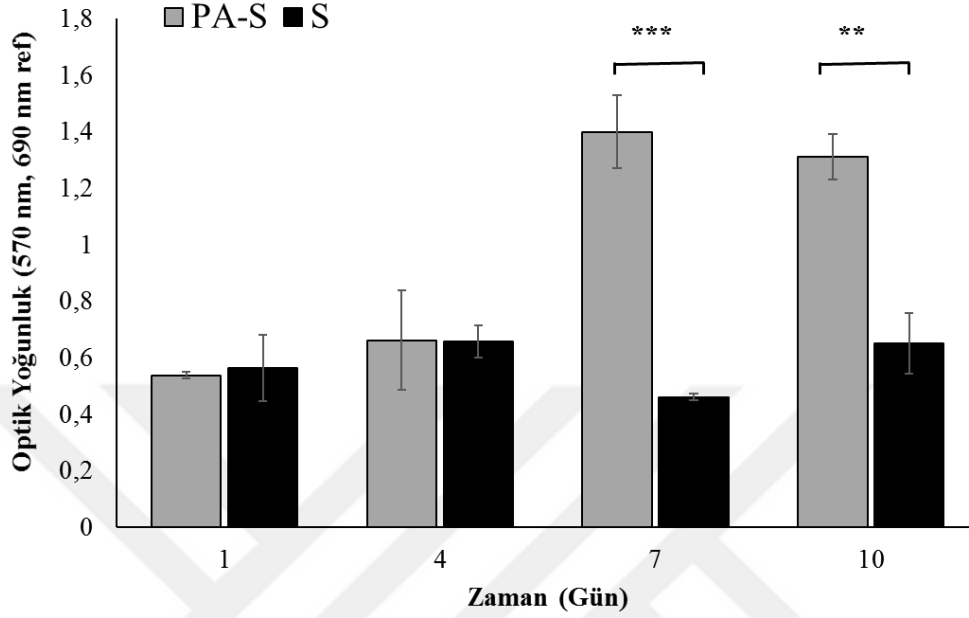
Şekil 4.34. Sferoidlerin PA-GFOGER+RGDS hidrojeline enkapsülasyon sonrası görüntüsü.

4.6.3. Sferoidlerin Durgun Kültür Analizleri

4.6.3.1. Proliferasyonun Belirlenmesi

Geliştirilen hidrojin hücre çoğalması ve canlılığına olan etkisinin incelenmesi için sferoidler hidrojel içeren (PA-S) ve içermeyen (S) ortamlarda durgun olarak kültüre edilmiştir. Gerçekleştirilen MTT analizinden elde edilen sonuçlar durgun koşullar altında hücrelerin 10 günlük kültür boyunca canlılığını devam ettirdiğini göstermiştir (Şekil 4.35). Peptit amfifil hidrojel içindeki sferoidlerin mitokondriyal aktivitesinin 4. günden itibaren arttığı ve hidrojel içermeyen kontrol grubuna göre özellikle 7. ve 10. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ile daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç sferoidlerin ECM benzeri bir matris olmadan da canlılıklarını sürdürdüklerini, ancak aktivitenin artması için

ECM benzeri yapıya ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar geliştirilen hidrojelin karaciğer modeli üretmek için uygun bir malzeme olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.35. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun hücre kültüründe mitokondriyal aktivitenin zamana bağlı değişimi (n=3 ** p<0.01, *** p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).

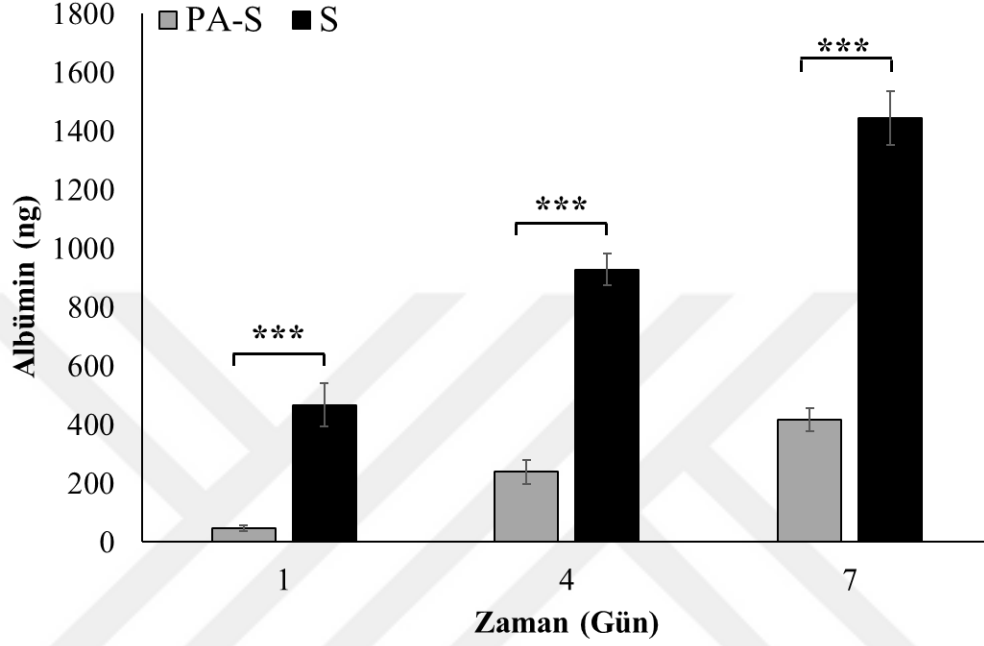
4.6.3.2. Albumin Salımı

Geliştirilen ECM benzeri hidrojel yapısının hepatosit fonksiyonları üzerine etkisini araştırmak için sferoidlerden besin ortamına salınan albumin miktarı özgül antijen-antikor arasındaki reaksiyona dayanan ELİSA analizi ile ölçülmüştür. Besin ortamına salınan albumin miktarı kalibrasyon grafiği (EK 1) kullanılarak hesaplanmıştır.

Sferoidlerin durgun koşullardaki kültürünün kümülatif albumin salım miktarları Şekil 4.36’da sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar, tüm gruplarda albumin miktarının günlere bağlı olarak doğrusal bir şekilde arttığını ve 7. günün sonunda hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin 416 ± 40 ng/ μ L, hidrojelsiz sferoidlerin ise 1444 ± 92 ng/ μ L’ye ulaştığını göstermektedir. Sferoidlerin hidrojelsiz kültüründe albumin salım değerleri tüm günler için istatistiksel açıdan çok önemli bir farklılıkla hidrojelli kültürden yüksektir.

Bir hücrenin albumin salım miktarını karşılaştırmak için salınan albumin miktarı MTT analizi ile normalize edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.37’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre

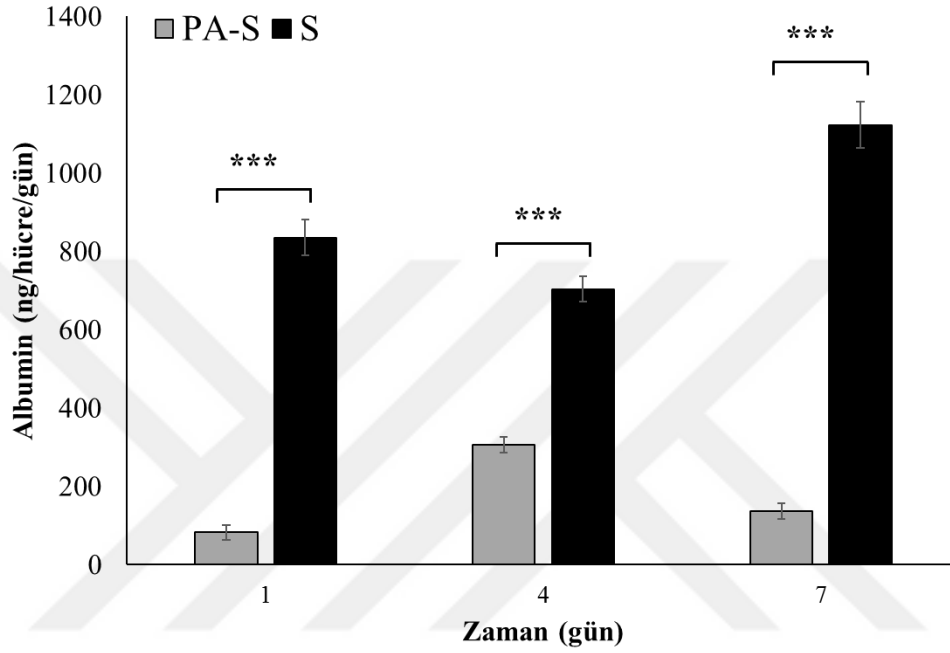
sferoidler ile hidrojel sferoidler arasında 1. gün büyük bir fark gözlenmiştir ($p<0.001$). Başlangıçta aynı sayı ile başlanan kültürde ilk gün hücre canlılıkları aynı olmasına rağmen albumin salım miktarında 1 günde bu kadar fark oluşmasının sebebi hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin mikroçevreye adapte olmasından ve/veya sferoidlerden salınan albumin miktarının hidrojelde tutuklu kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.36. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun kültüründe kümülatif albumin salım değerlerinin karşılaştırılması ($n=3$ *** $p<0.001$ istatistiksel önemi temsil etmektedir).

Hidrojelsiz sferoidlerde 1.gün ile 4. arasında hücre başına salınan albumin miktarında artış gözlenmiştir ($p<0.001$). Hidrojelli sferoidlerin 1.gün ile 4. gün arasında hücre sayısında artış olmamasına rağmen bir hücrenin sentezlediği albumin miktarında artış gerçekleşmiş olması sferoidlerin kültürün ilk günü kültüre adapte olduğunu ve sonrasında albumin sentezini arttırdığını göstermektedir. Hücre sayıları ve kültür koşulları aynı olmasına rağmen, hidrojelli sferoidlerde bir hücrenin salgıladığı albumin miktarının hidrojelsiz sferoidlerden anlamlı ölçüde düşük olması salınan albuminin jel içinde hapsoldüğünü gösterir ($p<0.001$). Chan ve ark. mikroakışkan cihaz kullanarak ürettikleri aljinat ve aljinat-kolajen hidrojelini ile enkapsüle edilmiş HepG2 sferoidlerde albumin gibi büyük proteinlerin hidrojelden difüzyonunun daha yavaş olduğunu bildirmiştir [169].

Hidrojelli sferoidlerin kültürün 4. günü ile 7. günü arasında hücre başına salgıladığı albumin miktarında arasında düşüş gözlenmiştir ($p<0.01$). MTT sonuçlarına baktığımızda 4. günden 7. güne kadar hücreler aktif olarak çoğalmıştır. Sferoidlerin kültür boyunca hücre sayısı değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmezken kültürün 4. günü ile 7. günü arasında bir hücrenin salgıladığı albumin miktarı çok anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.001$). Tüm sonuçlar hücrelerin çoğalırken farklılaşmış işlevlerini azalttığını göstermektedir.



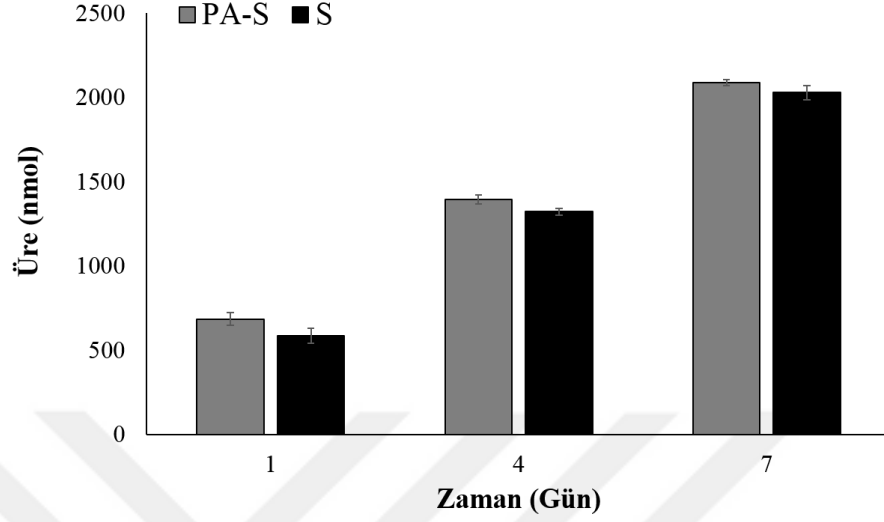
Şekil 4.37. Sferoidlerin hidrojelli (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun kültüründe MTT analizi ile normalize edilmiş albümin salımının zamana bağlı değişimi ($n=3$ *** $p<0.001$ istatistiksel önemi temsil etmektedir).

4.6.3.3. Üre Salımı

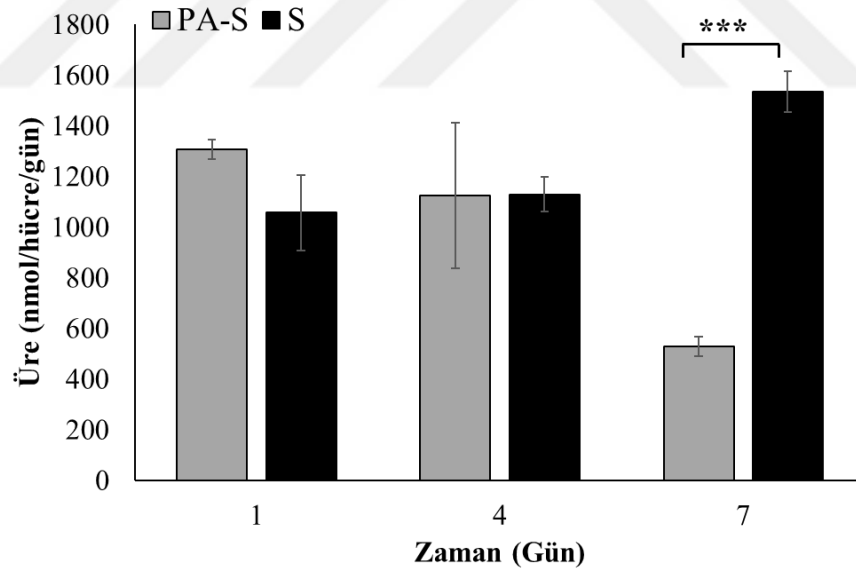
Geliştirilen ECM benzeri hidrojel yapısının hepatosit fonksiyonları üzerine etkisini araştırmak için sferoidlerden besin ortamına salınan üre miktarı kalorimetrik üre kiti ile ölçülmüştür. Besin ortamına salınan üre miktarı kalibrasyon grafiği (EK 2) kullanılarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.38’de verilen sferoidlerin durgun koşullardaki kültürünün kümülatif üre salım grafiğinde, tüm grupların üre salım miktarının günlere bağlı olarak doğrusal bir şekilde arttığı ve 7. günün sonunda hidrojelli sferoidlerde 2086 ± 18 nmol/mL, normal sferoidlerde ise 2027 ± 40 nmol/mL’ye ulaştığı göstermektedir. Sferoidlerin ECM benzeri mikroçevrede kültür edilmesi kümülatif üre miktarı üzerinde anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Fakat sferoidlerin hidrojeller ile enkapsülasyonunun hücre canlılığını anlamlı bir şekilde arttırdığı

göz önüne alındığında bir hücrenin sentezlediği üre miktarını hesaplamak için sonuçlar MTT analizi ile normalize edilmiş ve Şekil 4. 39’da verilmiştir.



Şekil 4.38. Sferoidlerin hidrojelili (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun kültüründe kümülatif üre salımı.



Şekil 4.39. Sferoidlerin hidrojelili (PA-S) ve hidrojelsiz (S) olarak durgun kültüründe MTT analizi ile normalize edilmiş üre salımının zamana bağlı değişimi (n=3 ***p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).

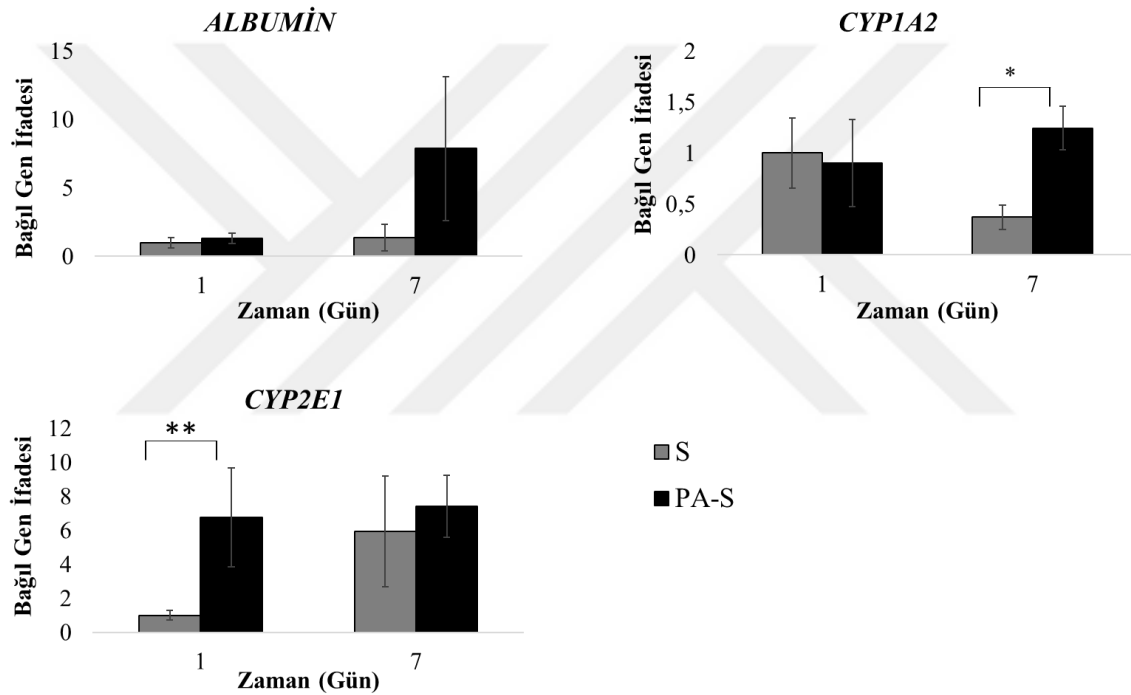
Hidrojelili ve hidrojelsiz sferoidlerde bir hücreden salınan üre miktarları arasında 1. ve 4. gün için anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat 7. gün üre salım miktarları arasında hidrojelili sferoidlerde çok anlamlı derecede düşüş gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç salınan albümin

miktarına benzer profil sergileyerek 7. günde hidrojelili sferoidlerin çok anlamlı bir farkla proliferasyona gitmesi ile ilişkilendirilmiştir.

4.6.3.4. Bağlı Gen İfadelerinin Belirlenmesi

Geliştirilen karaciğer organoidlerinin işlevselliğini gen ifadesi düzeyinde incelemek için RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda HepG2 hücrelerinde ilaç biyotransformasyonunun gerçekleştiği metabolik yol izinde yer alan *CYP1A2*, *CYP 2E1* ve *ALBUMİN* genleri için bağlı gen ifadeleri belirlenmiştir.

Sferoidlerin hidrojel içinde kültürü sonucunda *ALBUMİN* gen ifadesine ait sonuçlar Şekil 4.40'da sunulmaktadır.



Şekil 4.40. Sferoidlerin hidrojelili (PA-S) ve hidrojelsiz (S) durgun kültüründe *ALBUMİN*, *CYP1A2* ve *CYP2E1* gen ifadelerinin zamanla değişimi (n=3 * p<0.05, ** p<0.01 istatistiksel önemi temsil etmektedir).

Sferoidlerin ilk gün *ALBUMİN* gen ifadeleri benzer özellik göstermiştir. Hidrojel ile enkapsüle edilmiş sferoidlerin *ALBUMİN* gen ifadelerinde 7. günde önemli bir artış gözlenmesine rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Hidrojelili örneklerde besin ortamına salınan albümin miktarı hidrojelsiz sferoidlere göre çok düşük olmasına rağmen gen ekspresyonu açısından anlamlı bir fark görülmemesi; albüminin besin ortamına salınmasında hidrojelin bariyer oluşturduğunu kanıtlamaktadır.

İlaç metabolizmasında görev alan cyp2E1 ve cyp1A2 enzimleri faz 1 reaksiyonlarında etkilidirler. Bu metabolik enzimlerin mRNA düzeyleri karaciğer hücrelerinin işlevselliği ile doğru orantılı olarak değişir. RT-PCR analizi sonuçları sferoidlerin 3 boyutlu ve heterojen kültürüne bağlı olarak bu enzimlerin gen bölgelerini ifade ettiğini göstermektedir. Hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin *CYP2E1* gen düzeyi 1. günde anlamlı bir fark ile hidrojelsiz olanlara göre daha yüksek bir ifade gösterirken, *CYP1A2* bağıl gen ifadesinde anlamlı farklılık 7. günde görülmüştür.

4.6.4. Dinamik Hücre Kültür Çalışmaları

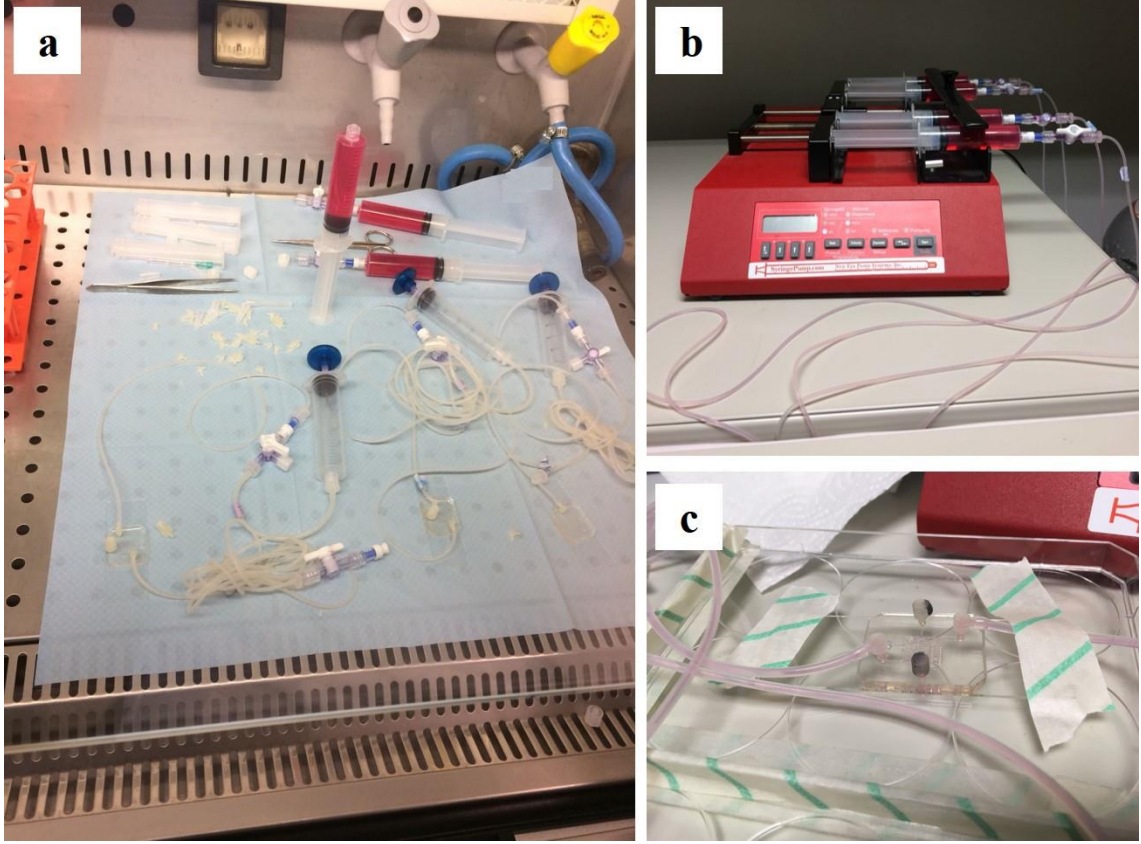
Mühendislik tasarım ilkeleri ve üretim yaklaşımları kullanarak organların fonksiyonel ünitelerini taklit eden 3B mikroakışkan hücre kültür sistemlerine “çip-üstü-organ” adı verilmektedir. Perfüzyon sistemin bu çiplere entegrasyonu ile hücrelerin canlılığını devam ettirebilmek için ihtiyaç duyduğu oksijen ve besin maddelerinin ve test edilecek kimyasalların hücrelere iletilmesi ve atıkların hücrelerden uzaklaştırılmasında vücuttaki vasküler sisteme benzer şekilde gerçekleşir. Prosesin alt akımından alınan örnekler dokunun canlılığı ve işlevselliğinin takip edilmesine olanak tanır.

Bu bölümde çip üstü karaciğer sistemi oluşturulmuş ve karakterizasyonu yapılan işlevsel sferoidlerin hidrojelli ve hidrojelsiz mikroçevrede dinamik kültür çalışmaları yürütülmüştür. Durgun ve dinamik kültür koşullarının sferoid işlevselliği üzerine etkisi albumin ve üre salım miktarlarının ve gen ifadelerinin analiziyle incelenmiştir.

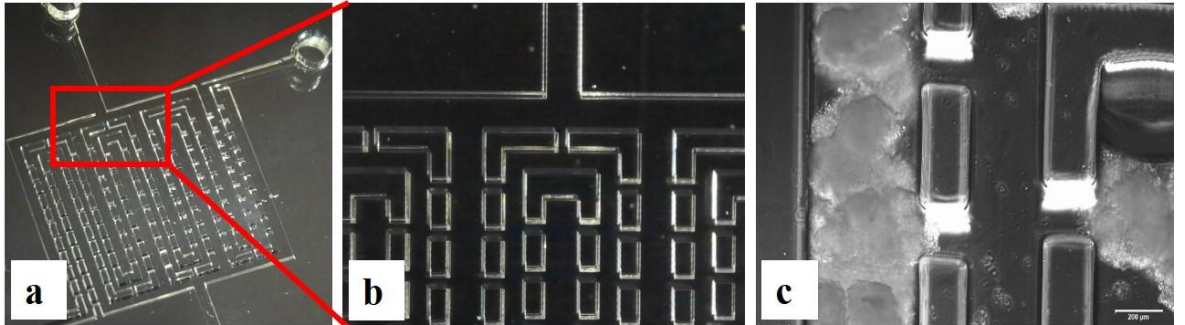
4.6.4.1. Çip-üstü-Karaciğer Sisteminin Geliştirilmesi

Çip üstü karaciğer sistemi; şırınga pompası, PDMS çipler, bağlantı elemanları ve rezervuardan oluşturulmuştur. Lamir akışlı kabin içinde steril örtü üzerinde tüm bağlantı elemanları steril olarak birbirine bağlanmıştır (Şekil 4.41 a). Beş gün önceden üretimi gerçekleştirilen sferoidler pipet yardımı ile çip içine (100 sferoid/çip) yerleştirilmiş (Şekil 4.42) ve PDMS çip perfüzyon hattına entegre edilmiştir (Şekil 4.41 c). Şırıngalara besin ortamı yüklemesi yapıldıktan sonra şırınga pompasına yerleştirilerek kültür ortamının perfüzyon hattına dağıtımı sağlanmıştır (Şekil 4.41 b). Literatürde Bhise ve ark. 200 µL/sa [3], Lee ve ark. 5 µL/dk [85], Kang ve ark. ise 30–40 µL/sa [170], akış hızlarında çalışmıştır. Literatürde yer alan akış hızları dahilinde 10 µL/dk akış hızında çalışılmasına karar verilmiştir. Fakat bu akış hızı sistem için çok yüksek gelmiş ve sürekli sızmalar yaşandığı için perfüzyon biyoreaktör çalışmaları 5 µL/dk hız ile yürütülmüştür. Şırınga pompası ile kültür ortamı sisteme verildiğinde ortam doku çipinden geçerek rezervuarda (ters çevrilmiş luer uçlu şırıngada) toplanmıştır. Doku çipi ve ortam rezervuarının inkübatöre yerleştirilmesi

ile kontrollü çevre koşullarında (37°C, %5 CO₂) *in vitro* kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.41. Çip üstü karaciğer sisteminin kurulması a) Laminar akışlı kabin içinde sferoidlerin çip içine yerleştirilmesi ve steril sistem elamanlarının birleştirilmesi b) Kontrollü akış sağlayan şırınga pompasının sisteme entegrasyonu c) Sferoidleri içeren PDMS çipin sabitlenerek inkübatörde kültürü.



Şekil 4.42. Karaciğer çipinin optik mikroskop görüntüleri: a) Çip doku odasının üstten görüntüsü, b) Çip içi kanalların ve sütunların görüntüsü, c) Kanallara yerleşmiş sferoidlerin görüntüsü.

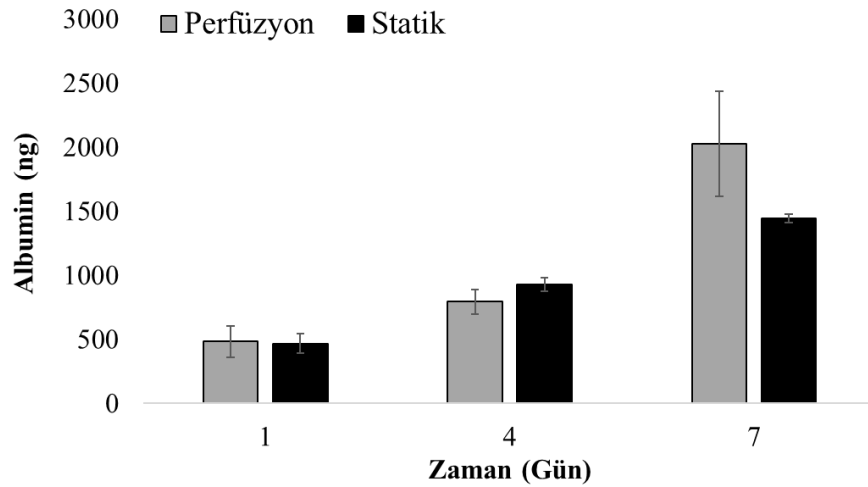
Hidrojel içeren sferoidlerin perfüzyon kültür çalışmalarında bir çip için 50 µL PA-GFOGER+RGDS (1:4) peptit amfifil çözeltisi 100 adet sferoid ile karıştırılmış ve pipet yardımı ile PDMS çip kanalına ekimi gerçekleştirilmiştir. Sferoidlerin kanallara yerleştirilmesinden sonra 0.010 mM CaCl₂ içeren vaskülarizasyon ortamında kültürü gerçekleştirilmiştir.

Hidrojin varlığında dolayı kanallarda tıkanma ve basınç yükselmeleri gerçekleştiği için bağlantı elemanlarından sızmalar meydana gelmiştir. Kültürün belirli günlerinde üç yönlü vana vasıtası ile alt akımdan albumin ve üre miktarı analizi için örnek alınmış, ancak sistemin işleyişinde yaşanan aksaklıklar nedeniyle bu örneklerin güvenilirliği düşmüştür. Bu sebeple hidrojel ile enkapsüle edilmiş sferoidlerin sadece RT-PCR analizi ile gen düzeyleri belirlenmiştir. Her sistem çip dizaynı ve hücre sayısına bağlı olarak hücrelerin işlevlerini ve canlılığını koruyarak çoğalmayı desteklediği optimum akış hızına sahiptir. Yapılacak modellemeler ile bu akış hızları öngörülerek deney tasarımı yapılmalıdır.

4.6.5. Sferoidlerin Çip-üstü-Karaciğer Sisteminde Dinamik Kültürü Analizleri

4.6.5.1. Albumin Salımı

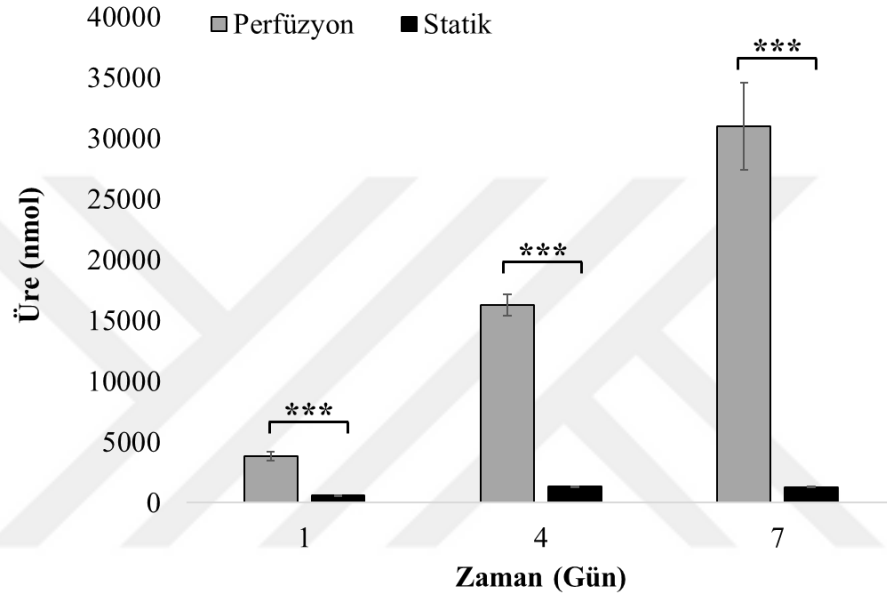
Perfüzyon kültür koşullarının besin ortamına salınan albumin miktarına etkisi durgun kültür ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.43'te sunulmuştur. Sferoidlerin durgun ve dinamik koşullardaki albumin salım miktarları kümülatif olarak artmış ve 7. günün sonunda perfüzyon kültürdeki sferoidlerden 2023±409 ng, statik kültürdeki sferoidlerden ise 1444±92 ng albumin salınmıştır. Perfüzyon kültürde salınan albumin miktarı durgun kültürden fazla olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.43. Sferoidlerin perfüzyon ve statik kültüründe kümülatif albumin salımlarının karşılaştırılması.

4.6.5.2. Üre Miktarının Belirlenmesi

Dinamik ve statik koşullarda kültürü yapılan sferoidlerin sentezleyerek besin ortamına salgıladıkları üre miktarı kümülatif olarak Şekil 4. 44'te verilmiştir. Grafikte perfüzyon kültürün durgun kültüre göre üre sentezlemesini oldukça yüksek bir düzeyde indüklediği görülmektedir ($p<0.001$). Perfüzyon kültür kümülatif üre miktarı değerlerinde günler arasında da çok anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir ($p<0.001$). Aynı artış benzer şekilde statik kültürün günleri arasında da gerçekleşmiştir ($p<0.001$).

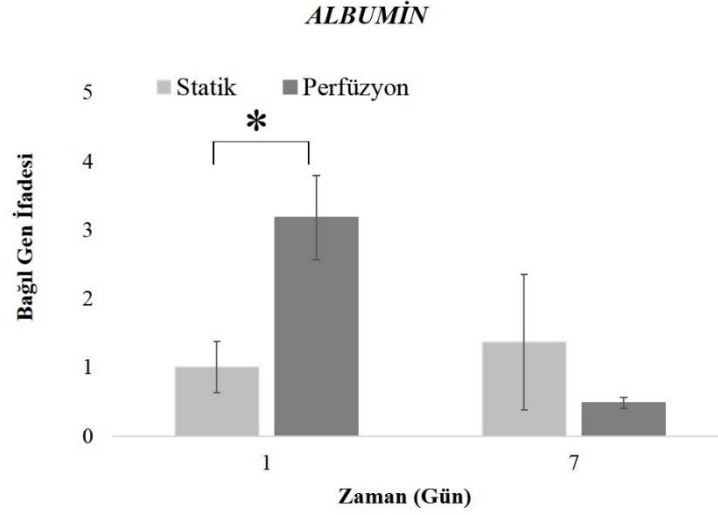


Şekil 4.44. Sferoidlerin perfüzyon ve statik kültürü kümülatif üre salımı ($n=3$ *** $p<0.001$ istatistiksel önemi temsil etmektedir).

4.6.5.3. Bağlı Gen İfadelerinin Belirlenmesi

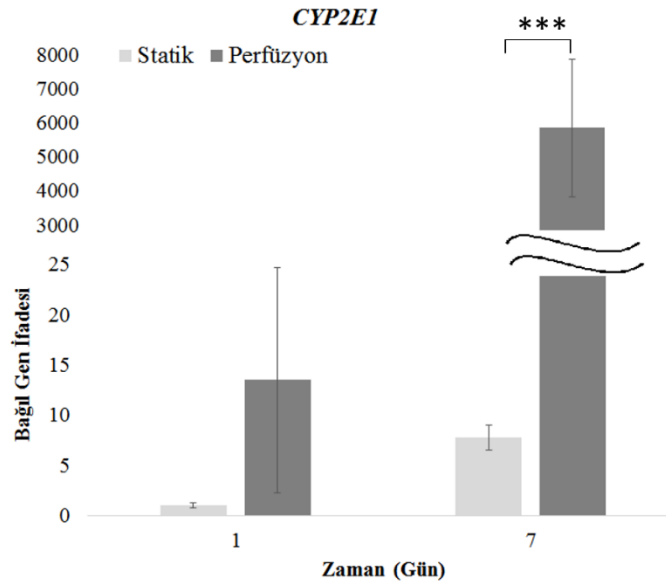
Geliştirilen çip üstü karaciğer sisteminde sferoidlerin 7 günlük kültürü sonunda *ALBUMİN* gen ifadelerinin 1. ve 7. gündeki değişimi Şekil 4.45'te gösterilmiştir.

Perfüzyon kültürde 1. günde *ALBUMİN* gen ifadesinin durgun kültüre göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur, bununla birlikte 7. günde perfüze edilen çipteki hücrelerin gen ifadesindeki azalma dikkat çekmiştir. Bu azalmaya akış hızının neden olduğu kayma kuvvetlerinin sebep olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple perfüzyon kültür çalışmalarında akış hızı optimizasyon çalışmalarının yürütülmesine karar verilmiştir. Kültürün 7. gününe ait *ALBUMİN* gen ifadesinde, durgun kültür ile perfüzyon kültür arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.



Şekil 4.45. Durgun ve perfüzyon kültür koşullarının sferoidlerin ALBUMİN gen ifadesi üzerine etkisi (n=3 * $p<0.05$ istatistiksel önemi temsil etmektedir).

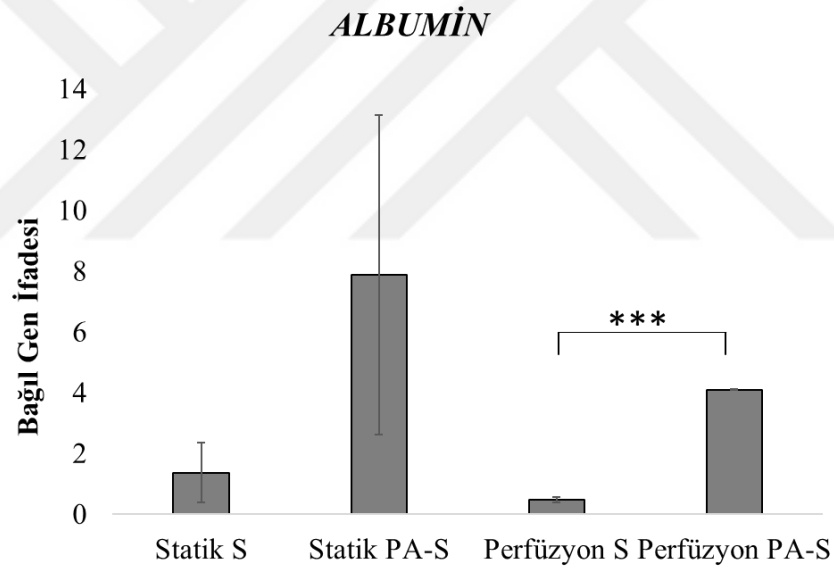
Dinamik ve statik koşullarda kültüre edilen sferoidlerin 1. ve 7. günlerindeki *CYP 2E1* gen ifade düzeyleri incelendiğinde (Şekil 4.46), dinamik kültür koşullarının gen ifade düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür ($p<0.001$). Ayrıca statik kültürün günleri arasında bir karşılaştırma yapıldığında kültürün 7. günündeki gen ifadesinin 1. günden anlamlı farkla yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.01$). Benzer şekilde dinamik kültür koşulları 7. gün gen ifadesinin 1. güne göre anlamlı ölçüde arttığı görülmüştür ($p<0.001$).



Şekil 4.46. Durgun ve perfüzyon kültür koşullarının sferoidlerin *CYP 2E1* gen ifadesi üzerine etkisi (n=3 *** $p<0.001$ istatistiksel önemi temsil etmektedir).

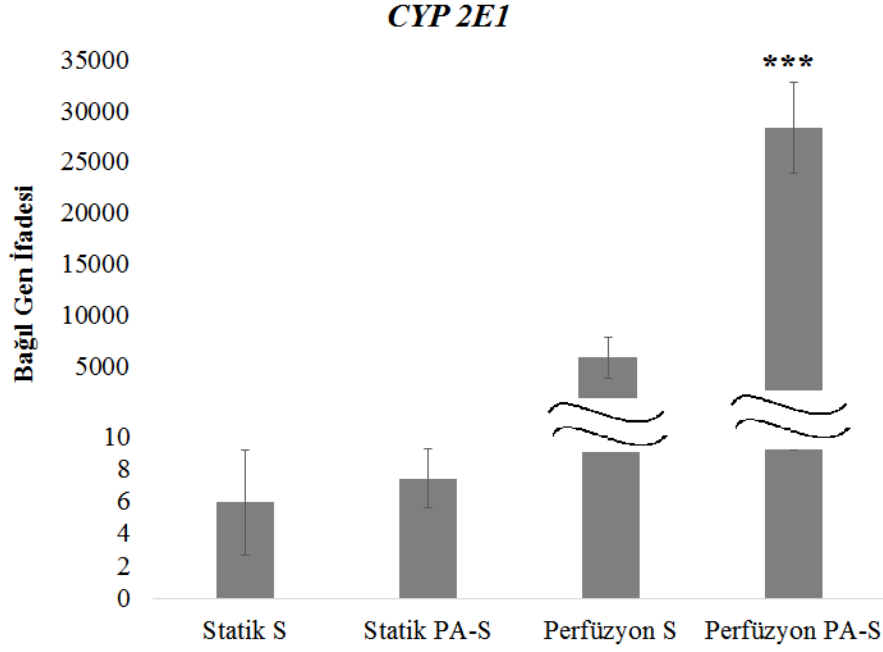
Yapılan çalışmada amaç hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin mikroakışkan sistem içinde perfüzyon kültürü ile karaciğer çipini geliştirmektir. Bu amaçla sferoidlerin hidrojel ve hidrojelsiz durgun ve perfüzyon kültürü yapılmış ve 7. günün sonunda *ALBUMİN*, *CYP 2E1* ve *CYP 1A2* gen ifadeleri RT-PCR ile analiz edilmiştir.

Yürütülen çalışma sonucunda hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerde hem durgun hem de perfüzyon kültür koşullarında hidrojelsiz kültüre göre daha fazla *ALBUMİN* gen ifadesi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.47). Özellikle perfüzyon kültürde hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin *ALBUMİN* gen ifadesinde hidrojelsiz sferoidlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. Bu farkın oluşmasına yönelik olarak hidrojin hücreler için akışa ve kayma gerilimine koruyucu etki göstermesi ve sferoidlerin akış ile süpürülmesine engel olduğu yorumu yapılmıştır. Çünkü hidrojelsiz sferoidlerin perfüzyon kültürü sonucunda Şekil 4.45'te gösterildiği gibi artan güne bağlı olarak azalma görülmüştür.



Şekil 4.47. Sferoidlerin hidrojel (PA-S) ve hidrojelsiz (S) durgun ve perfüzyon kültürünün *ALBUMİN* gen ifadesi üzerine etkisi (n=3 *** p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).

Şekil 4.48'de yer alan grafikte tüm gruplar için *CYP 2E1* gen ifadeleri verilmiştir. Perfüzyon kültür, gen ifade düzeyini hidrojel (p<0.001) ve hidrojelsiz (p<0.05) sferoidler için artırmıştır. Hidrojele enkapsüle edilen sferoidlerin perfüzyon kültürü en yüksek ekspresyon düzeyi vererek diğer gruplara göre anlamlı ölçüde fark oluşturmuştur (p<0.001).



Şekil 4.48 : Sferoidlerin hidrojelili (PA-S) ve hidrojelsiz (S) durgun ve perfüzyon kültürünün *CYP 2E1* gen ifadesi üzerine etkisi (n=3 * p<0.05, *** p<0.001 istatistiksel önemi temsil etmektedir).

RT PCR analizi sonuçları tez kapsamında öngörülen hidrojelili sferoidlerin perfüzyon kültürünün “çip-üstü-karaciğer” oluşturmak için en uygun grup olduğunu kanıtlamaktadır. Fakat 5 µL/dk akış hızında yürütülen perfüzyon kültür çalışmalarında çip içinde meydana gelen basınç yükselmelerine bağlı olarak bağlantı elemanlarındaki sızma sistemin kullanılabilirliğini etkilemektedir. Sızıntı probleminin aşılabilmesi için geliştirilen çipte akış optimizasyonu yapılması gerekmektedir.

GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında çip üstü karaciğer sistemi geliştirilmiştir. Çip için sferoidlerin üretimi ve karakterizasyonu yapılmıştır. Fibronektin mimetik peptit amfifiller ile kolajen mimetik peptit amfifillerden ECM mimetik peptit amfifil geliştirilmiş ve hücre kültürü çalışmaları için optimizasyonu yapılmıştır. Hidrojelli ve hidrojelsiz sferoidlerin durgun ve dinamik kültürü gerçekleştirilerek ilaç tarama ve toksisite testleri için kullanım potansiyelleri incelenmiştir. Tez kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Karaciğer modelini oluşturmak için karaciğerin sinüsoidinde yer alan hepatositler için HepG2 hücre hattı ve endotel hücreleri için HUVEC hücre hattı seçilmiş ve asılı damlacık yöntemi ile sferoid üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir.
- Sferoid oluşumu için gereken inkübasyon süresi optik mikroskop görüntüleri ile takip edilmiş ve 5 günlük inkübasyon süresi sonunda küresel form kazandıkları görülmüştür.
- Sferoidlerdeki iki farklı hücre TCPS yüzeylerdeki üreme davranışı ve ikilenme süresine bağlı olarak 2:1 (HepG2:HUVEC) oranında karıştırılmasına karar verilmiştir.
- Optik mikroskop görüntülerinin Image J programında analizi ile sferoid çapları 1000, 1500 ve 2000 hücre için sırasıyla 329 ± 43 , 428 ± 45 ve 512 ± 50 μm hesaplanmıştır. Sferoid merkezinde nekrotik bölge oluşmaması için sferoid çapı 500 mikrondan küçük olmalıdır. Bu sebeple 1500 hücre içeren sferoidler kullanımına karar verilmiştir.
- Sferoidlerin canlılığını incelemek için canlı-ölü boyaması yapılmış ve bütün gruplar için yüksek canlılık elde edilmiştir. Bununla birlikte hücre sayısı arttıkça sferoid merkezinde ölü hücrelerin arttığı gözlenmiştir.
- Sferoidlerin morfolojisi incelemek için yapılan SEM analizinde HepG2 sferoid ile HepG2+HUVEC sferoidlerinin yüzeylerinin farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca dış yüzeyinde gözlenen 2-3 μm çapındaki porlar karaciğerdeki bile kanalcıkları (1-3 μm) ile benzer özelliktedir.
- Hepatositlerin karaciğere spesifik fonksiyonları (albumin sentezi ve ilaç biyotransformasyonu) devam ettirdiği albumin ve cyp redüktaz proteinlerinin immüno Floresan boyanması ile gösterilmiştir.

- Sferoidlerdeki HepG2 ve HUVEC hücre organizasyonunu ve damarlanmayı incelemek için vWF boyaması yapılmış ve konfokal görüntülerinde HUVEC hücrelerinin HepG2 hücrelerini çevrelediği görülmüştür. Böylece HepG2 ile HUVEC arasındaki kendiliğinden düzenlenme ve hücre sıralanma prosesinin gerçekleştiğini kanıtlanmıştır. Ayrıca dış yüzeyden merkeze doğru 35 µm derinlikteki tübüler yapılar damarlanma olduğunu göstermektedir.
- Yapılan analizler sonucunda 1500 hücre içeren HepG2+HUVEC (2:1) sferoidlerin damarlı ve işlevsel olduğu bulunmuş ve tez kapsamında bu sferoidler ile durgun ve dinamik kültür çalışmalarına devam edilmiştir.
- Sferoidlerin *in vitro* kültürde hücre canlılığının ve işlevselliğinin artırılması için ihtiyaç duyduğu ECM yapısı PA-GFOGER ve PA-RGDS peptit amfifillerinden oluşturulmuştur.
- PA-RGDS (-1 yüklü) ve PA-GFOGER (+4 yüklü) %2 (w/v) derişimde hazırlanarak 4:1 oranında karıştırılmış ve PA-GFOGER+RGDS peptit amfifil çözeltisi elde edilmiştir. Peptit amfifiller 100 mM CaCl₂ ile çapraz bağlanarak ECM-mimetik hidrojel elde edilmiştir.
- ATR-FTIR analizi sonucu 1625-1630 cm⁻¹ aralığında görülen amid I (proteinlerdeki C=O gerilmesi) bantları peptit amfifillerdeki nanofiber düzenlenmenin β-tabaka ikincil yapı üzerinden gerçekleştiği söylenebilir. Dairesel Dikroizm analizi 220 nm dalga boyundaki geniş negatif bant ve 201 nm'deki büyük pozitif bant, moleküllerin kalsiyum eklenmesi sonrası nanofiber düzenlenmenin β-tabaka olduğunu kanıtlanmıştır. CD analiz sonucu ATR FTIR analizini desteklemiştir.
- TEM analizi sonucu elde edilen görüntülerden PA-RGDS nanofiberlerin 11±2.6 nm, PA-GFOGER nanofiberlerin ise 9±1.6 nm ve PA-GFOGER+RGDS (1:4) nanofiberlerin 10±1.3 nm çapa sahip oldukları görülmüştür. PA-GFOGER ve PA-GFOGER+RGDS (1:4) hidrojellerin kendiliğinden düzenlenme ve jelleşme sonrasında birleşerek 75-100 nm çapa sahip fiber demetlerini oluşturduğunu görülmüştür. ECM mimetik peptit amfifil hidrojellerde görülen bu davranış insan vücudundaki ECM bileşenlerinin hiyerarşik organizasyonu ile benzerlik göstermektedir.
- SEM görüntüleri incelendiğinde PA-RGDS hidrojelinin ortalama 57±8 nm çapa sahip fiberlerden, GFOGER+RGDS (1:4) hidrojelinde ise 70±12 nm çapındaki fiberlerden oluşan ağsı yapıya sahip olduğu görülmüştür. PA-GFOGER+RGDS

örneklerinde yapıya PA-GFOGER'in katılması fiber demetlerinin daha düzenli bir şekilde oluşmasını sağlamıştır. Ayrıca SEM görüntülerinden elde edilen çap değerleri TEM görüntülerindeki fiber demetleri ile uyushmaktadır.

- Hidrojellerin reoloji analizi sonucunda tüm örneklerin viskoelastik karakterde olduğu görülmüştür. Depo modülüne göre hidrojeller; %2'lik (w/v) PA-RGDS > %1'lik (w/v) PA-RGDS > %2'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS > %1'lik (w/v) PA-GFOGER+RGDS olarak sıralanır. Kolajen katkılanması depo modülünü düşürmüştür. Bu sebeple %2 (w/v) derişime sahip peptit amfifillerin kullanımının uygun olacağına karar verilmiştir.
- PA-GFOGER+RGDS hidrojeli ile enkapsüle edilen sferoidler durgun koşullarda kültürü yapılmıştır. Hidrojelli sferoidlerin artan kültür günlerinde hücre proliferasyonunu anlamlı derecede artırmıştır. Kümülatif albumin ve üre salımında hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerden salınan 416 ± 40 ng/ μ L ve 2086 ± 18 nmol/mL iken sferoidlerin 1444 ± 92 ng/ μ L ve 2027 ± 40 nmol/mL olarak hesaplanmıştır. Albuminin besin ortamına salımında hidrojelin difüzyon bariyeri oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Üre salım miktarı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. *ALBUMİN*, *CYP1A2* ve *CYP2E1* genleri için bağıl gen ifadeleri RT-PCR analiziyle incelenmiştir. *ALBUMİN* geni için anlamlı bir fark bulunmazken *CYP1A2* geni için 7. gün *CYP2E1* geni için 1. gün gen ifadeleri hidrojelli sferoidlerde anlamlı artış göstermiştir.
- Çip üstü karaciğer sistemi; şırınga pompası, kültür ortam rezervuarı, PDMS çip ve bağlantı elemanlarından oluşturulmuştur. Sferoidler PDMS çip içerisinde hidrojelli ve hidrojelsiz olarak tek yönlü akış altında ve 5 μ L/dk akış hızında 7 günlük kültürü yapılmıştır.
- Hidrojelsiz sferoidlerin dinamik kültür koşulları altında 7. günün sonunda 2023 ± 409 ng albumin ve 31003 ± 3595 nmol üre, durgun koşullar altında 1444 ± 92 ng albumin ve 1279 ± 40 nmol üre salımı gerçekleştirmiştir. Salınan albumin miktarı gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmazken, üre miktarı çok anlamlı olarak perfüzyon kültürde artmıştır. Perfüzyon kültürün 1. gün *ALBUMİN* gen ifadesi ve 7. gün *CYP2E1* gen ifadesi durgun kültüre göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.
- Hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin perfüzyon kültüründe basınç yükselmeleri ve sızmalar oluştuğu için sonuçların güvenilirliği açısından salım analizleri

yapılmamış hidrojel örnekler üzerindeki perfüzyon kültürün etkisi gen ifadesi açısından değerlendirilmiştir. Tüm gruplar için *ALBUMİN*, *CYP1A2* ve *CYP2E1* genleri için bağıl gen ifadeleri incelendiğinde hidrojel ile enkapsüle edilen sferoidlerin *ALBUMİN* ve *CYP2E1* gen ifadeleri anlamlı düzeyde fark oluşturmuştur.

- Hidrojelsiz sferoidlerin perfüzyon kültür *ALBUMİN* gen ifadesi statik kültüre göre 1. gün anlamlı olarak artış gösterirken, kültürün 7. günde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu duruma perfüzyon sistemin akış hızının yüksek sebep olduğu düşünülmüştür. Ayrıca hidrojel sferoidlerin 7. gün *ALBUMİN* gen ifadesi hidrojelsiz sferoidlere anlamlı düzeyde fark oluşturmuştur. Bu farklılık hidrojin yüksek akış hızı kaynaklı kayma geriliminden koruduğu sonucunu ortaya koymaktadır.
- Tüm bu sonuçlar dahilinde ECM-mimetik hidrojel ile enkapsüle edilen HepG2+HUVEC (2:1) sferoidlerin çip-üstü-karaciğer oluşturmak için en uygun grup olduğunu kanıtlamıştır.

Sunulan tez çalışması kapsamında edinilen tüm bu bulguların ışığında ECM-mimetik hidrojel ile enkapsüle edilen HepG2+HUVEC (2:1) sferoidleri ile oluşturulan perfüze çip üstü karaciğer sistemi ilaç tarama ve toksisite testleri için uygun bir *in vitro* model olduğu görülmüştür. Akış hızı, sferoid çapı, hücre sayısı ve hidrojin reolojik özellikleri çip üstü karaciğer sisteminin oluşturulmasında önemli parametreler olup sistemde oluşan sızmaları engellemek için optimizasyon çalışmaları yürütülecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Dünya'da ve Türkiye'de İlaç Sektörü. http://www.vergidegundem.com/documents/10156/78907/xLAX_SEKTxRx_SUNUM_NxHAX.pdf, 2011 (05.09.2015.).
- [2] J.J.S. Tonder, V. Gulumian, M., Pre-Clinical Assessment of the Potential Intrinsic Hepatotoxicity of Candidate Drugs,, in: D.S. Gowder (Ed.), New Insights into Toxicity and Drug Testing, InTech2013.
- [3] N.S. Bhise, V. Manoharan, S. Massa, A. Tamayol, M. Ghaderi, M. Miscuglio, Q. Lang, Y.S. Zhang, S.R. Shin, G. Calzone, A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids, *Biofabrication* 8(1) (2016) 014101.
- [4] S. Arıcı, Toksik hepatit, *Pamukkale Tıp Dergisi* (2) (2008) 113-119.
- [5] S.N. Bhatia, D.E. Ingber, Microfluidic organs-on-chips, *Nature biotechnology* 32(8) (2014) 760.
- [6] D. Huh, G.A. Hamilton, D.E. Ingber, From 3D cell culture to organs-on-chips, *Trends in cell biology* 21(12) (2011) 745-754.
- [7] Y. Qiu, K. Park, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Advanced drug delivery reviews* 53(3) (2001) 321-339.
- [8] M.J. Webber, E.J. Berns, S.I. Stupp, Supramolecular nanofibers of peptide amphiphiles for medicine, *Israel journal of chemistry* 53(8) (2013) 530-554.
- [9] A. Manandhar, M. Kang, K. Chakraborty, P.K. Tang, S.M. Loverde, Molecular simulations of peptide amphiphiles, *Organic & biomolecular chemistry* 15(38) (2017) 7993-8005.
- [10] J. Luo, Y.W. Tong, Self-assembly of collagen-mimetic peptide amphiphiles into biofunctional nanofiber, *Acs Nano* 5(10) (2011) 7739-7747.
- [11] Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Sanayi Genel Müdürlüğü, İlaç Sektörü Raporu (2015/1), Sektörel Raporlar ve Analizler Serisi, 2015.
- [12] Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Sanayi Genel Müdürlüğü, Türkiye İlaç Sektörü Strateji Belgesi ve Eylem Planı (2015-2018), 2015.
- [13] The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, The Pharmaceutical Industry in Figures, 2014.
- [14]http://www.pinsdaddy.com/against-method-the-hump-of-camel_6ZPNBTpIrZNSr4HF89N9FIEBUFFbK4t8EprUV%7CO5cc/HxqwbeyxwsKgYC9rw8qTZTGUiI8fU9rF1MMZJBqrY6AuzZluFVdpFwdTxMoBZ4ozspGiMxGHWDJsHhsnYFHI*AGGv*hYqrJtBunKLrpR24BePz0dBANfGtWXssy7KpCl90Be4CjtmQUFwZf*OjfYICNX8KQYQNJdnombiBunMRk/, (21 Kasım.2015).
- [15] V. DeeAnn, Will Advances in Preclinical In Vitro Models Lower the Costs of Drug Development?, *Applied In Vitro Toxicology* 1(1) (2015) 79-82.
- [16] A.C. Guyton, J.E. Hall, H. Çavuşoğlu, B.Ç. Yeğen, Z. Aydın, İ. Alican, Tıbbi fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri2007.
- [17] S.R. Abdel-Misih, M. Bloomston, Liver anatomy, *Surgical Clinics* 90(4) (2010) 643-653.
- [18] T.W. Sadler, A.C. Başaklar, K. Sönmez, Langman's medikal embriyoloji, Palme Yayıncılık1996.

- [19] K. Arıncı, A. Elhan, Anatomi 1. cilt, Güneş Kitabevi, Ankara 388 (1995).
- [20] N.E. Bektur, Silymarin'in Asetaminofen (Parasetamol) Kaynaklı Karaciğer ve Böbrek Toksisitesi Üzerine İyileştirici Etkisi, Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2012.
- [21] C.M. Townsend, D.C. Sabiston, Sabiston textbook of surgery, 17th edition, board review, Elsevier Saunders, Philadelphia; London, 2005.
- [22] E. Özçelik, Kitosan Ve Blueberry'nin Asetaminofen Aracılı Karaciğer Toksisitesi Üzerine Etkileri, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2012.
- [23] L. Tür, N. Sözbilir, Karbon tetraklorür ile karaciger hasarı olusturulan ratlarda Matricaria chamomilla l.'nin karaciger üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması, Doctoral thesis, University of Afyon Kocatepe, Institute of Health Science, Afyon, Turkey, 2008.
- [24] K. Barrett, S. Barman, S. Boitano, H. Brooks, Ganong'un tıbbi fizyolojisi, Çeviri editörü: Hakkı Gökbel 23 (2011).
- [25] M.R. Gerasymchuk, Pathophysiology of liver, <https://www.slideshare.net/MartaGerasymchuk/pathophysiology-of-liver>, 2013 (08.02.2018).
- [26] L. Junqueira, Carneiro J (Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S), Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevi (2006) 431-47.
- [27] I. Sheikh, Hepatic physiology & liver function tests. <<https://www.slideshare.net/imransheikh988/hepatic-physiology-liver-function-tests>>, (21 Kasım.2015).
- [28] https://medicine.academic.ru/99185/hepatic_acinus, (21 Kasım 2015.).
- [29] L. Gartner, J. Hiatt, Color textbook of histology, editors LP Gartner, JL Hiatt, third edition Saunders elsevier (2007).
- [30] W. Ganong, Tıbbi fizyoloji (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği), Nobel Tıp Kitapevleri (2002).
- [31] M. Eren, İ.N. Saltık-Temizel, N. Koçak, İlaça bağlı hepatotoksisite, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 47 (2004) 222-27.
- [32] S. Rollas, İlaçların metabolizması (Biyotransformasyon), Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 1992.
- [33] N. Noyanalpan, Farmasötik ve Medisinal Kimya Ders Kitabı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 1978.
- [34] M. Kesim, C. Şahan, E. Güner, Hepatik İlaç Metabolizması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi 18(2) (2001) 154-160.
- [35] I.J. Onakpoya, C.J. Heneghan, J.K. Aronson, Worldwide withdrawal of medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review and analysis, Critical reviews in toxicology 46(6) (2016) 477-489.
- [36] L. Ma, J. Barker, C. Zhou, W. Li, J. Zhang, B. Lin, G. Foltz, J. Küblbeck, P. Honkakoski, Towards personalized medicine with a three-dimensional micro-scale perfusion-based two-chamber tissue model system, Biomaterials 33(17) (2012) 4353-4361.
- [37] K.E. Sung, D.J. Beebe, Microfluidic 3D models of cancer, Advanced drug delivery reviews 79 (2014) 68-78.

- [38] Z. Wang, R. Samanipour, K. Kim, Organ-on-a-chip platforms for drug screening and tissue engineering, *Biomedical engineering: frontier research and converging technologies*, Springer 2016, pp. 209-233.
- [39] M. Rimann, U. Graf-Hausner, Synthetic 3D multicellular systems for drug development, *Current opinion in biotechnology* 23(5) (2012) 803-809.
- [40] J.L. Horning, S.K. Sahoo, S. Vijayaraghavalu, S. Dimitrijevic, J.K. Vasir, T.K. Jain, A.K. Panda, V. Labhasetwar, 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs, *Molecular pharmaceutics* 5(5) (2008) 849-862.
- [41] P. Olinga, D. Schuppan, Precision-cut liver slices: a tool to model the liver ex vivo, *Journal of Hepatology* 58(6) (2013) 1252-1253.
- [42] V. Starokozhko, G.M. Groothuis, Judging the value of 'liver-on-a-chip' devices for prediction of toxicity, Taylor & Francis, 2017.
- [43] C. Lin, S.R. Khetani, Advances in engineered liver models for investigating drug-induced liver injury, *BioMed research international* 2016 (2016).
- [44] T. Lu, Y. Li, T. Chen, Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *International journal of nanomedicine* 8 (2013) 337.
- [45] B. Chan, K. Leong, Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, *European spine journal* 17(4) (2008) 467-479.
- [46] J.W. Nichol, A. Khademhosseini, Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up, *Soft matter* 5(7) (2009) 1312-1319.
- [47] G. Mehta, A.Y. Hsiao, M. Ingram, G.D. Luker, S. Takayama, Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy, *Journal of Controlled Release* 164(2) (2012) 192-204.
- [48] K.-L. Ou, H. Hosseinkhani, Development of 3D in vitro technology for medical applications, *International journal of molecular sciences* 15(10) (2014) 17938-17962.
- [49] H.B. Frieboes, X. Zheng, C.-H. Sun, B. Tromberg, R. Gatenby, V. Cristini, An integrated computational/experimental model of tumor invasion, *Cancer research* 66(3) (2006) 1597-1604.
- [50] W. Asghar, R. El Assal, H. Shafiee, S. Pitteri, R. Paulmurugan, U. Demirci, Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models, *Materials Today* 18(10) (2015) 539-553.
- [51] M. Alemany-Ribes, C.E. Semino, Bioengineering 3D environments for cancer models, *Advanced drug delivery reviews* 79 (2014) 40-49.
- [52] K. Duval, H. Grover, L.-H. Han, Y. Mou, A.F. Pegoraro, J. Fredberg, Z. Chen, Modeling Physiological events in 2D vs. 3D cell culture, *Physiology* 32(4) (2017) 266-277.
- [53] P.M. Kharkar, K.L. Kiick, A.M. Kloxin, Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments, *Chemical Society Reviews* 42(17) (2013) 7335-7372.
- [54] B.A. Justice, N.A. Badr, R.A. Felder, 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays, *Drug discovery today* 14(1-2) (2009) 102-107.
- [55] S. May, S. Evans, L. Parry, Organoids, organs-on-chips and other systems, and microbiota, *Emerging Topics in Life Sciences* 1(4) (2017) 385-400.

- [56] D. Visk, Will Advances in Preclinical In Vitro Models Lower the Costs of Drug Development?, *Applied In Vitro Toxicology* 1(1) (2015) 79-82.
- [57] D. Huh, Y.-s. Torisawa, G.A. Hamilton, H.J. Kim, D.E. Ingber, Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips, *Lab on a Chip* 12(12) (2012) 2156-2164.
- [58] C.Y. Chan, P.-H. Huang, F. Guo, X. Ding, V. Kapur, J.D. Mai, P.K. Yuen, T.J. Huang, Accelerating drug discovery via organs-on-chips, *Lab on a Chip* 13(24) (2013) 4697-4710.
- [59] M. Lutolf, J. Hubbell, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nature biotechnology* 23(1) (2005) 47.
- [60] L. MacQueen, Y. Sun, C.A. Simmons, Mesenchymal stem cell mechanobiology and emerging experimental platforms, *Journal of The Royal Society Interface* 10(84) (2013) 20130179.
- [61] Q. Yang, Q. Lian, F. Xu, Perspective: Fabrication of integrated organ-on-a-chip via bioprinting, *Biomicrofluidics* 11(3) (2017) 031301.
- [62] R. Thuenauer, E. Rodriguez-Boulán, W. Römer, Microfluidic approaches for epithelial cell layer culture and characterisation, *Analyst* 139(13) (2014) 3206-3218.
- [63] Y. Nakao, H. Kimura, Y. Sakai, T. Fujii, Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device, *Biomicrofluidics* 5(2) (2011) 022212.
- [64] K.-J. Jang, K.-Y. Suh, A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells, *Lab on a Chip* 10(1) (2010) 36-42.
- [65] M. Vicente-Manzanares, F. Sánchez-Madrid, Cell polarization: a comparative cell biology and immunological view, *Clinical and Developmental Immunology* 7(2-4) (2000) 51-65.
- [66] D.M. Bryant, K.E. Mostov, From cells to organs: building polarized tissue, *Nature reviews Molecular cell biology* 9(11) (2008) 887.
- [67] D. Huh, B.D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H.Y. Hsin, D.E. Ingber, Reconstituting organ-level lung functions on a chip, *Science* 328(5986) (2010) 1662-1668.
- [68] K.-J. Jang, H.S. Cho, W.G. Bae, T.-H. Kwon, K.-Y. Suh, Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells, *Integrative Biology* 3(2) (2011) 134-141.
- [69] A. Grosberg, P.W. Alford, M.L. McCain, K.K. Parker, Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: heart on a chip, *Lab on a chip* 11(24) (2011) 4165-4173.
- [70] J.W. Allen, S.R. Khetani, S.N. Bhatia, In vitro zonation and toxicity in a hepatocyte bioreactor, *Toxicological sciences* 84(1) (2004) 110-119.
- [71] K.-H. Lee, J. Lee, S.-H. Lee, 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip, *Lab on a Chip* 15(19) (2015) 3822-3837.
- [72] Z. Wang, R. Samanipour, K.-i. Koo, K. Kim, Organ-on-a-chip platforms for drug delivery and cell characterization: A review, *Sens. Mater* 27(6) (2015) 487-506.
- [73] E.W. Young, E. Berthier, D.J. Guckenberger, E. Sackmann, C. Lamers, I. Meyvantsson, A. Huttenlocher, D.J. Beebe, Rapid prototyping of arrayed microfluidic systems in polystyrene for cell-based assays, *Analytical chemistry* 83(4) (2011) 1408-1417.

- [74] F.A. Gomez, Biological applications of microfluidics, John Wiley & Sons 2008.
- [75] B.J. Kirby, Micro-and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices, Cambridge university press 2010.
- [76] J.S. Kuo, D.T. Chiu, Controlling mass transport in microfluidic devices, Annual Review of Analytical Chemistry 4 (2011) 275-296.
- [77] A. Carraro, W.-M. Hsu, K.M. Kulig, W.S. Cheung, M.L. Miller, E.J. Weinberg, E.F. Swart, M. Kaazempur-Mofrad, J.T. Borenstein, J.P. Vacanti, In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels, Biomedical microdevices 10(6) (2008) 795-805.
- [78] A.M. Ghaemmaghami, M.J. Hancock, H. Harrington, H. Kaji, A. Khademhosseini, Biomimetic tissues on a chip for drug discovery, Drug discovery today 17(3-4) (2012) 173-181.
- [79] P.J. Lee, P.J. Hung, L.P. Lee, An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture, Biotechnology and bioengineering 97(5) (2007) 1340-1346.
- [80] Y. Du, N. Li, H. Yang, C. Luo, Y. Gong, C. Tong, Y. Gao, S. Lü, M. Long, Mimicking liver sinusoidal structures and functions using a 3D-configured microfluidic chip, Lab on a Chip 17(5) (2017) 782-794.
- [81] J.H. Sung, M.B. Esch, J.-M. Prot, C.J. Long, A. Smith, J.J. Hickman, M.L. Shuler, Microfabricated mammalian organ systems and their integration into models of whole animals and humans, Lab on a Chip 13(7) (2013) 1201-1212.
- [82] K. Domansky, W. Inman, J. Serdy, A. Dash, M.H. Lim, L.G. Griffith, Perfused multiwell plate for 3D liver tissue engineering, Lab on a chip 10(1) (2010) 51-58.
- [83] S.F. Wong, Y.Y. Choi, D.S. Kim, B.G. Chung, S.-H. Lee, Concave microwell based size-controllable hepatosphere as a three-dimensional liver tissue model, Biomaterials 32(32) (2011) 8087-8096.
- [84] S.-A. Lee, E. Kang, J. Ju, D.-S. Kim, S.-H. Lee, Spheroid-based three-dimensional liver-on-a-chip to investigate hepatocyte–hepatic stellate cell interactions and flow effects, Lab on a Chip 13(18) (2013) 3529-3537.
- [85] H. Lee, D.-W. Cho, One-step fabrication of an organ-on-a-chip with spatial heterogeneity using a 3D bioprinting technology, Lab on a Chip 16(14) (2016) 2618-2625.
- [86] N. Alepee, A. Bahinski, M. Daneshian, B. De Wever, E. Fritsche, A. Goldberg, J. Hansmann, T. Hartung, J. Haycock, H.T. Hogberg, t4 workshop report: State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology, Altex 31(4) (2014) 441.
- [87] S.İ. Deliloğlu-Gürhan, M.Ö. Özen, P. Sözer, İ. Lüleci, Kök Hücreler ve Doku Mühendisliği, Sağlıkta Birikim 1(5) (2009) 143-168.
- [88] Y.S. Zhang, K. Yue, J. Aleman, K. Mollazadeh-Moghaddam, S.M. Bakht, J. Yang, W. Jia, V. Dell'Erba, P. Assawes, S.R. Shin, 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication, Annals of biomedical engineering (2016) 1-16.
- [89] P. Benien, A. Swami, 3D tumor models: history, advances and future perspectives, Future Oncology 10(7) (2014) 1311-1327.

- [90] V. Mironov, R.P. Visconti, V. Kasyanov, G. Forgacs, C.J. Drake, R.R. Markwald, Organ printing: tissue spheroids as building blocks, *Biomaterials* 30(12) (2009) 2164-2174.
- [91] M.A. Lancaster, J.A. Knoblich, Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies, *Science* 345(6194) (2014) 1247125.
- [92] K. Jakab, C. Norotte, F. Marga, K. Murphy, G. Vunjak-Novakovic, G. Forgacs, Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells, *Biofabrication* 2(2) (2010) 022001.
- [93] T.R. Olsen, F. Alexis, Bioprocessing of tissues using cellular spheroids, *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 4(2) (2014) 1.
- [94] R. Rezende, F. Pereira, V. Kasyanov, D. Kemmoku, I. Maia, J. Da Silva, V. Mironov, Scalable biofabrication of tissue spheroids for organ printing, *Procedia CIRP* 5 (2013) 276-281.
- [95] S. Breslin, L. O'Driscoll, Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery, *Drug discovery today* 18(5) (2013) 240-249.
- [96] A.N. Mehesz, J. Brown, Z. Hajdu, W. Beaver, J. da Silva, R. Visconti, R. Markwald, V. Mironov, Scalable robotic biofabrication of tissue spheroids, *Biofabrication* 3(2) (2011) 025002.
- [97] Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells, *Biofabrication* 2(2001) (2010) 1-14.
- [98] Doku Muhendisliğinde Nanoteknoloji, *Bilim ve Teknik*, Yeni Ufuklara, 2007, p. 15.
- [99] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials* 29(20) (2008) 2941-2953.
- [100] G.M. Cooper, R.E. Hausman, *The cell: a molecular approach*, ASM Press 2007.
- [101] *Principle of Tissue Engineering Third Edition*, Elsevier, ABD, 2007.
- [102] K. Deligkaris, T.S. Tadele, W. Olthuis, A. van den Berg, Hydrogel-based devices for biomedical applications, *Sensors and Actuators B: Chemical* 147(2) (2010) 765-774.
- [103] Y.S. Zhang, A. Khademhosseini, Advances in engineering hydrogels, *Science* 356(6337) (2017) eaaf3627.
- [104] W. Hennink, C.F. Van Nostrum, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced drug delivery reviews* 64 (2012) 223-236.
- [105] F. You, B.F. Eames, X. Chen, Application of extrusion-based hydrogel bioprinting for cartilage tissue engineering, *International journal of molecular sciences* 18(7) (2017) 1597.
- [106] T.R. Hoare, D.S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer* 49(8) (2008) 1993-2007.
- [107] A. Datar, P. Joshi, M.-Y. Lee, Biocompatible hydrogels for microarray cell printing and encapsulation, *Biosensors* 5(4) (2015) 647-663.
- [108] J.L. Drury, D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications, *Biomaterials* 24(24) (2003) 4337-4351.
- [109] A. Atala, J.J. Yoo, *Essentials of 3D biofabrication and translation*, Academic Press 2015.

- [110] M. Santin, G. Phillips, History Of Biomimetic, Bioactive, And Bioresponsive Biomaterials, Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials: An Introduction to Integrating Materials with Tissues (2012) 1.
- [111] A. Atala, Regenerative medicine strategies, Journal of pediatric surgery 47(1) (2012) 17-28.
- [112] Z. Song, X. Chen, X. You, K. Huang, A. Dhinakar, Z. Gu, J. Wu, Self-assembly of peptide amphiphiles for drug delivery: the role of peptide primary and secondary structures, Biomaterials science 5(12) (2017) 2369-2380.
- [113] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, Principles of biochemistry, Worth Publishers, New York, 1993.
- [114] S. Sundar, engineering collagen mimetic peptide amphiphile hydrogels by tuning mechanical properties for biomedical applications, 2015.
- [115] E. Kokkoli, A. Mardilovich, A. Wedekind, E.L. Rexeisen, A. Garg, J.A. Craig, Self-assembly and applications of biomimetic and bioactive peptide-amphiphiles, Soft Matter 2(12) (2006) 1015-1024.
- [116] N.A. Campbell, J.B. Reece, Biology. 7th, Ed Pearson Benjamin Cummings. Cape Town (2005).
- [117] B.M. Sicari, R. Londono, S.F. Badylak, Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering, Tissue Engineering (Second Edition), Elsevier 2015, pp. 149-175.
- [118] D.J. Hulmes, Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures, Journal of structural biology 137(1-2) (2002) 2-10.
- [119] C.G. Knight, L.F. Morton, A.R. Peachey, D.S. Tuckwell, R.W. Farndale, M.J. Barnes, The Collagen-binding A-domains of Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (Triple-helical) collagens, Journal of Biological Chemistry 275(1) (2000) 35-40.
- [120] W. Staatz, K. Fok, M. Zutter, S. Adams, B. Rodriguez, S. Santoro, Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen, Journal of Biological Chemistry 266(12) (1991) 7363-7367.
- [121] R.P. Mecham, Overview of extracellular matrix, Current protocols in cell biology (2012) 10.1. 1-10.1. 16.
- [122] J. Novotna, Biochemistry of Extracellular Matrix. <https://www.slideshare.net/akeeel/extracellular-matrix-40726926>, 26 Ekim 2014 (16 Mayıs 2018.).
- [123] R.M. Gouveia, V. Castelletto, S.G. Alcock, I.W. Hamley, C.J. Connon, Bioactive films produced from self-assembling peptide amphiphiles as versatile substrates for tuning cell adhesion and tissue architecture in serum-free conditions, Journal of Materials Chemistry B 1(44) (2013) 6157-6169.
- [124] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, Biomaterials 24(24) (2003) 4385-4415.
- [125] H.W. Jun, V. Yuwono, S.E. Paramonov, J.D. Hartgerink, Enzyme-Mediated Degradation of Peptide-Amphiphile Nanofiber Networks, Advanced Materials 17(21) (2005) 2612-2617.
- [126] H.-W. Jun, S.E. Paramonov, J.D. Hartgerink, Biomimetic self-assembled nanofibers, Soft Matter 2(3) (2006) 177-181.

- [127] C.J. Malemud, Matrix metalloproteinases and synovial joint pathology, *Progress in molecular biology and translational science*, Elsevier 2017, pp. 305-325.
- [128] L.M. Matrisian, The matrix-degrading metalloproteinases, *Bioessays* 14(7) (1992) 455-463.
- [129] K. Manase, T. Endo, M. Chida, K. Nagasawa, H. Honnma, K. Yamazaki, Y. Kitajima, T. Goto, M. Kanaya, T. Hayashi, Coordinated elevation of membrane type 1-matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 expression in rat uterus during postpartum involution, *Reproductive Biology and Endocrinology* 4(1) (2006) 32.
- [130] S. Duarte, J. Baber, T. Fujii, A.J. Coito, Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis, *Matrix Biology* 44 (2015) 147-156.
- [131] X. Salcedo, J. Medina, P. Sanz-Cameno, L. García-BueY, S. Martín-Vilchez, R. Moreno-Otero, Review article: angiogenesis soluble factors as liver disease markers, *Alimentary pharmacology & therapeutics* 22(1) (2005) 23-30.
- [132] U. Blache, J. Guerrero, S. Güven, A.S. Klar, A. Scherberich, Microvascular Networks and Models, In vitro Formation, in: W. Holnthoner, A. Banfi, J. Kirkpatrick, H. Redl (Eds.), *Vascularization for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Springer International Publishing, Cham, 2017, pp. 1-40.
- [133] P. Carmeliet, R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis, *Nature* 473(7347) (2011) 298.
- [134] M. Laschke, M. Menger, Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation, *European Surgical Research* 48(2) (2012) 85-92.
- [135] P. Carmeliet, Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nature medicine* 6(4) (2000) 389.
- [136] E.M. Conway, D. Collen, P. Carmeliet, Molecular mechanisms of blood vessel growth, *Cardiovascular research* 49(3) (2001) 507-521.
- [137] P. Ten Dijke, H.M. Arthur, Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease, *Nature reviews Molecular cell biology* 8(11) (2007) 857.
- [138] J. Folkman, Angiogenesis, *Biology of endothelial cells*, Springer 1984, pp. 412-428.
- [139] G. Bergers, S. Song, The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance, *Neuro-oncology* 7(4) (2005) 452-464.
- [140] D. López-Terrada, S.W. Cheung, M.J. Finegold, B.B. Knowles, Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line, *Human pathology* 40(10) (2009) 1512-1515.
- [141] M. Gök, İnsan Serum Bütirilkolinesterazının Karaciğer Hepg2 Hücrelerinde Lipid Metabolizması ile Etkileşiminin İncelenmesi, (2015).
- [142] Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065™). <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#characteristics>, (18.10.2015).
- [143] M. Norouzzadeh, Y. Kalikias, Z. Mohamadpur, L. Sharifi, M. Mahmoudi, Determining population doubling time and the appropriate number of HepG2 cells for culturing in 6-well plate, (2016).
- [144] S. Sagmeister, M. Eisenbauer, C. Pirker, T. Mohr, K. Holzmann, H. Zwickl, C. Bichler, D. Kandioler, F. Wrba, W. Mikulits, New cellular tools reveal complex epithelial–mesenchymal interactions in hepatocarcinogenesis, *British journal of cancer* 99(1) (2008) 151.

- [145] C. Kutlu, Beyin Tümörlerinin Tedavisi için Çift Etkili Doku İskelesi-Nanopartikül sistemlerinin Geliştirilmesi, Biyomühendislik, Hacettepe Üniversitesi, Hacettepe Üniversitesi Koleksiyonu, 2011.
- [146] D. Yip, C.H. Cho, A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing, *Biochemical and biophysical research communications* 433(3) (2013) 327-332.
- [147] J.M. Kelm, C.D. Sanchez-Bustamante, E. Ehler, S.P. Hoerstrup, V. Djonov, L. Ittner, M. Fussenegger, VEGF profiling and angiogenesis in human microtissues, *Journal of biotechnology* 118(2) (2005) 213-229.
- [148] N. Ucciferri, T. Sbrana, A. Ahluwalia, Allometric scaling and cell ratios in multi-organ in vitro models of human metabolism, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2 (2014) 74.
- [149] M.A. Guzzardi, F. Vozzi, A.D. Ahluwalia, Study of the crosstalk between hepatocytes and endothelial cells using a novel multicompartmental bioreactor: a comparison between connected cultures and cocultures, *Tissue engineering Part A* 15(11) (2009) 3635-3644.
- [150] G.G.Y. Chiew, A. Fu, K.P. Low, K.Q. Luo, Physical supports from liver cancer cells are essential for differentiation and remodeling of endothelial cells in a HepG2-HUVEC co-culture model, *Scientific reports* 5 (2015) 10801.
- [151] J. Rouwkema, B.F. Koopman, C.A.V. Blitterswijk, W.J. Dhert, J. Malda, Supply of nutrients to cells in engineered tissues, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 26(1) (2009) 163-178.
- [152] J. Lee, M.J. Cuddihy, G.M. Cater, N.A. Kotov, Engineering liver tissue spheroids with inverted colloidal crystal scaffolds, *Biomaterials* 30(27) (2009) 4687-4694.
- [153] S. Sundar, Engineering collagen mimetic peptide amphiphile hydrogels by tuning mechanical properties for biomedical applications, National University of Singapore, Singapore, 2015, p. 159.
- [154] C. Englert, T. Blunk, R. Müller, S.S. von Glasser, J. Baumer, J. Fierlbeck, I.M. Heid, M. Nerlich, J. Hammer, Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking, *Arthritis research & therapy* 9(3) (2007) R47.
- [155] X. Lang, M. Spousta, Y.J. Hwang, J.G. Lyubovitsky, Noninvasive imaging of embryonic stem cell cultures by multiphoton microscopy reveals the significance of collagen hydrogel preparation parameters, *Analytical Methods* 8(2) (2016) 280-294.
- [156] H. Rich, M. Odlyha, U. Cheema, V. Mudera, L. Bozec, Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical properties of collagen constructs and fibrils, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 25(1) (2014) 11-21.
- [157] R.J. Krawetz, J.T. Taiani, Y.E. Wu, S. Liu, G. Meng, J.R. Matyas, D.E. Rancourt, Collagen I scaffolds cross-linked with beta-glycerol phosphate induce osteogenic differentiation of embryonic stem cells in vitro and regulate their tumorigenic potential in vivo, *Tissue Engineering Part A* 18(9-10) (2012) 1014-1024.
- [158] M. Ahearne, A. Coyle, Application of UVA-riboflavin crosslinking to enhance the mechanical properties of extracellular matrix derived hydrogels, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 54 (2016) 259-267.

- [159] X. Zhang, X. Chen, T. Yang, N. Zhang, L. Dong, S. Ma, X. Liu, M. Zhou, B. Li, The effects of different cross-linking conditions of genipin on type I collagen scaffolds: an in vitro evaluation, *Cell and tissue banking* 15(4) (2014) 531-541.
- [160] S. Çakmak, A.S. Çakmak, D.L. Kaplan, M. Gümüşderelioğlu, A Silk Fibroin and Peptide Amphiphile-Based Co-Culture Model for Osteochondral Tissue Engineering, *Macromolecular bioscience* 16(8) (2016) 1212-1226.
- [161] E. Beniash, J.D. Hartgerink, H. Storrie, J.C. Stendahl, S.I. Stupp, Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment, *Acta biomaterialia* 1(4) (2005) 387-397.
- [162] J.C. Stendahl, M.S. Rao, M.O. Guler, S.I. Stupp, Intermolecular forces in the self-assembly of peptide amphiphile nanofibers, *Advanced Functional Materials* 16(4) (2006) 499-508.
- [163] J.M. Anderson, M. Kushwaha, A. Tambralli, S.L. Bellis, R.P. Camata, H.-W. Jun, Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells directed by extracellular matrix-mimicking ligands in a biomimetic self-assembled peptide amphiphile nanomatrix, *Biomacromolecules* 10(10) (2009) 2935-2944.
- [164] N.J. Greenfield, Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 18(4) (1999) 236-244.
- [165] T.T. Demirtaş, G. Irmak, M. Gümüşderelioğlu, A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering, *Biofabrication* 9(3) (2017) 035003.
- [166] C. Yan, D.J. Pochan, Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications, *Chemical Society Reviews* 39(9) (2010) 3528-3540.
- [167] R.V. Contri, R.M. Soares, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules, *Materials Science and Engineering: C* 42 (2014) 234-242.
- [168] O. Huttala, H. Vuorenää, T. Toimela, J. Uotila, H. Kuokkanen, T. Ylikomi, J.-R. Sarkanen, T. Heinonen, Human vascular model with defined stimulation medium-a characterization study, (2015).
- [169] H.F. Chan, Y. Zhang, K.W. Leong, Efficient One-Step Production of Microencapsulated Hepatocyte Spheroids with Enhanced Functions, *Small* 12(20) (2016) 2720-2730.
- [170] Y.B.A. Kang, T.R. Sodunke, J. Lamontagne, J. Cirillo, C. Rajiv, M.J. Bouchard, M. Noh, Liver sinusoid on a chip: Long-term layered co-culture of primary rat hepatocytes and endothelial cells in microfluidic platforms, *Biotechnology and bioengineering* 112(12) (2015) 2571-2582.

EK 1

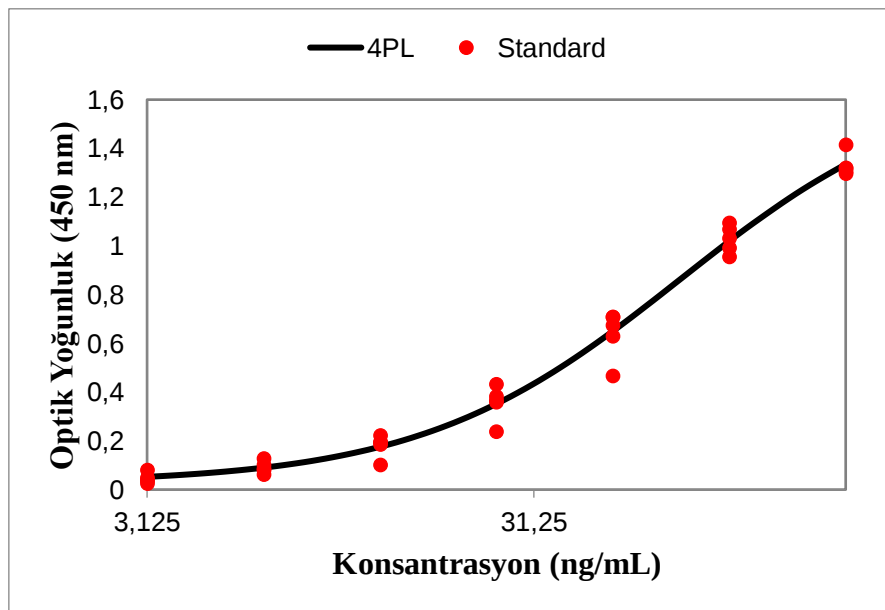
ALBUMİN *IN VITRO* SALIMINDA KULLANILAN KALİBRASYON GRAFİĞİ

Besin ortamına salınan albumin miktarı özgül antijen-antikor arasındaki reaksiyon bağı olarak belirlenmiştir. Salınan albumin miktarının hesaplanması için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve matematiksel işlemler aşağıda verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için standart çözeltiler hazırlanırken 200 ng/mL albumin konsantrasyonuna sahip stok çözelti kullanılmıştır. Standart çözeltiler; stok çözeltin 1X Diluent N çözeltisi kullanılarak 1:2 oranında seri dilüsyonu ile hazırlanmıştır (Çizelge E 1-1). Albuminin optik yoğunluğu kalorimetrik spektrofotometre (ASYS, Hitech UVM 340 plate reader, Avusturya) ile 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Çizelge E1-1. Kalibrasyon eğrisi için hazırlanan standart çözeltiler

Standart	Stok	1X Diluent N (µL)	Son Konsantrasyon (ng/mL)
S1		200	200
S2	100 (200 ng/mL S1)	100	100
S3	100 (100 ng/mL S2)	100	50
S4	100 (50 ng/mL S3)	100	25
S5	100 (25 ng/mL S4)	100	12.5
S6	100 (12.5 ng/mL S5)	100	6.25
S7	100 (6.25 ng/mL S6)	100	3.125
S8	-	200	0

Grafğin çizdirilmesinde kit içeriğine uygun olarak dört parametrelı lojistik eğri kullanılarak regresyon analizi yapılmış ve Şekil E1-1 elde edilmiştir.



Şekil E1-1. Albumin kalibrasyon grafiğı.

EK 2

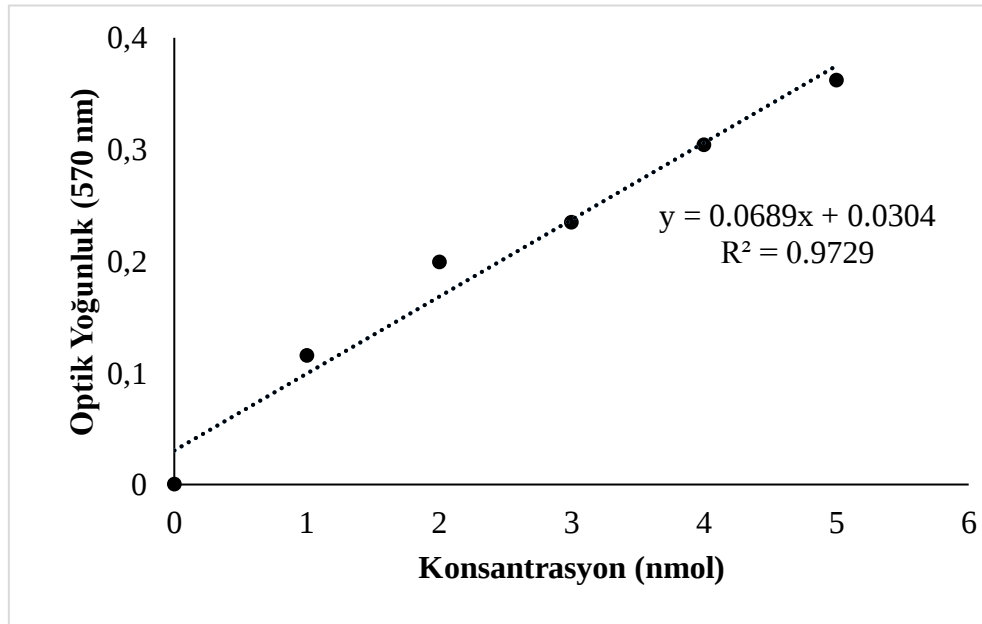
ÜRENİN *IN VITRO* SALIMINDA KULLANILAN KALİBRASYON GRAFİĞİ

Besin ortamına salınan üre miktarı bağlı olarak belirlenmiştir. Salınan üre miktarının hesaplanması için kullanılan kalibrasyon eğrisi ve matematiksel işlemler aşağıda verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi için standart çözeltiler hazırlanırken 0,5 mM üre stok çözeltisi kullanılmıştır. Standart çözeltiler; stok çözeltin analiz tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır (Çizelge E 1-1). Üre optik yoğunluğu kalorimetrik spektrofotometre (ASYS, Hitech UVM 340 plate reader, Avusturya) ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Çizelge E1-1. Kalibrasyon eğrisi için hazırlanan standart çözeltiler

Standart	Stok Çözeltinin Hacmi	Tampon Çözeltisi (µL)	Son Konsantrasyon (nmol/well)
S1	0	150	0
S2	6	144	1
S3	12	138	2
S4	18	132	3
S5	24	126	4
S6	30	120	5

Mikroplaka okuyucu kullanılarak, 570 nm dalga boyunda standart çözeltilerin optik yoğunluk değerleri ölçülmüştür ve Şekil E2-1 verilen kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil E1-1. Üre kalibrasyon grafiği.

Analiz sonucunda elde edilen optik yoğunluk değerlerinden üre miktarını hesaplamak için;

1. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem, optik yoğunluk (OY) ve 96 gözlü kaptaki çözeltinin üre konsantrasyonu ($C_{96-Üre}$) arasındaki matematiksel bağıntıyı vermektedir (Eşitlik E3-1). Standart eğriden elde edilen bu denklem kullanarak her bir örneğe ait üre miktarı hesaplanır.

$$C_{96-Üre} \text{ (nmol)} = (OY - 0,0304) / 0,0689$$

2. 96-gözlü kaba, besin ortamından 25 μL ve analiz tampon çözeltisinden 25 μL alınmıştır (2 kat seyreltilmiştir).

3. Analizi yapılan örneğin üre konsantrasyonu ($C_{Üre}$) şu şekilde hesaplanabilir:

$$C_{Üre} \text{ (nmol/}\mu\text{L)} = (N_{96-Üre} \text{ (nmol)} / 25 \mu\text{L}) \times 2 \text{ (E1-2)}$$

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Şeyma BEKTAŞ
Doğum Yeri : Isparta
Medeni Hali : Bekar
E-Posta : seyma339@gmail.com
Adres : Binbirevler Mah. 4751 Sok. No:4
Merkez/ISPARTA

Eğitim

Lise : Isparta Anadolu Lisesi (2008)
Lisans : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Biyomühendislik Bölümü (2014)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyomühendislik Ana Bilim Dalı (2018)
Yüksek Lisans (Erasmus : Rheinisch Westfälische Technische Hochschule Aachen
Öğrenci Değişim Programı) (RWTH Aachen) Üniversitesi – Fraunhofer Lazer
Teknoloji Enstitüsü, Temmuz-Ekim 2017

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce – Orta Seviye

Deneyim Alanları

- Doku mühendisliğinde çip-üstü-organ uygulamaları
- Doku mühendisliğinde biyoreaktör uygulamaları,
- 3 boyutlu biyoprinting yöntemi ile doku ve organ üretimi
- Doku mühendisliğinde polimerik biyomalzemelerden doku iskelesi üretimi
- İleri hücre kültürü teknikleri

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

İlaçların Toksisitesini Belirlemede Kullanılacak Karaciğer Çipinin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi BAP Kapsamlı Destek Projesi, Proje No: FBA-2017-12820, 2017 – 2018, Bütçe: 121495,64 TL

Diğer Projeler

- Fabrikasyon ve Stabilizasyon İşlemlerinin Kitosan Doku İskelelerinin Morfolojik, Mekanik ve Biyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi BAP Hızlı Destek Projesi, Proje No FHD-2018-16900 2018- devam ediyor
- Development of Novel Gelatin-Hyaluronic Acid Thiol-Ene Hydrogel For Cell Encapsulation, Fraunhofer Lazer Teknoloji Enstitüsü, 2017
- Kemik Yamaları İçin Doku İskelesi Destekli Perfüzyon Biyoreaktör Geliştirilmesi: İşletim Parametrelerinin Belirlenmesi ve CFD Modelleme Çalışmaları, TÜBİTAK, Proje No: 214M100, Araştırmacı, 2014 – 2017.
- Poli(bütlenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) Mikro ve Nanopartiküllerden Kurkumin Salımı, Hacettepe Üniversitesi BAP Hızlı Destek Projesi, Proje No FHD-2016-11953, 2016-2017.
- Kemik Doku Mühendisliği için Perfüzyon Biyoreaktörlerinin Geliştirilmesi ve Kurulumu, Hacettepe Üniversitesi BAP Destek Projesi, Proje no: 014 D02 602 001-509, Araştırmacı, 2014- 2015.
- 3 Boyutlu Biyobaskı (3D Bioprinting) Metodu için Çeşitli Hidrojellerin Tasarlanması ve Hücre Canlılığının İncelenmesi, TUBİTAK 2209 Programı, 2012-2013.

Diğer Yayınlar

- Gerçek Beşkardeş, I., Aydın, G., **Bektaş, Ş.**, Cengiz, A., Gümüşderelioğlu, M., A “Systematic Study for Optimal Cell Seeding and Culture Conditions in a Perfusion Mode Bone-Tissue Bioreactor”, Biochemical Engineering Journal, 2018

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- **Ş. Bektaş**, M. Gümüşderelioğlu, “Karaciğer çipleri için hepatik organoidlerin üretimi” 20. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı (BIYOMUT) 3-5 Kasım 2016, İzmir (Sözlü Sunum)

Diğer Sunumlar

- **Ş. Bektaş**, İ. S. Deliloğlu Gürhan, A. Şendemir Ürkmez, "Design of various hydrogels for 3D bioprinting method and investigation of cell viability" xix. International Biomedical Science and Technologies Symposium (BIOMED) 12-15 November 2013, Aydın (Poster Sunumu)
- Avşar, G., **Bektaş, Ş.**, "Bakteriyel Selüloz/Kitosan Kompozitini Temel Alan Yara ve Yanık Örtüsü ve Deri Grefti Üretimi" TÜBİTAK Üniversite Proje Yarışmaları - Üniversite Girişimcilik ve Yenilikçilik Yarışması, 23-24 Haziran 2014, Ankara (Sözlü Sunum)
- E. Tamahkar, **Ş. Bektaş**, M. Gümüşderelioğlu "Poli(bütlenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) Mikro ve Nanopartiküllerin İlaç Salım Sistemleri için Değerlendirilmesi" 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi 23-26 Ağustos 2016, İzmir (Sözlü Sunum)
- I. G. Beşkardeş, G. Aydın, **Ş. Bektaş**, M. Gümüşderelioğlu "Doku İskelesi Destekli Perfüzyon Biyoreaktörde İşletim Parametrelerinin Belirlenmesi" 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi 23-26 Ağustos 2016, İzmir (Sözlü Sunum)
- **Bektaş, Ş.**, Gültan, T., Çetin Altındal, D., Gümüşderelioğlu, M., "Effects of Different Neutralization Methods on Physicochemical Properties and Cytocompatibility of Chitosan" 22nd International Biomedical Science and Technologies Symposium (BIOMED) 12-14 May 2017, Ankara (Poster)
- Gerçek Beşkardeş, I., Aydın, G., **Bektaş, Ş.**, Gümüşderelioğlu, M., "Perfusion Mode Bone-Tissue Bioreactors: Investigation of Cell Seeding, Proliferation and Differentiation" 22nd International Biomedical Science and Technologies Symposium (BIOMED) 12-14 May 2017, Ankara (Poster)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 28/06/2018

Tez Başlığı / Konusu: **Sferoid Yüklü ECM-Mimetik Peptit Amfifil Hidrojellerle Çip-üstü-Karaciğer Geliştirilmesi**
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 116 sayfalık kısmına ilişkin, 27/06/2018 tarihinde ~~çalışmam~~/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %7 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dahil~~
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Şeyma BEKTAŞ
Öğrenci No: N14122653
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı: Tezli Yüksek Lisans
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU