



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BEYİN HÜCRELERİNİN ADEZYONUNDA  
KULLANIM POTANSİYELİ OLAN YENİ  
FONKSİYONEL YÜZEYLERİN HAZIRLANMASI**

**Fatma ÖZTÜRK KIRBAY**

**Tez Danışmanı : Doç.Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 10.08.2017**

**Bornova-İZMİR**

**2017**



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**BEYİN HÜCRELERİNİN ADEZYONUNDA  
KULLANIM POTANSİYELİ OLAN YENİ  
FONKSİYONEL YÜZEYLERİN HAZIRLANMASI**

**Fatma ÖZTÜRK KIRBAY**

**Tez Danışmanı: Doç.Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 10.08.2017**

**Bornova-İZMİR**

**2017**



**Fatma ÖZTÜRK KIRBAY** tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Beyin Hücrelerinin Adezyonunda Kullanım Potansiyeli Olan Yeni Fonksiyonel Yüzeylerin Hazırlanması**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10.08.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı**

: Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

**Raportör Üye**

: Prof. Dr. Suna TİMUR

**Üye**

: Prof. Dr. Nalan TÜZMEN

**İmza**





## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Beyin Hücrelerinin Adezyonunda Kullanım Potansiyeli Olan Yeni Fonksiyonel Yüzeylerin Hazırlanması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10 / 08 / 2017

İmzası

Fatma ÖZTÜRK KIRBAY



**ÖZET****BEYİN HÜCRELERİNİN ADEZYONUNDA KULLANIM  
POTANSİYELİ OLAN YENİ FONKSİYONEL YÜZEYLERİN  
HAZIRLANMASI**

KIRBAY ÖZTÜRK, Fatma

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

Ağustos 2017, 38 sayfa

Bu çalışma, farklı gruplara sahip 2 monomerin ve beyin hücrelerinin seçimli adezyonuna olanak sağlayan bir peptidin kullanımını temel almaktadır. Monomerlerden bir tanesi floresan özellik taşıyan rodamin (RD) diğeri ise fonksiyonel grup olarak serbest amino grubuna sahiptir (RF). Bu iki monomer indiyum kalay oksit ile modifiye edilmiş cam (ITO) yüzeyler üzerine elektrokimyasal polimerizasyonla biriktirilmiştir. Yüzeyler kopolimer ile kaplandıktan sonra ArginilGlisilAspartik asit (RGD) isimli tripeptid 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) kullanılarak karboksil gruplarından amino grubu içeren yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır. Oluşturulan seçimli yüzey, integrin avb3 reseptör pozitif hücre hattı olan Glioblastoma (U87-MG) için adezyon platformu olarak kullanılmıştır. İnsan keratinosit (HaCaT) hücreleri ise kontrol grubu olarak seçilmiştir. Yüzeyin kopolimer ve RGD ile modifikasyonunun izlenmesi için elektrokimyasal ve mikroskopik teknikler kullanılmıştır. Sonuç olarak, tasarlanan P(RF-co-RD)/RGD platformu U87-MG hücrelerinin  $10^3$  ile  $10^4$  hücre/mL aralığında elektrokimyasal dedeksiyonuna olanak sağlamıştır. Ayrıca ek bir boyama işlemine gerek kalmadan hücrelerin floresan görüntülenmesi gerçekleştirilebilmiştir. Bu bağlamda hem elektrokimyasal hem de floresan görüntülemeye olanak sağlayan seçimli bir yüzey başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** iletken polimer, seçimli hücre adezyonu, biyofonksiyonel yüzey, hücre dedeksiyonu



**ABSTRACT****PREPARATION OF NOVEL FUNCTIONAL SURFACES WHICH  
HAVE POTENTIAL FOR THE ADHESION OF BRAIN CELLS**

KIRBAY OZTURK, Fatma

M.Sc in Biochemistry Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dilek ODACI DEMIRKOL

August 2017, 38 Page

This thesis involves two monomer which has different groups and a peptide which provides selective adhesion of brain cells. One of the monomers has a fluorescent amino acid (RD) and the other has a free amino group (RF) as a functional group. These two monomers were deposited by electrochemical polymerization on indium tin oxide modified glass (ITO) surfaces. After the surfaces were coated with the copolymer, arginylglycineaspartic acid (RGD) was covalently bound to the amino group-containing surface from the carboxyl groups via 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). The prepared selective surface was used as an adhesion platform for an integrin  $\alpha v \beta 3$  receptor positive cell line, Glioblastoma (U87-MG). Human keratinocytes (HaCaT) cells were selected as the control group. Electrochemical and microscopic techniques were used to analyzed the modification of the surface with the copolymer and RGD. As a result, the designed P (RF-*co*-RD) / RGD platform allows for electrochemical detection of 10 to  $10^4$  cells / mL of U87-MG cells. Also, fluorescence imaging of cells could be performed without the need for an additional staining procedure. In this context, a selective surface that allows both electrochemical and fluorescence imaging were successfully accomplished.

**Keywords:** Conducting polymer, selective cell adhesion, biofunctional surface, cell dedection



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim kapsamında sürdürdüğüm tüm çalışmalarda desteğini esirgemeyen, tezimin oluşmasında ve yayınlanma aşamasında bilgileri ile yol gösteren değerli hocam sayın Doç.Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL'a, tecrübelerini esirgmeden her zaman bizim çalışmamızı destekleyen sayın Prof.Dr. Suna TİMUR'a, tez kapsamında kullanılan malzemelerin sentezlenmesinde ve sorunların çözümlenmesinde yardımcı olan sayın Prof.Dr. Metin AK' a ve Dr. Rukiye AYRANCI'ya, bu aşamaya gelmemde bana bilgilerini ve tecrübelerini aktaran Sayın HOCALARIMA, laboratuvardaki çalışma ARKADAŞLARIMA teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Ayrıca hayattaki en büyük şansım, yol arkadaşım, her daim desteğini esirgemeyen biricik eşim GÜRCAN KIRBAY'a, her daim yanımda olan canım ANNEME ve ABİME en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, **Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) (15 Fen 057)** tarafından desteklenmiştir. Kısmi finansal desteğinden dolayı Türkiye Bilimler Akademisi Üstün Başarılı Genç Bilim İnsanları Destekleme Programı'na (TÜBA-GEBİP 2015) teşekkür ederiz.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ (devam).....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xix
1. GİRİŞ.....	1
<u>1.1. İletken Polimerler .....</u>	<u>1</u>
<u>1.2. Hücre Adezyonu.....</u>	<u>3</u>
2. MATERYAL VE METOT .....	9
<u>2.1. Materyal.....</u>	<u>9</u>
<u>2.1.1. Kullanılan Cihazlar.....</u>	<u>9</u>
<u>2.2. Monomer Sentezi .....</u>	<u>9</u>
<u>2.4. Elektrokimyasal Hücre Sensörü ve Floresans Görüntüleme Platformu Oluşturulması .....</u>	<u>10</u>
<u>2.5. Elektrokimyasal Karakterizasyon.....</u>	<u>11</u>
<u>2.6. X-ışını fotoelektron spektroskopisi .....</u>	<u>12</u>
<u>2.7. Hücre Kültürü Uygulamaları .....</u>	<u>12</u>
<u>2.7.1. Hücre Görüntülemesi.....</u>	<u>12</u>
<u>2.8. İstatistiksel Analiz .....</u>	<u>13</u>
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	14
<u>3.1. Yüzey Karakterizasyonu .....</u>	<u>14</u>

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
<u>3.2 P(RF-co-RD) Kopolimer Yüzeyi Kullanarak Hazırlanan Biyofonksiyonel Yüzeyler Üzerinde Memeli Hücrelerinin Adezyonun İncelenmesi .....</u>	<u>19</u>
3.2.1 Karakterizasyon.....	19
3.2.2 Hücre adezyonu, Proliferasyonu ve Sensörü.....	22
4. SONUÇLAR .....	27
ÖZGEÇMİŞ .....	34



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Aktive edilmiş integrinin ve fokal adezyon yerinde ECM-integrin-sitoskeleton bağlarının oluşumunun şematik gösterimi (Honarmandi et al., 2011).....	4
1. 2. Aptamerin hedefe bağlanmasının şematik gösterimi.....	7
2.1. RD ve RF monomerlerinin elektrokimyasal kopolimerizasyonunun şematik gösterimi.....	10
2.2. Biyoalgılayıcı yeni platformun oluşturulmasının illüstrasyon gösterimi ....	11
3.1. Farklı döngü sayısına sahip yüzeylerin floresans mikroskopi görüntüleri. (Büyütme oranı 200 µm).....	14
3.2. Elektropolimerizasyonun CV diagramları a) P(RF) b) P(RD) c) P(RF-co-RD) (0,1 mg/mL RD, 0,4 mg/mL RF) 0,1 M TBAPF <sub>6</sub> / DCM çözügen sisteminde tarama hızı 100 mV s <sup>-1</sup> ve 10 döngü yapılmıştır.....	15
3.3. P(RF), P(RD) ve P(RF-co-RD) ait spektroeletrokimyasal spektrumları ....	16
3.4. Yüzeylerin XPS N 1s spektrumları A) P(RF-co-RD) ve B) P(RF-co-RD)/RGD.....	17
3.5. A) P(RF-co-RD) ve P(RF-co-RD)/RGD polimer kaplı ITO cam yüzeylerin PBS (pH 7,4) içerisinde absorpsiyon ve emisyon pikleri B) P(RF-co-RD) ve P(RF-co-RD)/RGD yüzeylerine ait floresan mikroskopi görüntüleri (büyütme oranı: 200 µm).....	18
3.6. Modifiye edilen yüzeyin EIS diagramı ( [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> ve 0,1 M KCl içeren PBS pH 7,4 içinde).....	19
3.7. ITO, P(RF-co-RD), P(RF-co-RD)/RGD ve P(RF-co-RD)/RGD/U87-MG ait A)CV ve B)DPV diyagramları ( [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> ve 0,1 M KCl içeren PBS pH 7,4 içinde).....	21
3.8. A) P(RF-co-RD) B) P(RF-co-RD)/ RGD ve C) P(RF-co-RD)/ RGD/U87-MG yüzeylerine ait SEM fotoğrafları .....	22

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**ŞekilSayfa

- 3.9. U87-MG ve HaCaT hücre hatlarının RGD-modifiye yüzeylerine PS, ITO, ve kopolimer yüzeyler üzerindeki proliferasyonunu karşılaştırmalı olarak göstermektedir. .... 23
- 3.10. U87-MG ve HaCaT hücrelerinin farklı yüzeyler üzerindeki 72 saatlik proliferasyona ilişkin floresan mikroskop görüntüleri ..... 24
- 3.11 DPV yöntemiyle  $10 \cdot 10^5$  hücre ile 24 saat inkübe edilen yüzeylerin P(RF-co-RD)/RGD/U87-MG ve P(RF-co-RD)/RGD /HaCaT ait kalibrasyon grafikleri ..... 25

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Pasif in vitro hücre adezyon girişimi ve aşamaları (Hong et al., 2006).....	5
1.2. Doğal ve fonksiyonel biyomateryallerle değişen reseptör-ligant ilişki metodları (Rahmany and Van Dyke, 2013).....	6
3.1. Literatürdeki benzer çalışmalar .....	26





**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DPV	Diferansiyal Puls Voltammetri
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
FA	Fokal adezyon
FBS	Fetal sığır serum
HaCaT	İnsan keratinosit hücre hattı
U87-MG	Glioblastoma hücre hattı
ITO	İndinyum kalay oksit
PBS	Fosfat tamponu tuzu
P(RF-co-RD)	Rodamin - 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin kopolimeri
PS	Polistiren kaplı yüzey
RDG	Arginilglisilaspartik asit tripeptidi
RD	Rodamin B
RF	4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin
XPS	X-ışını fotoelektron spektroskopisi



## 1.GİRİŞ

Enzimler, peptidler, proteinler, genler, canlı hücreler ve kök hücreler vb birçok biyolojik materyalin immobilizasyonu için uygun platformlar sağlayan destek yapıların kullanımı son günlerde büyük öneme sahiptir. Bu sayede biyosensör uygulamaları ve doku mühendisliğinde kullanım potansiyeli olan yeni yüzeyler elde edilebilmektedir. *In vitro* hücre çalışmalarında kullanılan sentetik yüzeylerin yüksek oranda yeniden üretilebilirliği ve biyouyumluğu sayesinde hücrelerin fizyolojisini, patolojisini inceleyebilmek için yeni platformlar oluşturulmaktadır (Tait et al., 2015). Oluşturulan bu platformlar hücrelerin adezyonunu, proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlayan uygun çevre oluşturan materyallerdir (Watanabe and Ishihara, 2003). Bu materyallerin özellikleri; 1) biyouyumlu, 2) ideal bir oranda biyolojik bozunma, 3) toksik olmama ve bağışıklık oluşturmama, 4) optik mekanik özelliklere sahip olma, 5) iskele yapısı içerisinde hücrelerin diğer hücrelerle gaz, metabolit, besin ve sinyal moleküllerinin taşımına olanak sağlayan bir yüzeye sahip olmalıdır (Kim et al., 2008). Bu materyallere örnek olarak sentetik polimerlerden; polikaprolakton, polietilenglikol, polivinilalkol, poliüretan ve doğal polimer olan alginat, jelatin, kollojen, kitin vb verilebilir. Bu polimerler enzim, protein, polipeptit ve antikor gibi birçok biyoaktif bileşenle modifiye edilerek biyouyumlu hale getirilmektedir (Goddard and Hotchkiss, 2007). Bu tez kapsamında; modifiye edilen yüzeyler üzerinde beyin hücrelerinin, proliferasyonu ve morfolojik değişimleri incelenmiştir. Oluşturulan yüzeylerde modifikasyonlar biyolojik materyaller kullanılarak hücrel affinitenin artırılması amacıyla yapılmış olup, özgün değerini oluşturmaktadır. Bu modifiye yüzeyler biyomedikal uygulamalarda; ilaç salınımında, yara iyileştirme materyali olarak veya enzim immobilizasyonları (Agarwal et al., 2008) gibi birçok farklı alanda kullanıma olanak sağlayabilecek potansiyele sahiptir.

### 1.1. İletken Polimerler

Elektroaktif malzemeler; elektrik, elektrokimyasal ve elektromekanik uyarımı hücrelere doğrudan iletilmesini sağlayan yeni nesil "akıllı" biyomalzemelerin bir parçasıdır (Balint et al., 2014 ; Ghasemi-Mobarakeh et al., 2011 ; Huang et al., 2008 ; Lakard et al., 2009). Elektroaktif malzeme ailesi iletken polimerleri, piezoelektrik ve fotovolvonik malzemeleri içermektedir (Balint et al., 2014). İletken polimerler elektriksel uyarımı mükemmel bir şekilde kontrol edilmesini sağlar. Aynı zamanda çok iyi elektriksel ve optik özelliklere sahiptirler. Bunun yanı sıra yüksek iletkenlik/ ağırlık oranı biyouyumlu, biyobozunur ve gözenekli yapıda olmasını sağlamaktadır (Kotwal and Schmidt.,

2001 ; Lakard et al., 2009 ; Lee et al., 2009 ; Wallace et al., 1999). Ayrıca, iletken polimerlerin büyük bir avantajı, kimyasal, elektriksel ve fiziksel özelliklerinin, antikorlar, enzimler ve diğer biyolojik moleküllerle spesifik ihtiyaçlarına göre uygun hale getirilebilir (Balint et al., 2014 ; Kim et al., 2007 ; Lakard et al., 2009 ; Wallace et al., 1999 ).

İletken polimerlerin sentezlenmesinde kimyasal ve elektrokimyasal olmak üzere 2 ana yöntem kullanılmaktadır (Lee et al., 2006). Elektrokimyasal polimerizasyon, elektrotların polimer monomerlerinin, yardımcı polimerizasyon ajanlarının bulunduğu çözgen sistemine yerleştirilerek elektrik akımının elektrotlar boyunca uygulanmasıyla gerçekleşir (Choi and Park, 2002 ; Martins et al., 2008). Bu yöntem ile kontrol edilebilen bir kalınlıkta (20 nm'ye kadar) ince bir polimer filmin oluşmasını sağlamaktadır. Elektrokimyasal sentez üç teknik kullanılarak yapılabilir: galvanostatik (sabit akımda), potansiyostatik (sabit potansiyalde) ve potansiyodinamik (döngüsel voltammetri) yöntemlerdir ( Kim et al., 2007 ; Wallace et al., 1999).

Birçok biyomedikal uygulama için biyomalzemeye yönelik iyi bir hücre sel yanıt gereklidir (Huang et al., 2007 ; Zhang et al., 2010). Bu nedenle birçok iletken polimer türünün çok çeşitli hücrelerin büyümesini desteklemesi çok önemlidir. Ayrıca biyouyumlu polimer yeterli değil ise yan gruplarından kolayca biyouyumlu moleküller ile modifiye edilerek, istenilen özellikle biyouyumlu, iletken polimerin geliştirilmesi mümkündür (Williams and Doherty, 1994).

İletken polimerlerin biyomedikal alanda uygulama çalışmaları 1980 yıllarında biyolojik materyallerle uyumlu olmalarının keşfiyle büyük ölçüde genişlemiştir (Guimard et al., 2007). İletken polimerlerin (polipirol (PPy), polianilin (PANİ), politiyofen vb gibi ) hücre ve doku uyumlulukları *in vivo* ve *in vitro* testlerle gösterilmiştir (Giri and Kundu, 1996). İletken polimerler sinir sistemi, sinir problemleri ve kontrollü salınım gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır. İletken polimerlerin elektriksel uyarım ile uyumlu (10<sup>-4</sup> ila 9 S / cm iletkenlik) hücrelerin büyümesi ve migrasyonu gibi hücre sel aktiviteleri desteklediği gözlenmiştir ve bu durum iletken polimerlerin ve türevlerinin doku mühendisliği uygulamalarında kullanımını oldukça yaygınlaştırmıştır (Guo et al., 2013).

## 1.2. Hücre Adezyonu

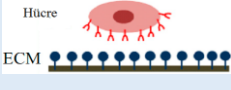
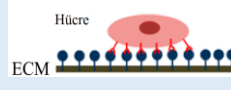
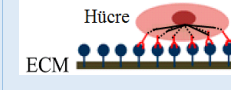


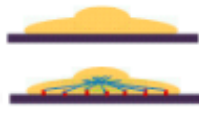
Adezyon, hücre iletişimde ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve dokuların gelişmesinde ve korunmasında temel öneme sahiptir. Hücre adezyonu, tek bir hücrenin başka bir hücreye ve ya hücre dışı bir matrise (ECM) yapışabilmesi özelliğidir. Hücrelerin çok hücreli organizmalardaki davranışlarını nasıl etkilediğini ve koordine ettiklerini anlamak önemlidir. “Hücre adezyon modeli”ne göre bir hücre ne kadar çok yapışarsa yüzeyinde bulunan kimyasal bağların sayısı da o kadar artar (Dembo et al., 1988; Shen et al., 2011).

Hücre adezyonu; hücre farklılaşmasını, hücre döngüsünü, hücre göçünü ve hücrenin yaşamını düzenleyen sinyallerin uyarılmasına katılır (Huang and Ingber, 1999). Biyomateryal tasarımında ve gelişiminde hücrelerin alt tabakaya olan ilgisi çok önemlidir. Hücre adezyonundaki değişiklikler artrit (Szekanecz and Koch, 2000), kanser (Okegawa et al., 2004), osteoporoz (Cho et al., 2006) damar tıkanıklığı (Simon and Green, 2005) gibi çok çeşitli hastalıkların belirleyicisi olabilir.

Hücreler, hücre içi veya hücre dışı kuvvetler aracılığıyla diğer hücrelerle ve matriks yüzeylerine adezyon özelliği gösterirler. Bu adezyon bölgeleri integrin adı verilen transmembranlar aracılığıyla gerçekleşir (Saif et al., 2003). Hem integrinler hem de adezyon molekülleri, fokal adezyon (FA) kompleksi vasıtasıyla, aktin filamentleri olan sitoskeleton elemanlarına bağlanır (Horwitz, 1997) (Şekil 1.2) Sitoskelet yapısı çekirdeği tutar ve hücrenin şeklini muhafaza eder. FA oluşumu hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması (Geiger et al., 2001), göçü (Ladoux and Nicolas, 2012), onarımı (Dumbauld et al., 2013), döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır.



Çizelge 1.1 Pasif in vitro hücre adezyon girişimi ve aşamaları (Hong et al., 2006)

Hücre adezyon fazı	Faz I	Faz II	Faz III
<b>Hücre adezyon şematik diyagramları</b>			
<b>Hücre şeklinin dönüşümlerinin şematik diyagramı</b>	 Başlangıç	 Yassılaştırma	 Tam yayılma ve yapısal düzenlenme
<b>Hücre adezyon kuvveti</b>	Elektrostatik kuvvetler	İntegrin	Fokal adezyon
<b>Adezyon aşamaları</b>	Çökeltme	Hücre tutunması	Hücre yayılması ve adezyonu

Yüzey modifikasyon teknikleri biyomateryaller sayesinde temel hücre fonksiyonlarının bilinen hücre bağlanma motifleri ve integrin aracılı hücre adezyonunun 3 boyutlu yapısına uygun ortamı sağlar. Biyomateryallerle yüzey modifikasyonu protein adsorbsiyonuna, hücre etkileşimlerine ve hücre cevaplarına etki edebilmektedir. Biomimetik yaklaşımlar yapay sistemler olup, karmaşık canlı sistemlerini çözmeyi amaçlamaktadır. Bu yaklaşımla biyolojik motifler çeşitli materyallerle kombine edilerek hücrelerin büyümesi için gerekli olan hücre dışı matriksi (ECM) benzeri yapılar oluşturulurlar (Rahmany and Dyke, 2013).

Biyometrik materyallerin geliştirilmesinde genel olarak 3 strateji kullanılır:

1. Biyoaktif molekül salgılayabilme ve hücre içine alabilme özelliğine sahip olanlar,

2. Biyoadeziv ECM molekülleri ya da spesifik bağlanma motifleriyle yüzey modifikasyonu,

3. Materyallerin nano boyutlu modellerini kullananlardır. Bu yüzeylerin oluşturulmasında kullanılan doğal ve fonksiyonel malzemeler, farklı reseptör-ligant etkileşimlerini ortaya çıkarırlar (Çizelge 1.2).

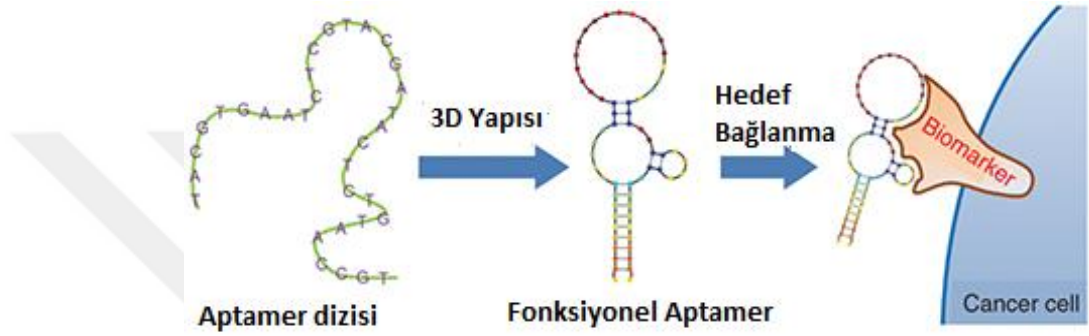
**Çizelge1.2.** Doğal ve fonksiyonel biyomateryallerle değişen reseptör-ligant ilişki metodları (Rahmany and Dyke, 2013)

<b>Doğal ECM Biyomateryalleri</b>		Doğal ECM bileşenleri biyolojik çevreyi sağlar. Fakat mekanik özellikleri, uyumsuzluk, yeniden üretilebilirliği ve bağışıklık sağlama yönünden zayıftır.
<b>Tam ECM adsorbsiyonu</b>		Biyomimetrik materyallerin geliştirilmesinde, tam ECM proteinleri yüzeyin modifikasyonunda kullanılabilir. Fakat proteinlerin katlanması ve bağlanan maddelerin oluşturduğu motifle hücre sinyallerinin algılanması zorlaştırmaktadır.
<b>Sentetik Lineer Bağlanmış motif</b>		Fonksiyonel bağlanma motiflerinin varlığı reseptör aracılı hücre cevabını spesifik aminoasit dizisi sayesinde oluşmasını sağlamaktadır.
<b>Uzaysal Olarak Yönlendirilmiş Bir Bağlanma Motifi</b>		Peptitlerin uygun 3 boyutlu yönlenebilirliği ve rastgele dağılımı yüzeydeki biyomateryallerin biyolojik aktivitesini zenginleştirir.
<b>Nanolitografi İle Nanomodelleme</b>		Nanolitografi bağlanma proteinlerinin uygun pozisyon yönlendirir.
<b>ECM Benzeri Biyomartaller</b>		Keratin hidrojeller ECM benzeri materyallerdir. Bunlar ECM proteinleri gibi hücre adeziv özellik gösterirler.

ECM proteinleriyle kaplı yüzeylerde hücre adezyonu artsa bile proteinlerin kontrol edilemeyen kalınlıkları, hassasiyetin azalması sebebiyle bu proteinlerin çip sistemlerinin dizaynında kullanım potansiyellerini azaltmaktadır. Bundan dolayı hücre adezyonunu arttıran biyomoleküller kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı RGD (R: Arginin G: Glisin D: Aspartik asit) peptididir. RGD sadece

hücre adezyonunu tetikleemekle kalmayıp, bazı hücelere özgü integrin ekspresyonunu sağladığı belirlenmiştir (Hersel et al., 2003).

Yüzey modifikasyonunda kullanılan biyomoleküllerden aptamerler hedeflemede kullanılan yaygın diğer makromoleküllerdir. Aptamerler; kısa RNA ya da tek zincirli DNA dizilerinden oluşan yüksek spesifikliğe ve afiniteye sahip 3 boyutlu molekülledir (Şekil 1.1). Aynı zamanda kimyasal antikordardır. Aptamerlerin kimyasal ve biyolojik özellikleri sahip oldukları oligonükleotid dizisine bağlıdır.



Şekil 1. 2. Aptamerin hedefe bağlanması şematik gösterimi

Küçük moleküller olması sebebiyle doku içine girebilme özelliği vardır bu sayede, *in vitro* teşhis, *in vivo* görüntüleme sistemlerinde, hedeflenmiş tedavilerde kullanılmaktadırlar (Sun et al., 2014).Yapılan çalışmalara örnek olarak; polidimetilsilioksan (PDMS) biyomedikal araçlarda ve araştırmalarda yaygın olarak kullanılan polimerdir. PDMS kolay modifiye edilebilir, kimyasal olarak stabil, fiziksel özellikleri bakımından hücre çalışmaları için uygun ortam sağlar. Bir çalışmadaa PDMS substratlarının 3 boyutlu yapısı anti-EGFR aptamerleriyle fonksiyonel hale getirilip hücre izolasyonunda kullanılmıştır. PDMS yüzeyleri incelendiğinde; aptamerlerin bağlanması için geniş bir yüzey oluşturmaktadır. Bu da kanser hücrelerinin yüzeye afinitesini artırarak tutunmasını sağlayan yüzeyler oluşturmuştur. Oluşturulan yeni yüzeyle birlikte kanser hücrelerin yüzeyden izolasyonu sağlamıştır. Bu çalışmayla oluşturulan yeni yüzeyler tümör hücrelerinin belirlenmesinde olanak sağlama potansiyeline sahiptir (Wan et al., 2012).

Nanoboyutlu süpermanyetik demir oksit nanopartikülleri yüzey kimyası çalışmaları vb birçok biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Bunlar; manyetik rezonans görüntüleme (MR), doku hasarların tespiti, ilaç salımı gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada; süper manyetik demir

oksit nanopartiküllerinin polimer yüzeyinin kaplanmasıyla manyetik görüntüleme ajanı geliştirilmiştir. Polietilenglikol (PEG) ile demir oksit nanopartikülleri modifiye edilmiştir. Oluşturulan yüzey üzerinde insan fibroblast hücrelerinin davranışları incelenmiştir. Sonuca bakıldığında manyetik partikülle PEG'in kaplanması spesifikliği ve yararlanımı arttırmıştır. Bu çalışmayla bazı ilaçların salımı ve gen terapi yaklaşımına yeni bir platform oluşturulmuştur (Gupta and Curtis, 2005).

Polimerler farklı yan grupları nedeniyle yüzey modifikasyonlarında kullanılmaktadır. İletken polimerler fiziksel, kimyasal, elektriksel özellikleri sebebiyle doku mühendisliği için gelecek vaat etmektedir. Polimerlerin elektrokimyasal birikimleri sayesinde, kalınlıkları kimyasal ve fiziksel özellikleri kontrol edilebilir olmasıyla avantaj sağlamaktadır.

İletken polimer olan 3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (SNS-mNH<sub>2</sub>ITO) camların yüzeyine elektrokimyasal olarak biriktirilmiştir. Oluşturulan yüzey RGD ile modifiye edilerek, insan keronosit hücreleri (HaCaT), maymun böbrek hücresi (Vero), insan nöroblastoma hücrelerinin (SH-SY5Y) modifiye yüzey üzerinde kültivasyonu yapılmıştır. Yeni oluşturulan yüzeyler hücrelerin izlenmesi, ilaçların ve kimyasal maddelerin etkisinin hücreler üzerindeki dinamiğinin optik olarak incelenmesi ve/ veya elektrokimyasal olarak analizlerinin yapılabilmesi için yeni *lab-on-chip* sistemleri oluşturulmuştur (Oyman et al., 2014).

Yeni nano kompozit materyaller ve polimerler adhezif özellikleri sayesinde ilgili hücrelerin tanınmasında yol gösterici olmaktadır. Bu konu kapsamında; poli(metil metaklarat) b- polikaprolaktone blok kopolimer (PMMA-*b*-PCL-NAC) hücre kültürü matrisi olarak kullanılmaktadır. RGD ile modifiye edilmiş PMMA-*b*-PCL-NAC (PMMA-*b*-PCL-NAC-RGD) yüzey kullanılarak hücre kültürü çalışmalarında av $\beta$ 3 reseptör pozitif glioblastoma hücresi (U87-MG) ve negatif kontrol olan insan keratinosit hücrelerinin (HaCat) proliferasyonu incelenmiştir. Gelecek vaat eden bu materyalle seçimli hücre adezyonuna ve proliferasyonuna olanak sağlanmıştır. Bunun yansıra integrin av $\beta$ 3 ün hücrede yüksek miktarda bulunduğu optik olarak belirlenmesine olanak sağlamıştır. Böylece fonksiyonel yüzeylerin cell-on-a-chip sistemleriyle entegre edilip canlı hücrelerin, ilaçların ve kimyasalların etkisini izlemede kimyasal dedeksiyonu sağlamaktadır (Oyman Eyrilmez et al., 2015).

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), RGD peptid, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid), triton X-100, formaldehit (%37), 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), CytoPhalloidin 488, rodamin B, fosforil klorür, 9H-Karbozol-9-Etanol, trietilenamin, asitonitril (ACN), magnezyum sülfat (anhidrit) Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. Tiyofen, tolüen, süksinil klorid, hidroklorit asit, sodyumbikarbonat, etanol ve propiyonik asit Aldrich firmasından satın alınmıştır. Penisilin/streptomisin (P/S) (10000/10000 unit) ve 200 mM L-glutamin Lonza firmasından satın alınmıştır. Fetal sığır serum (FBS) Biowest'ten satın alınmıştır. Sodyum Piruvat (100 mM) Gibco'dan satın alınmıştır. Fosfat tamponlama tuzu (PBS) (pH 7,4) 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,4 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) kullanılarak hazırlandı. Diklorometan (DCM) Merck'ten alınmıştır. 8 - 10 ohm / sq dirence ve 150-170 µm kalınlığa sahip İTO (İndinyum kalay oksit) kaplı 24 x 24 mm boyutundaki camlar Teknoma firmasından temin edilmiştir.

#### 2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler PalmSens potansiyostat (Palm, Houten, Hollanda) ile alınmıştır. Tüm ölçümler 10 mL'lik ölçüm hücresinde, 3'lü elektrot sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak modifiye edilmiş ITO, Ag/AgCl (3.0 M KCl, Metrohm, İsviçre) referans elektrodu olarak ve Pt ise karşıt elektrot (Metrohm, İsviçre) olarak kullanılmıştır.

Hücre görüntüleme çalışmalarında Olympus CKX41 model inverted mikroskop kullanılmıştır. Modifiye edilmiş yüzeyler üzerindeki floresan yoğunlukları Varian Cary Eclipse floresan spektrofotometre ile takip edilmiştir. Hazırlanan yüzeylerin, ıslanabilme özelliği (temas açısı) ölçümleri Attension Theta markalı cihazla yapılmıştır. SEM fotoğrafları Philips XL-30S FEG model cihazla alınmıştır. Polimerlerin elektro-optik karakterizasyonu sırasında Iviumstat potansiyostat/galvanostat spektroelektrokimyasal ölçümlerle birlikte kullanılan Agilent 8453 UV-vis spektrofotometre kullanılmıştır.

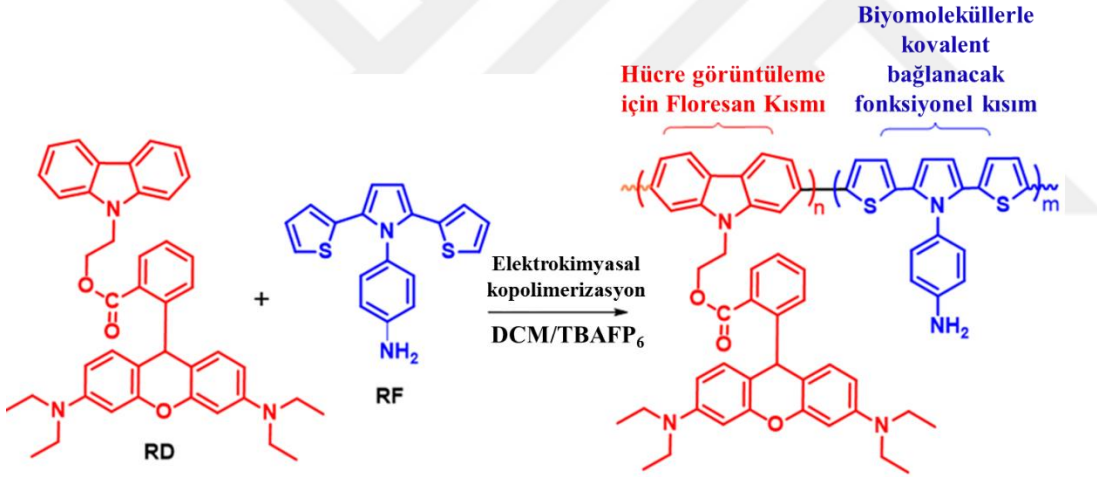
### 2.2. Monomer Sentezi

Monomer sentezi Pamukkale Üniversitesi Kimya Bölümü Prof. Dr. Metin Ak ve Dr. Rukiye Ayrancı tarafından gerçekleştirilmiştir. 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-

1H-pirol-1-yl)anilin (RF) monomerinin sentezi literatürdeki benzer prosedürlere göre sentezlenmiştir. Rhodamine B ve 9H-karbazol-9-etanolün kondenzasyon reaksiyonu sonucunda rodaminle işlevselleştirilmiş elektroaktif monomer (RD) elde edilmiştir. Rhodamine B (1,0 g, 2,1 mmol) ve fosfor oksiklorür (0,24 mL) karıştırılarak kuru diklorometan içinde geri aktarılmıştır. Ortaya çıkan ham asit klorür, 10 mL asetonitril içindeki (3,0 mL) trietilamin ve (0,4 g, 2,1 mmol) 9H-Karbazol-9-etanol çözeltisine eklenmiştir.

#### 2.4. Elektrokimyasal Hücre Sensörü ve Floresans Görüntüleme Platformu Oluşturulması

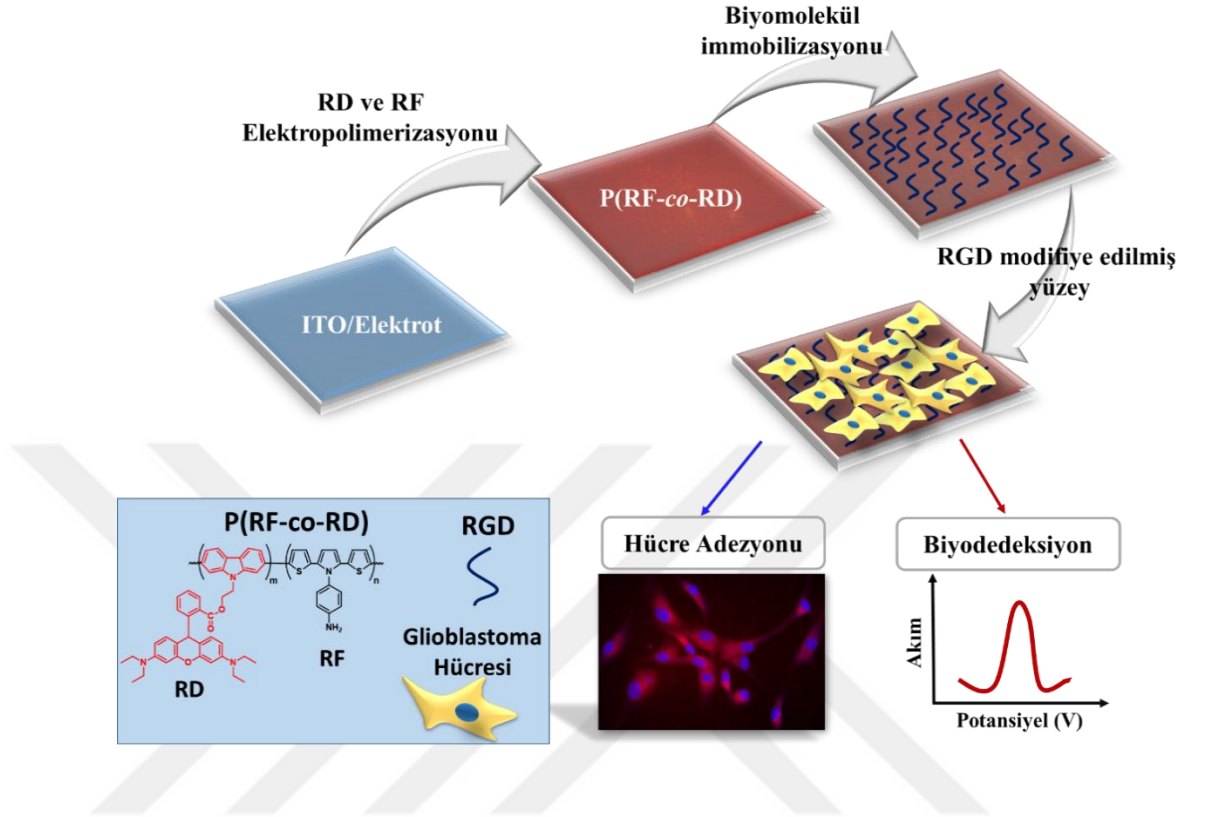
İlk olarak, ITO kaplı camlar sırasıyla aseton, etanol ve dH<sub>2</sub>O içinde 5' er dakika soniklenerek yıkandı. Farklı tarama hızlarında, -0,5 V ile +1,5 V potansiyel aralığında 0,1 M TBAPF<sub>6</sub>/DCM ortamında RD (0,1 mg / mL) ve RF (0,4 mg /mL) monomerlerinin elektrokimyasal kopolimerizasyonu gerçekleştirildi (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. RD ve RF monomerlerinin elektrokimyasal kopolimerizasyonunun şematik gösterimi.

Polimer kaplı ITO üzerine bağlanmayan monomerlerin uzaklaştırılması için pH 7,4 PBS ile yıkandı. İletken polimer yüzeyindeki serbest amino uçlarından RGD tripeptidi amid bağı ile kovalent olarak yüzeye bağlandı. Bunun için, RGD peptidinin karboksil grupları EDC reaktifi ile aktive edildi. 0, 2 M EDC pH 7, 4 PBS de çözülerek içerisine 0, 05 mg/mL konsantrasyonu olacak şekilde RGD eklendi. Ardından hazırlanan karışım 15 dakika 1000 rpm de oda sıcaklığında inkübe edildi. Serbest amino grubu içeren kopolimer ITO yüzeyi aktiflenen RGD ile kaplanarak gece boyu oda sıcaklığında tepkimeye bırakıldı. Bağlanmayan RGD'nin uzaklaştırılması için 3 kez PBS' le yıkandı. Elektrokimyasal hücre

dedeksiyonu ve floresans görüntüleme amacıyla oluşturulan yüzeyin hazırlanma aşamaları Şekil 2.2' de kısaca gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Biyoalgılayıcı yeni platformun oluşturulmasının illüstrasyon gösterimi

## 2.5. Elektrokimyasal Karakterizasyon

Yüzeylerin elektrokimyasal karakterizasyonu döngüsel voltammetri (CV), diferansiyel puls voltammetrisi (DPV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi

(EIS) ile yapıldı. ITO, P(RF), P(RD), P(RF-co-RD) ve P(RF-co-RD)/RGD yüzeylerine ait CV ölçümleri ; -0.5 V ve +1.5 V potansiyel aralığında, 0,1 KCL ve 5,0 mM  $K_4Fe(CN)_6$  içeren PBS (pH 7,4) içinde gerçekleştirildi. DPV ölçümleri için boş ITO, P(RF-co-RD) ve P(RF-co-RD)/RGD ve P(RF-co-RD)/RGD/Hücre yüzeylerine ait potansiyel aralığı -0,1 ve +0,4 olarak incelendi. EIS ölçümleri için 0,03-10 kHz ve potansiyel +0,18V olacak şekilde seçildi.

Ayrıca, yüzeylerin karakterizasyonu spektroeletrokimya çalışmalarıyla da desteklendi. Bu amaçla, 0,05 M TBAFP<sub>6</sub>/DCM çözücü sisteminde P(RF), P(RD) ve P(RF-co-RD) polimer filmlerinin nötral durumdaki maksimum dalgaboyu ( $\lambda_{max}$ ) ölçüldü.

## 2.6. X-ışını fotoelektron spektroskopisi

X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile elde spektrumlar, Thermo Scientific Model K-Alpha XPS enstrümanında, monokromatik Al Ka radyasyonu (1486,7 eV) kullanılarak oluşturuldu. Cihaz, 128-çok kanallı bir detektör sistemi ile donatılmış, yarı küresel elektron enerji analizörü kullanıldı. Analiz çemberindeki basınç  $2 \times 10^{-7}$  mbar'dır.

Çalışma spektrumları ve yüksek çözünürlüklü spektrumlar, her bir numune yüzey alanının tek nokta analizinde 300  $\mu\text{m}$ 'lik bir spot boyutu, 50 eV'lik analizör geçiş enerjisi kullanılarak elde edildi. Veriler, Avenger XPS yazılım paketi kullanılarak analiz edildi; bunlar, Gauss / Lorentz zirve şekilleri ve bir Shirley / Smart tipi arka plan kullanılarak yapıldı.

## 2.7. Hücre Kültürü Uygulamaları

U87-MG (ATCC) ve HaCaT (CLS) hücre hatları DMEM ortamında içerisinde 10% fetal sığır serumu and 1,0% penisilin/streptomisin içeren ortamlarda kültive edildi. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 ° C de inkübe edildi. U87-MG ve HaCaT hücre hatlarının konfluentliği %80 olduğunda pasajlandı.

P(RF-co-RD) and P(RF-co-RD)/RDG yüzeyleri seçici ve hücre adezyon özellikleri bakımından ticari polistiren (PS) ve ITO yüzeyleri ile karşılaştırıldı. İlk önce yüzeyler UV ışık altında 30 dakika steril edildi, ardından 6 kuyucuklu plakalara yerleştirildi. Tüm hücre çalışmalarında yüzeylerin üzerine  $5 \times 10^4$  hücre ekimi yapıldı. Hazırlanan yüzeyler floresan mikroskop altında incelendi. Hücreler 37°C' de 3 farklı saatte (24, 48, 72) inkübasyona bırakıldı. U87-MG ve HaCaT hücre hatlarının farklı yüzeyler üzerindeki davranışları incelendi. Her çalışmada ticari PS yüzeyleri kontrol yüzeyleri olarak kullanıldı. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, hücreler formaldehitte fikse edildi ve hücre çekirdekleri DAPI ile boyanarak floresan mikroskop altında incelendi.

### 2.7.1. Hücre Görüntülemesi

3 farklı inkübasyon süresinde farklı şekillerde modifiye edilen yüzeylerdeki hücre adezyonu floresan mikroskopla görüntülenmesi için ilk olarak 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Ardından % 3,7 lik formaldehit çözeltisi hazırlanarak 40-60 dakika boyunca 37° C de yüzeyler inkübe edildi. Formaldehitin uzaklaştırılması

için yüzeyler 3 kez yıkandı. Fikse edilmiş hücrelerin çekirdeklerinin boyanması için DAPI (1 $\mu$ L DAPI + 1mL PBS ) çözeltisi hazırlandı. DAPI çözeltisi ITO yüzeyini kapatacak şekilde koyuldu ve 5-15 dakika inkübasyona bırakıldı. Boyamanın ardından fazla boyanın uzaklaştırılması için yüzeyler 3 kez PBS'le yıkandı. Hücre sayısının belirlenmesi için yüzeylerin farklı bölgelerinden fotoğraflar çekildi ve Image J (NIH) programın kullanılarak hücre sayıları belirlendi.

Yüzeylere ait SEM görüntüleri, hücrelerin modifiye edilmiş yüzeyler üzerinde 72 saatlik inkübasyonu sonucu formaldehit ile fikse edilerek alındı. Yüzeyler tamamen kurutulduktan sonra SEM görüntüleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde alındı.

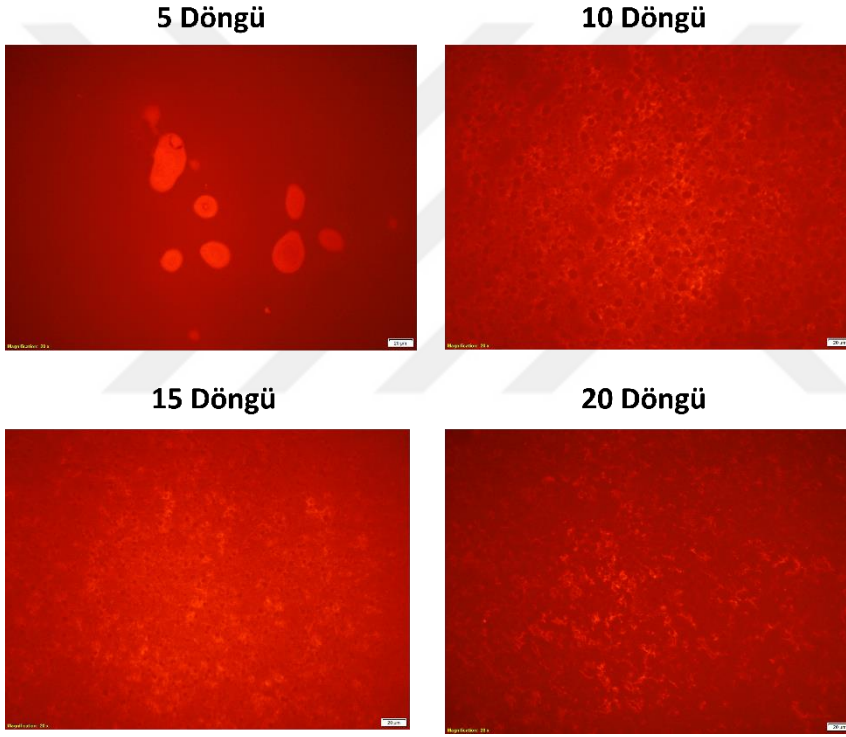
## **2.8. İstatistiksel Analiz**

GraphPAD Prism sürüm 5.03(Graph Pad Software, San Diego, CA) programı istatistiksel analiz için kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar ANOVA (Bonferroni) testi kullanılarak belirlenmiştir. İstatistiksel farklılıklar  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  ve  $p \leq 0,001$  değerleri için sırasıyla \*, \*\*, ve \*\*\* ile belirtilmiştir.

### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. Yüzey Karakterizasyonu

P(RF-co-RD) kopolimeri ITO-cam üzerinde elektrokimyasal biriktirme işlemi ile oluşturuldu (Şekil 3.1.). RD( 1 mg/mL) ve RF(4 mg/mL) monomerleri 0,1 M TBAPF<sub>6</sub> destek elektrolit varlığında DCM içerisinde çözüldü. Monomerler TO yüzey üzerinde döngüsel voltametri yöntemi ile biriktirildi. Döngüsel voltametri -0,5 ile +1,5V potansiyelleri arasında 5, 10,15 ve 20 döngü olarak biriktirildi. Oluşturulan yüzey floresans mikroskobuyla incelenerek, döngü sayısı optimize edildi.

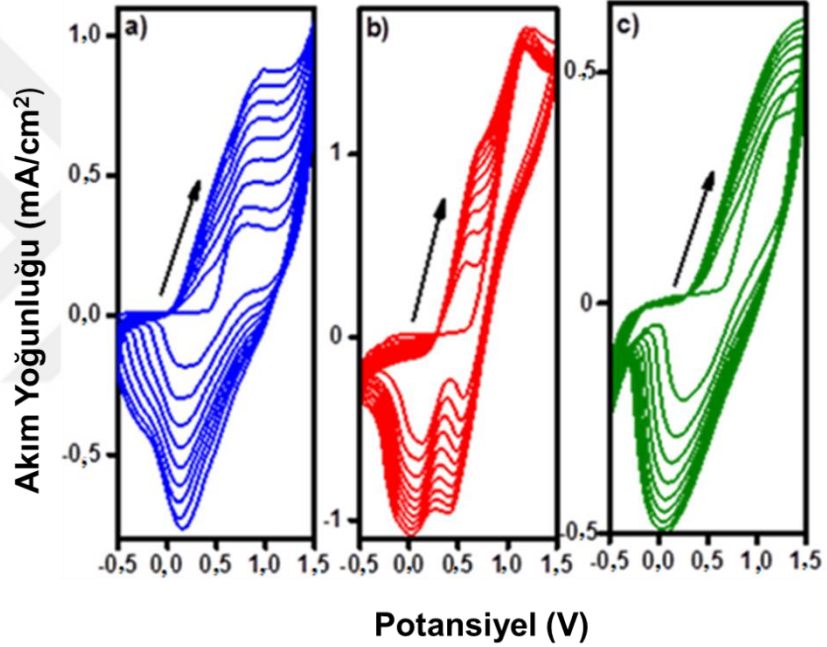


**Şekil 3.1.** Farklı döngü sayısına sahip yüzeylerin floresans mikroskopi görüntüleri. (Büyütme oranı 200  $\mu$ m)

Oluşturulan polimer yüzeyler floresans mikroskobunda incelendiğinde, 5 döngü olan yüzey düzenli gözlenmemiştir. 20 döngü olan yüzey kalın ve inkübasyon sonrasında yüzeyden kopmalar meydana geldiği tespit edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalar 15 döngü üzerinden gerçekleştirilmiştir.

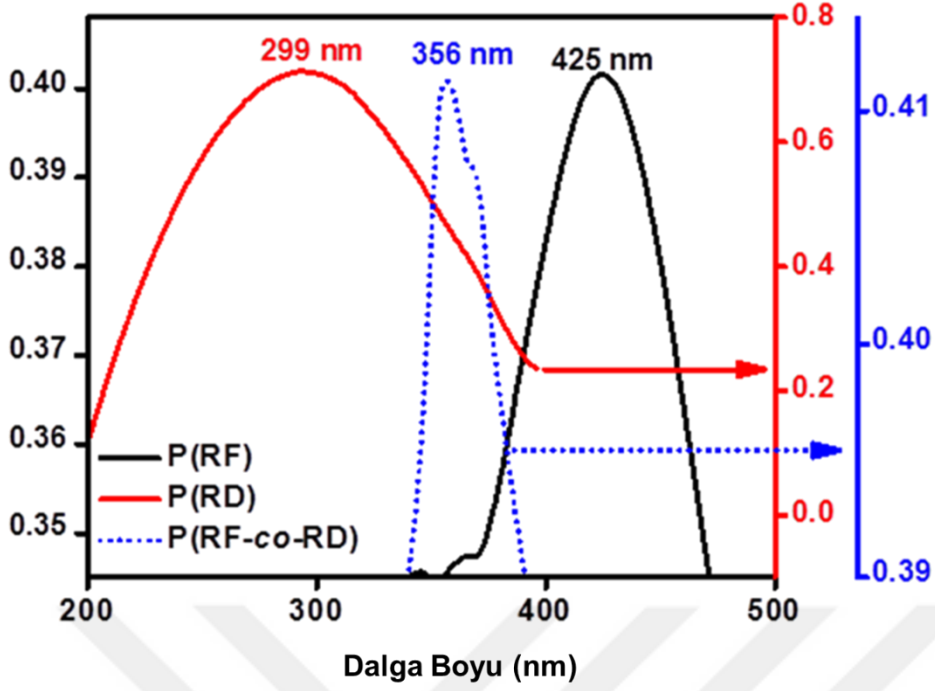
ITO kaplı camların üzerine ayrı ayrı P(PF), P(RD) ve P(RF-co-RD) polimerleri elektropolimerizasyon yöntemiyle biriktirildi. Yüzeyle ait redoks potansiyelleri CV ile belirlenmiştir (Şekil 3.2.). Elektrokimyasal

kopolimerizasyonunun oluşumu, kendisini oluşturan monomerlerin CVlerden bağımsız olarak oluşmaktadır. Şekil 3.2a' da P(RF) ye ait oksidasyon piki 0,79 V ve redüksiyon piki 0,16 V alınmıştır. Şekil 3.2b de P(RD) ye ait oksidasyon piki 0,63V da oluşmuştur, bunun yanı sıra oksidasyon piki hem 0,41 V hemde 0,01 V'da gözlenmiştir. P(RF-co-RD) kopolimer oksidasyon piki (Şekil 3.2c) 0,26 V ile 0,79 V arasındadır ve indirgenme piki 0,05 V olarak ölçülmüştür. Kopolimerin yükseltgenme ve indirgeme piklerine karşılık gelen homopolimerlerden farklı olması, kopolimerizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini ispatlamaktadır (Zhou and Heinze, 1999). RF ( $E_{\text{onset}} = 0.45 \text{ V}$ ) ve RD ( $E_{\text{onset}}=0.61 \text{ V}$ ) monomerlerinin oksidasyon potansiyelleri arasında farkın az olması, monomerlerin kopolimerizasyon olasılığını arttırmaktadır.



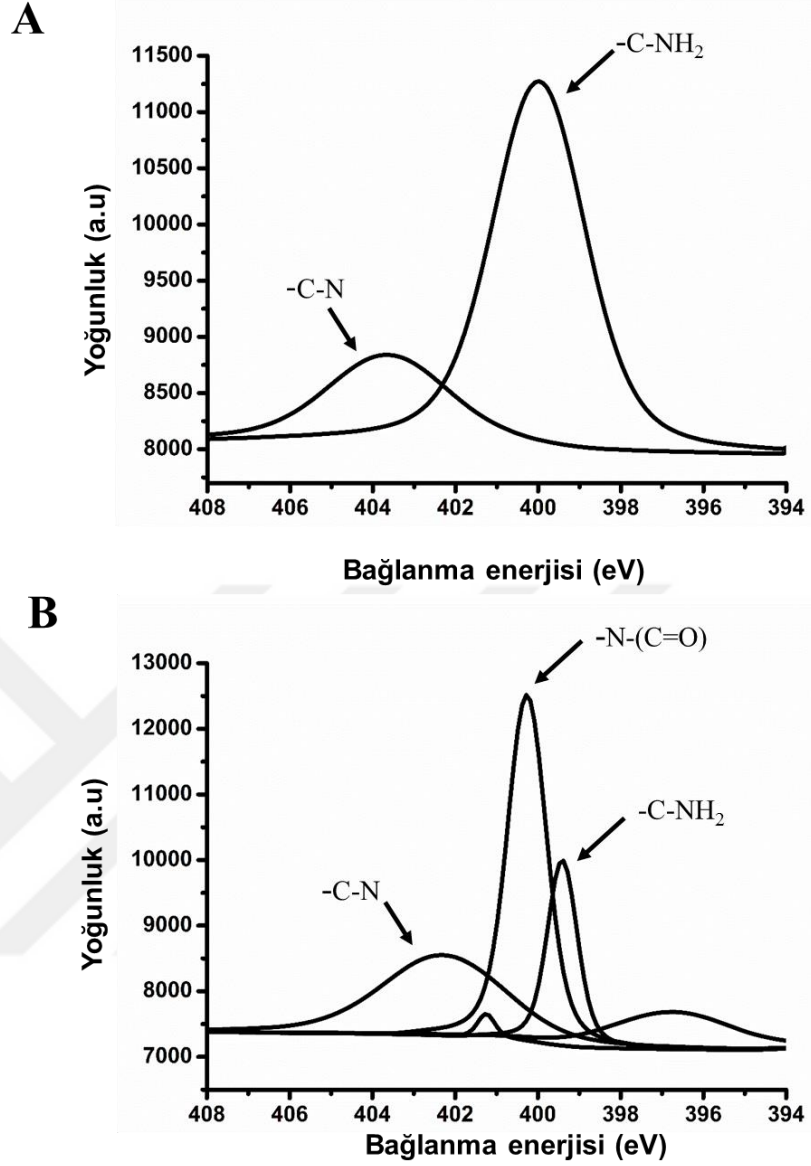
**Şekil 3.2.** Elektropolimerizasyonun CV diagramları a) P(RF) b) P(RD) c) P(RF-co-RD) (0,1 mg/mL RD, 0,4 mg/mL RF) 0,1 M TBAPF<sub>6</sub>/ DCM çözgen sisteminde tarama hızı 100 mV s<sup>-1</sup> ve 10 döngü yapılmıştır.

RF, RD ve oluşturdukları kopolimerin spektroeletrokimyasal davranışları incelendiğinde, nötr haldeki maksimum absorpsiyon dalga boyu incelendiğinde çok farklı bulunmuştur (Şekil 3.3.). Maksimum absorpsiyon dalga boyları elektroaktif monomerlere ve yan gruplarına bağlıdır. P(RD) maksimum dalga boyu 299 nm ve P(RF) için maksimum dalga boyu 425 nm olarak bulunmuştur. Kopolimerin maksimum dalga boyuna karşılık gelen 356 nm homopolimerler arasında gözlenmesi, RF monomerlerinin RD monomeriyle birlikte polimer zincirine dahil edildiğini göstermektedir. Bu, amin fonksiyonel gruplara sahip floresan kopolimer yapısının sentezini kanıtlamaktadır.



Şekil 3.3. P(RF), P(RD) ve P(RF-co-RD) ait spektroeletrokimyasal spektrumları

XPS yüzeydeki kimyasal bağların aydınlatılmasında kullanılan sayısal bir analiz tekniğidir (Ho et al., 1985). Kantitatif XPS analizi sayesinde RGD bağlanmadan önceki ve sonraki yüzeyler arasında karşılaştırma yapılmasına olanak sağlar. P(RF-co-RD) ve P(RF-co-RD)/RGD kaplanmış yüzeylerin N 1s XPS spektrumları Şekil 3.4'te verilmiştir.

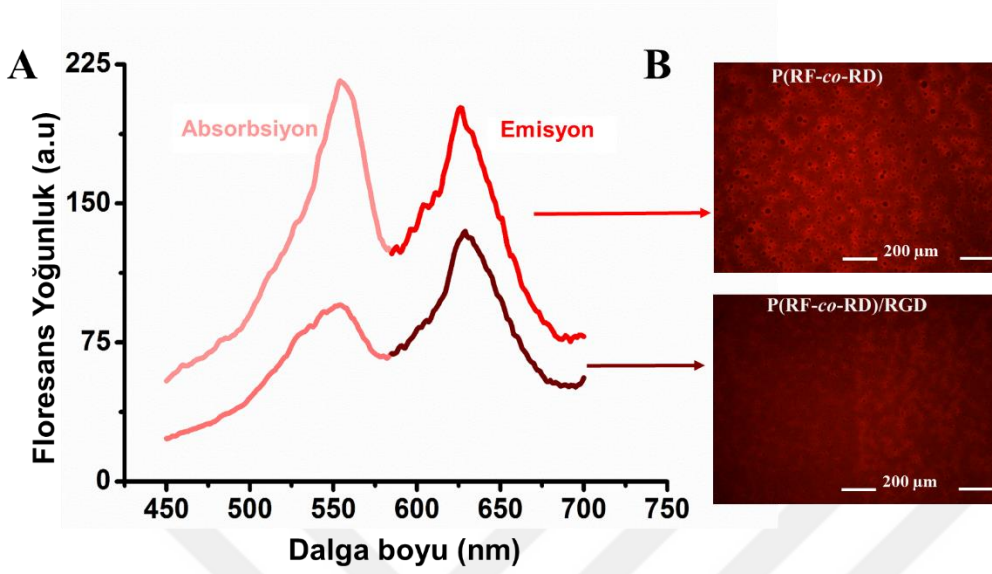


Şekil 3.4. Yüzeylerin XPS N 1s spektrumları A) P(RF-co-RD) ve B) P(RF-co-RD)/RGD

XPS N 1s spektrumlarının bileşenleri literatüre göre uygun şekilde; C-NH<sub>2</sub>, 399,9 eV; C-N, 403,6 eV; N-(C=O)- amid bağı, 402,3 eV bulunmuştur (Casanovas et al., ; Huang et al., 2014 ; Jedlicka et al., 2007 ; Yang et al., 2017). N 1s spektrumlarının bileşenleri, kopolimer yüzeyinde amid bağının varlığını göstermektedir.

P(RF-co-RD) ve P(RF-co-RD)/RGD yüzeylerine ait florimetrik ölçümler yapıldı. Yüzeylerin maksimum absorpsiyon piki 554 nm ve emisyon piki 626 nm olarak ölçüldü (Şekil 3.5A). Ayrıca Şekil 3.5B de P(RF-co-RD) ve P(RF-co-

RD)/RGD ait floresans görüntüleri bulunmaktadır. Burada RGD nin bağlanmasıyla yüzeydeki floresan şiddetinin azaldığı gözlenmektedir.



**Şekil 3.5.** A) P(RF-co-RD) ve P(RF-co-RD)/RGD polimer kaplı ITO cam yüzeylerin PBS (pH 7,4) içerisinde absorpsiyon ve emisyon pikleri B) P(RF-co-RD) ve P(RF-co-RD)/RGD yüzeylerine ait floresan mikroskopi görüntüleri (büyütme oranı: 200 µm).

Floresans mikroskobu altında görüntüleri alınan kopolimer yüzeyin ve kopolimer bağlı RGD yüzeyinde aynı floresan şiddetine maruz kalan yüzeylerde, immobilizasyon sonrasında yüzey morfolojisinde bir değişim gözlenmemiştir. RGD ile modifiye edilen kopolimer yüzeyi P(RF-co-RD) yüzeyinden daha karanlık gözükmektedir. Bunun nedeni yüzeye bağlanan RGD'nin ışık geçirgenliğini azalttığı düşünülmektedir. Şekil 3.5B'de görüldüğü gibi immobilizasyon yapılması yüzeyde herhangi bir bozulmaya neden olmamıştır.

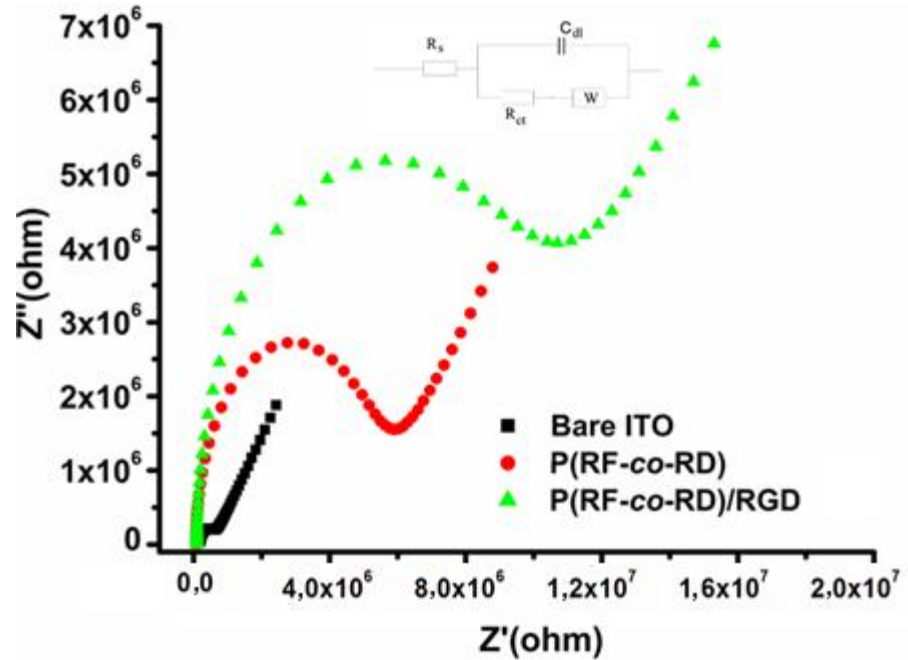
## 3.2 P(RF-co-RD) Kopolimer Yüzeyi Kullanarak Hazırlanan Biyofonksiyonel Yüzeyler Üzerinde Memeli Hücrelerinin Adezyonun İncelenmesi

### 3.2.1 Karakterizasyon

Yüzey modifikasyonun gerçekleştirildiğini göstermek amacıyla ferrasiyanür ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ) redoks probu varlığında EIS, CV ve DPV elektrokimyasal ölçümler alınmıştır.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yüzey modifikasyonunu göstermek için çok etkili bir metottur (Hilmiye, 2013). Tüm EIS verileri,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  redoks probunun difüzyon direncinin ( $R_s$ ), Warburg İmpedansı ( $Z_w$ ), çift katlı kapasitans ( $C_{dl}$ ) ve yük transfer rezidansı ( $R_{ct}$ ) içeren devre tasarımına göre gerçekleştirilmiştir.

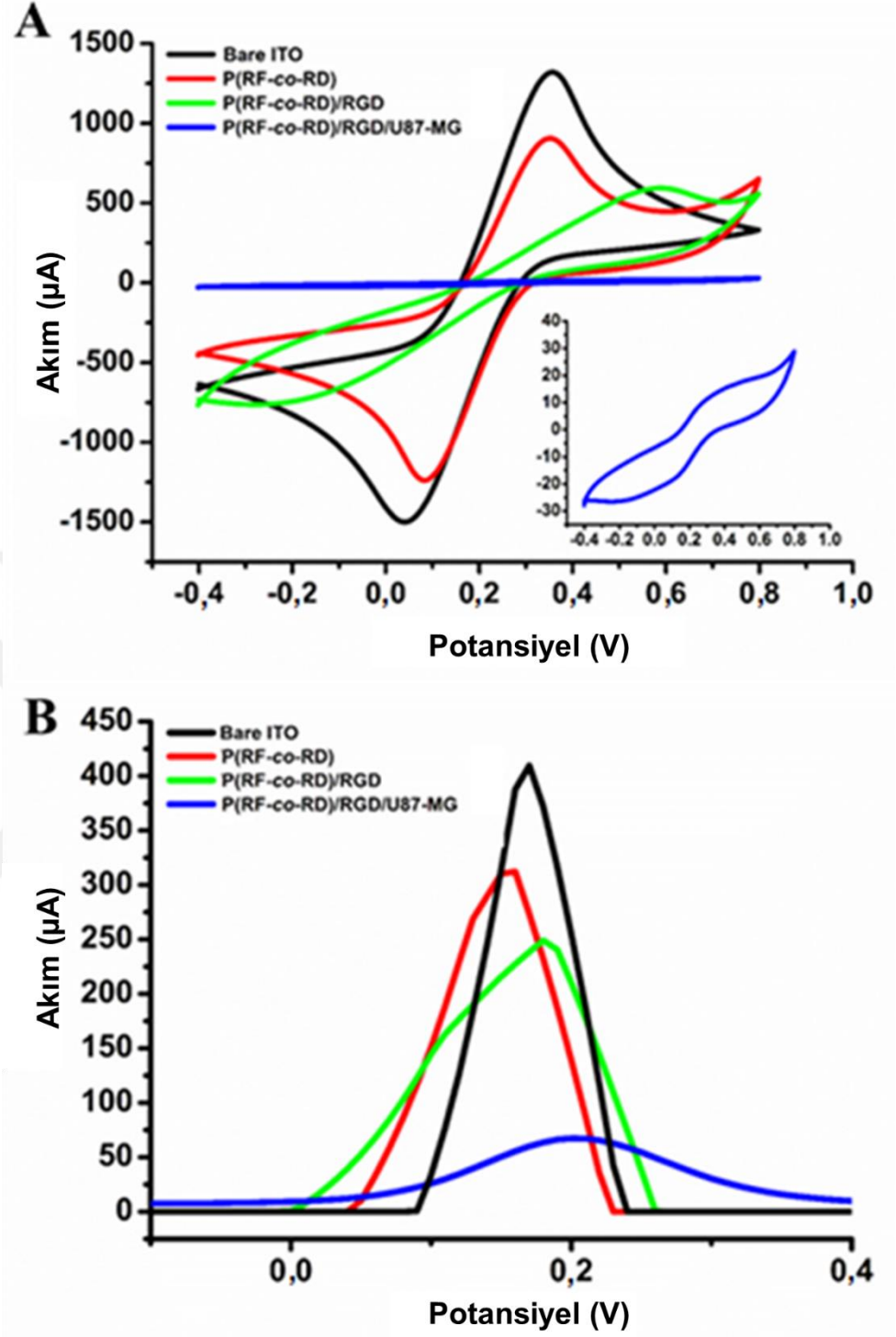
Şekil 3.6 ' de görüldüğü gibi her modifikasyon aşamasında  $R_{ct}$  değeri artmıştır. Çalışma elektrodu olan ITO' nun  $9,74 \times 10^5$  ohm, kopolimer kaplı ITO' nun P(RF-co-RD)  $2,72 \times 10^6$  ohm ve biyomolekül immobilize edilmiş kopolimer yüzey P(RF-co-RD)/RGD ise  $5,18 \times 10^6$  ohm olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.6. Modifiye edilen yüzeyin EIS diagramı ( 5mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ve 0,1 M KCl içeren PBS pH 7,4 içinde)

Redoks probu varlığında alınan CV ölçümlerinde yükseltgenme ve indirgenme piklerinin görülmesi yüzey karakterizasyonu için oldukça kullanışlı bir tekniktir.

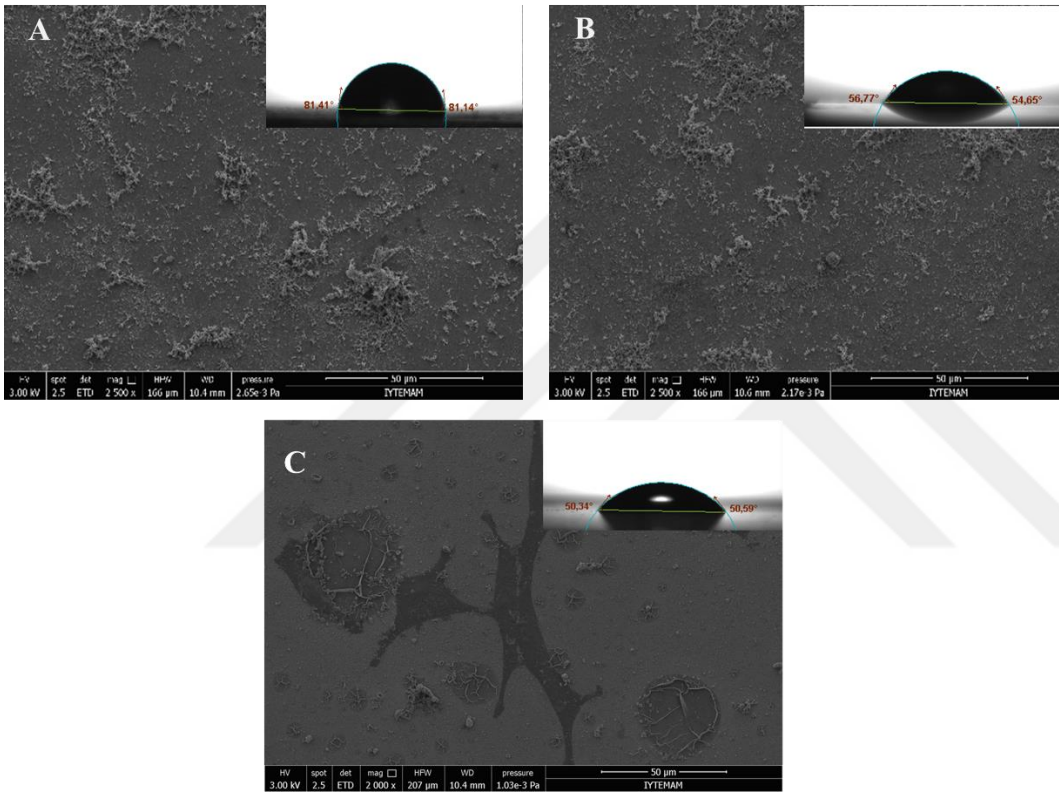
Çalışma elektrodu olan ITO camının tipik yükseltgenme ve indirgenme piklerinin gözlendiği CV eğrisi, Şekil 3.7' de görülmektedir. Monomerlerin elektropolimerizasyonu ile kaplanan ITO camının CV eğrisindeki pik akımları boş ITO' ya göre dramatik bir şekilde düşmüştür. Biyomolekül immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra, P(RF-co-RD)/RGD'ye ait yüzeyin de yükseltgenme/indirgenme piklerinde azalma meydana gelmiştir. Ayrıca U87-MG hücrelerinin adezyonu sonrasında elde edilen elektrokimyasal sonuçlar Şekil 3.7A'da verilmiştir. CV ölçümleri ile elde edilen anodik pik akım boş ITO için 1320,5  $\mu\text{A}$  ( $E_{pc}=0,36\text{ V}$ ), P(RF-co-RD) elektrot için 905,52  $\mu\text{A}$  ( $E_{pc}=0,35\text{ V}$ ), P(RF-co-RD)/RGD elektrot için 593,63  $\mu\text{A}$  ( $E_{pc}=0,59\text{ V}$ ) ve P(RF-co-RD)/RGD/U87-MG elektrodu için 28,93  $\mu\text{A}$  ( $E_{pc}=0,79\text{ V}$ ) olarak bulundu. Ayrıca yüzey karakterizasyonu DPV metoduyla da yapılmıştır. DPV sonuçlarına göre pik akım değerleri (Şekil 3.7B); boş ITO için 409,51  $\mu\text{A}$  ( $E_{pc}= 0,7\text{ V}$ ), P(RF-co-RD) elektrot için 312, 23  $\mu\text{A}$  ( $E_{pc}=0,16\text{ V}$ ), P(RF-co-RD)/RGD elektrot için 248,98  $\mu\text{A}$  ( $E_{pc}= 0,18\text{ V}$ ) ve P(RF-co-RD)/RGD and 67,26  $\mu\text{A}$  ( $E_{pc}= 0,18\text{ V}$ ) olarak bulundu.



**Şekil 3.7.** ITO, P(RF-co-RD), P(RF-co-RD)/RGD ve P(RF-co-RD)/RGD/U87-MG ait A)CV ve B)DPV diyagramları ( 5mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  ve 0,1 M KCl içeren PBS pH 7,4 içinde)

Polimer kaplı yüzeylerin biyomolekül immobilizasyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri Şekil 3.8' de verilmiştir. Polimer morfolojisi, polimerik parçalarla pürüzlülük göstermektedir. RGD immobilizasyonu sonucunda yüzeyde herhangi bir bozulma gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra, polimer kaplı yüzeyde

hücre adezyonuna ilişkin SEM görüntüleri Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Hazırlanan kopolimer yüzeylerin ıslanabilirlik özelliği temas açısıyla ölçülmüştür. P(RF-co-RD) yüzeyine ait temas açısı  $81,45 \pm 2,19$  olarak bulunmuştur. Peptit immobilizasyonundan sonra oluşan yüzeyin P(RF-co-RD)/RGD temas açısı  $55,11 \pm 0,23$  olarak bulunmuştur. Temas açısının düşmesi, yüzeye immobilize edilen peptidin yüzeye hidrofilik özellik kattığını göstermiştir. Ayrıca hücre adezyonu sağlanmış yüzeyler üzerindeki temas açısı  $50,65 \pm 0,29$  olarak bulunmuştur (Şekil 3.8).



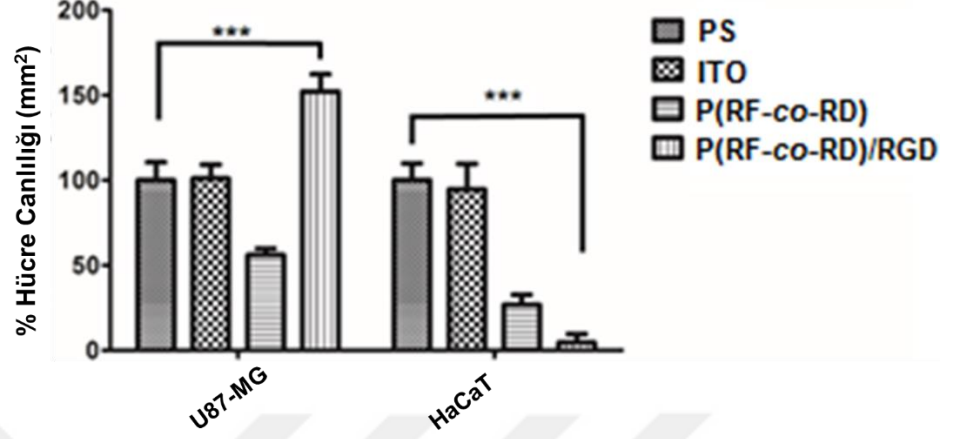
**Şekil 3.8.** A) P(RF-co-RD) B) P(RF-co-RD)/RGD ve C) P(RF-co-RD)/RGD/U87-MG yüzeylerine ait SEM fotoğrafları

### 3.2.2 Hücre adezyonu, Proliferasyonu ve Sensörü

Peptit modifiye edilmiş yüzeyler üzerine  $5 \times 10^4$  hücre eklenerek 72 saat sonundaki adezyon sonrasında hücre sayıları belirlenmiştir. İntegrin overeksprese olan U87-MG hücre hattı için RGD peptidi seçici bir materyal olarak daha önceki çalışmalarda da kullanılmıştır (Oyman et al., 2014; Zhan et al., 2012; Russo et al., 2013)

HaCaT ve U87-MG hücre hatları peptit modifiye yüzeyler üzerinde 72 saat inkübe edildikten sonra, hücre çekirdekleri boyanarak, hazırlanmış yüzeyler

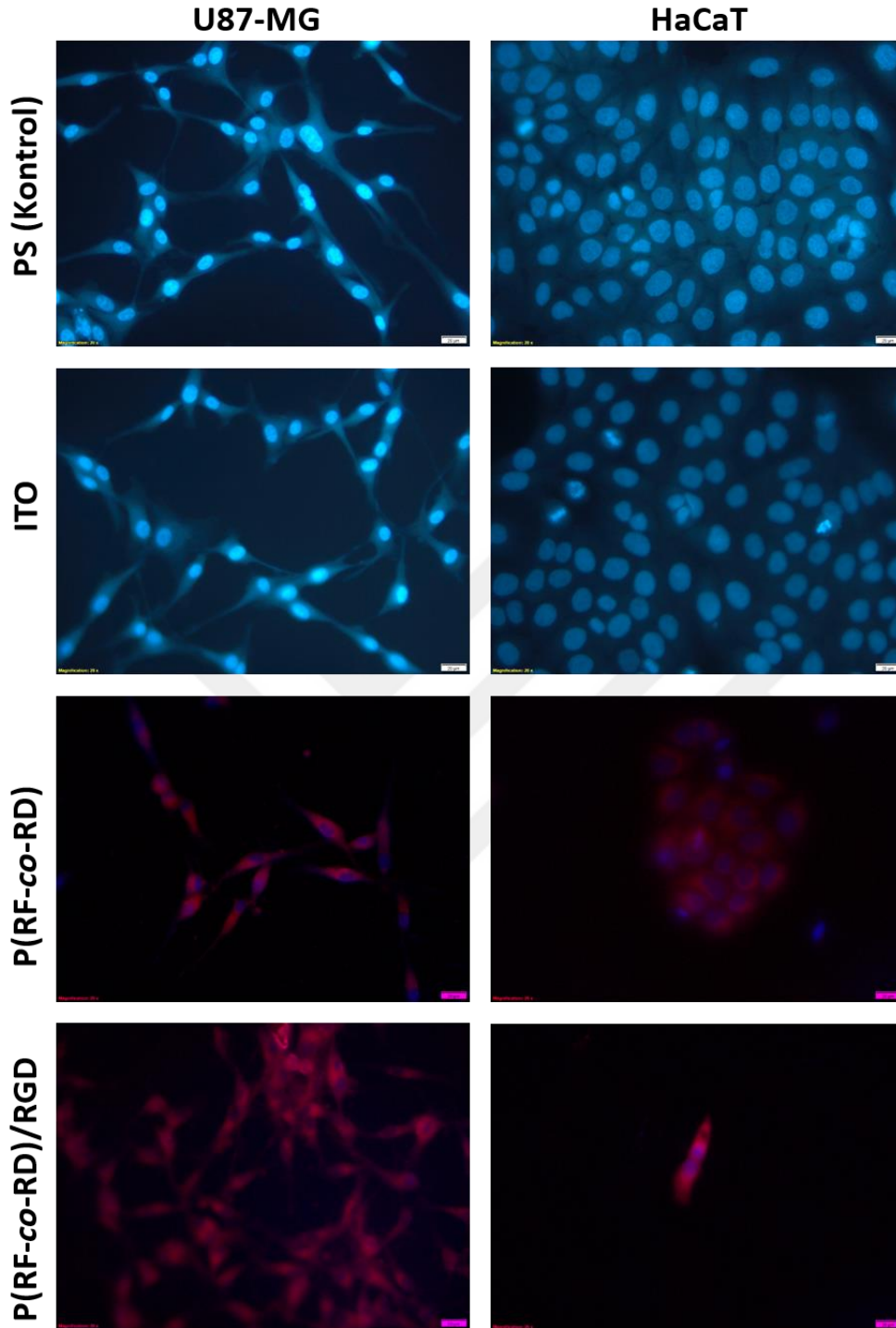
üzerindeki proliferasyonları incelenmiştir. Yüzeydeki bulunan peptit varlığı HaCaT hücresine kıyasla RGD-ligant pozitif olan U87-MG hücrelerinin tutulumunu arttırmıştır (Şekil 3.9.).



**Şekil 3.9.** U87-MG ve HaCaT hücre hatlarının RGD-modifiye yüzeylerine PS, ITO, ve kopolimer yüzeyler üzerindeki proliferasyonunu karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

Veriler, üç deneyin ortalaması  $\pm$ standart sapmayı temsil etmektedir. Yıldız işaretleri, her iki hücre hattı için PS yüzeyine kıyasla anlamlı farklanmaları göstermektedir.

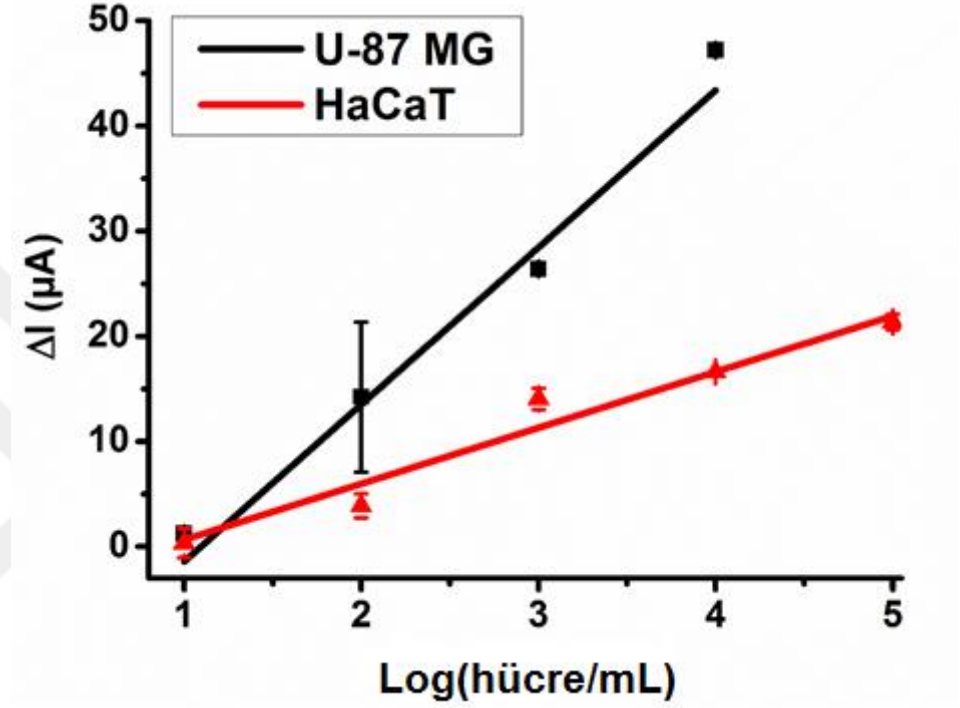
U87-MG ve HaCaT hücre hatlarının proliferasyonları Şekil 3.10' da görülmektedir. Ticari PS yüzeyler her denemede kontrol yüzeyi olarak kabul edilmiştir. ITO camları hücre adezyonu için uygun materyallerdir aynı zamanda PS yüzeylerde benzer özellikler göstermiştir. U87-MG hücre hattı için P(RF-co-RD)/RGD yüzeyi, hücre tutulumunu arttıran bir yüzey olarak bulunmuştur. Bu durum gösteriyor ki, U87-MG hücre hattı için seçici bir yüzey oluşturulması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, polimerin floresan özellikte olması hücrelerin ilave boyama işlemlerine tabi tutulmadan görüntülenmesine olanak sağlamıştır.



**Şekil 3.10.** U87-MG ve HaCaT hücrelerinin farklı yüzeyler üzerindeki 72 saatlik proliferasyona ilişkin floresan mikroskop görüntüleri

DPV hızlı ve etkili iyi bilinen bir elektrokimyasal ölçüm tekniğidir. Bu sistem ile düşük dedeksiyon limitlerinde ölçüm yapılabilmesi ve zemin akımını iyi ayırt edebilmesi sebebiyle tercih edilen bir metottur (Elqudaby et al., 2014). Biyomolekül bağlı kopolimer yüzeyine farklı sayıda ( $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  hücre/mL) hücreler eklenerek, 24 saat inkübe edildikten sonra ölçüm alınmıştır.

RGD varlığından dolayı olarak integrin reseptörün overexprese eden U87-MG hücre hattı için seçici yüzey oluşturulmuştur (Moncelet et al., 2013). HaCaT, U87-MG ye göre efektif bir adezyon göstermemiştir. U87-MG için doğrusal tayin aralığı  $10^1$ - $10^4$  hücre olarak bulunmuş ve doğru denklemi  $y=15,004x-15,246$ , ( $R_2=0,983$ ) olarak elde edilmiştir. Diğer taraftan HaCaT için doğrusal tayin aralığı  $y=5,478x-5,179$  ( $R_2=0,961$ ) olarak bulunmuştur Şekil 3.11.



**Şekil 3.11** DPV yöntemiyle  $10$ - $10^5$  hücre ile 24 saat inkübe edilen yüzeylerin P(RF-co-RD)/RGD/U87-MG ve P(RF-co-RD)/RGD /HaCaT ait kalibrasyon grafikleri

Çizelge 3.1. Literatürdeki benzer çalışmalar

Materyal	Ligand	Hücre Hattı	Doğrusal Aralık [hücre/ml]	Referans
Altın/ITO	TAT	Vero HeLa U87-MG	$10^2-10^5$ $10^1-10^5$ $10^1-10^5$	(Soylemez et al., 2016)
	RGD	Vero HeLa U87-MG	$10^1-10^5$ $10^2-10^5$ $10^1-10^5$	
Altın/ITO	RGDS	HeLa	$3.0 \times 10^2 - 10^7$	(Wang et al., 2014)
Altın disk elektrot/ Lektin	Con A	Bel-7404	$10^3 - 10^5$	(Hu et al., 2013)
Altın Elektrot	Folat-DNA	MCF-7	$10^2 - 10^6$	(Zhao et al., 2013)
PTCA/Grafen	Nükleolin aptameri	HeLa MDA-MB-231 K562 NIH3T3	$10^3 - 10^6$ (HeLa)	(Feng et al., 2011)
DTP-aril-NH <sub>2</sub>	Folik asit	HeLa	$10 - 10^5$	(Azak et al., 2016)
PMMA-b-PCL-NAC-	RGD	U87-MG	$10-10^5$	(Oyman Eyrilmez et al., 2015)
		HaCaT	$10^2-10^5$	
P(RF-co-RD)	RGD	U87-MG	$10-10^4$	(Ozturk Kirbay et al., 2017)
		HaCaT	$10-10^5$	
Con A; Konkavalin A, RGDS; Arg-Gly-Asp-Sertetrapeptide, PTCA; Perilen tetrakarboxilik asit,DTP-aril-NH <sub>2</sub> ; 4-(4H-dithieno[3,2-b:2,3-d]pirol-4-yl)anilin) polimer , PMMA-b-PCL-NAC-; N-asetil-L-sistein (NAC)-kaplı poli(metil metakrilat)-b-polikaprolakton blok kopolimer				

#### 4. SONUÇLAR

Bu çalışmada iletken polimerler kullanılarak elektropolimerizasyon yöntemiyle, elektroaktif yüzeyler oluşturuldu. Oluşturulan yüzeyler RGD peptidiyle modifiye edilerek seçici yüzey oluşturulması sağlandı. Yüzeylerin karakterizasyonu spektrofotometrik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılarak yapıldı. Farklı hücre hatları ile *in vitro* uygulamaları gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan yüzeyler hücre adezyonunu ve proliferasyonunu teşvik edici olmasıyla birlikte üzerinde uzun süreli hücre kültivasyonuna imkân vermektedir. P(RF-co-RD) kaplı yüzey hem elektrokimyasal hem de floresan dedeksiyonunda kullanılacak potansiyelde yeni bir sitosensör platformu yapılmıştır. RGD immobilize edilmiş yüzeyler seçici hücre adezyonu ve proliferasyonu için önemli bir rol oynamıştır. P(RF-co-RD)/RGD matrisinde U87-MG hücre hattının canlılığı kontrol grubuna kıyasla % 152,31 olarak belirlenmiştir. DPV yöntemiyle yapılan U87-MG için doğrusal tayin aralığı  $10-10^4$  hücre.ml<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. U87-MG hücre hattının yüksek miktardaki hücre konstrasyonu logaritmik bir artış gösterdiğinden doğrusal tayin aralığından sapma göstermektedir. Negatif kontrol grubu olan HaCaT hücre hattının doğrusal tayin aralığı  $10-10^5$  hücre.ml<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Bu farklanmanın olmasının sebebi, U87-MG hücre hattına seçici yüzey oluşturularak, proliferasyonunu desteklediği belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, hücre adezyonunda kullanılan floresan yüzeyler, herhangi bir boyamaya ihtiyaç duymadan görüntüleme amaçlı da kullanımı sağlamaktadır.

Literatürde benzer amaçlarla hazırlanan yüzeylerde genellikle ticari polimerler kullanılmıştır. Fakat literatürde yeni sentezlenmiş floresans özellik gösteren polimerlerle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Elde edilen modifiye yüzeyler kısa sürede ve düşük maliyette hazırlanma olanağına sahiptir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agarwal, S., Wendorff, J. H., and Greiner, A.**, 2008, Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer* 49, 5603–5621 pp.
- Azak, H., Barlas, F. B., Yildiz, H. B., Gulec, K., Demir, B., Demirkol, D. O., and Timur, S.**, 2016, Folic-Acid-Modified Conducting Polymer: Electrochemical Detection of the Cell Attachment, *Macromolecular Bioscience*, 16(4), 545- 552 pp.
- Balint, R., Cassidy, N. J., and Cartmell, S. H.**, 2014, Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2341- 2353 pp.
- By, P.**, 2007, World â€™™ s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher The Oil Palm Wastes in Malaysia.
- Casanovas, J., Ricart, J. M., Rubio, J., Illas, F., and Jime, J. M.**, 1996, Origin of the Large N 1s Binding Energy in X-ray Photoelectron Spectra of Calcined Carbonaceous Materials, 7863(2), 8071 - 8076 pp.
- Cho, P., Schneider, G. B., Kellogg, B., Zaharias, R., and Keller, J. C.**, 2006, Effect of glucocorticoid-induced osteoporotic-like conditions on osteoblast cell attachment to implant surface microtopographies, *Implant Dent*, 15(4), 377- 385 pp.
- Choi, S.J., and Park, S.M.**, 2002, Electrochemistry of Conductive Polymers. XXVI, Effects of Electrolytes and Growth Methods on Polyaniline Morphology, *Journal of The Electrochemical Society*, 149(2), 26 pp.
- Dembo, M., Torney, D. C., Saxman, K., and Hammer, D.**, 1988, The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 234(1274), 55- 83 pp.
- Dumbauld, D. W., Lee, T. T., Singh, A., Scrimgeour, J., Gersbach, C. a, Zamir, E. a, and García, A. J.**, 2013, How vinculin regulates force transmission, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(24), 9788- 93 pp.
- Elqudaby, H. M., Mohamed, G. G., and El Din, G. M. G.**, 2014, Electrochemical behaviour of trimebutine at activated glassy carbon electrode and its direct determination in urine and pharmaceuticals by square wave and differential pulse voltammetry, *International Journal of Electrochemical Science*, 9(2), 856- 869 pp.
- Feng, L., Chen, Y., Ren, J., and Qu, X.**, 2011, A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells, *Biomaterials*, 32(11), 2930- 2937 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Geiger, B., Bershinsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. M.**, 2001, Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature reviews, Molecular cell biology*, 2(11), 793- 805 pp.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., Baharvand, H., Kiani, S., and Ramakrishna, S.**, 2011, Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*,(5), 17-35 pp.
- Giri, D., and Kundu, K.**, 1996, Evolution of the electronic structure of cyclic polythiophene upon bipolaron doping. *Physical review B Condensed matter*, 53(8), 10 pp.
- Goddard, J. M., and Hotchkiss, J. H.**, 2007, Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds, *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 32(7), 698- 725 pp.
- Guimard, N. K., Gomez, N., and Schmidt, C. E.**, 2007, Conducting polymers in biomedical engineering, *Progress in Polymer Science*, 32(8- 9), 876- 921 pp.
- Guo, B., Glavas, L., and Albertsson, A.C.**, 2013, Biodegradable and electrically conducting polymers for biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 38(9), 1263- 1286 pp.
- Hersel, U., Dahmen, C., and ppKessler, H.**, 2003, RGD modified polymers : biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, 24, 4385- 4415 pp.
- Hilmiye, D.**, 2013, Impedimetric Biosensors for Label-Free and Enzymless Detection, *State of the Art in Biosensors - General Aspects*, 360 pp.
- Ho, P. S., Hahn, P. O., Bartha, J. W., Rubloff, G. W., LeGoues, F. K., and Silverman, B. D.**, 1985, Chemical bonding and reaction at metal/polymer interfaces. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 3(3), 739- 745 pp.
- Honarmandi, P., Lee, H., Lang, M. J., and Kamm, R. D.**, 2011, A microfluidic system with optical laser tweezers to study mechanotransduction and focal adhesion recruitment, *Lab on a chip*, 11(4), 684- 694 pp.
- Hong, S., Ergezen, E., Lec, R., and Barbee, K. A.**, 2006., Real-time analysis of cell-surface adhesive interactions using thickness shear mode resonator, *Biomaterials*, 27(34), 5813- 5820 pp.
- Horwitz, F.**, 1997, Integrins and health. *Scientific American*, 276(5), 68- 75 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Hu, Y. F., Zuo, P., and Ye, B. C.**, 2013, Label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor for direct detection of cancer cells based on the interaction between carbohydrate and lectin, *Biosensors & Bioelectronics*, 43, 79- 83 pp.
- Huang, L., Hu, J., Lang, L., Wang, X., Zhang, P., Jing, X., and Wei, Y.**, 2007, Synthesis and characterization of electroactive and biodegradable ABA block copolymer of polylactide and aniline pentamer, *Biomaterials*, 28(10), 1741- 1751 pp.
- Huang, L., Zhuang, X., Hu, J., Lang, L., Zhang, P., Wang, Y., and Jing, X.**, 2008, Synthesis of biodegradable and electroactive multiblock polylactide and aniline pentamer copolymer for tissue engineering application, *Biomacromolecules*, 9(3), 850- 858 pp.
- Huang, S., and Ingber, D. E.**, 1999, The structural and mechanical complexity of cell-growth control, *Nature cell biology*, 1(5), E131-8 pp.
- Huang, W., Anvari, B., Torres, J., and LeBaron, R.**, 2003, Temporal effects of cell adhesion on mechanical characteristics of the single chondrocyte, *Journal of Orthopaedic Research*.
- Huang, Y. S., Bertrand, V., Bozukova, D., Pagnouille, C., Labrugère, C., De Pauw, E., and Durrieu, M. C.**, 2014, RGD surface functionalization of the hydrophilic acrylic intraocular lens material to control posterior capsular opacification, *PLoS ONE*, 9(12), 1- 32 pp.
- Hynes, R. O.**, 1987, Integrins: A family of cell surface receptors, *Cell*, 48 (4), 549-554 pp.
- Jedlicka, S. S., Rickus, J. L., and Zemlyanov, D. Y.**, 2007, Surface analysis by X-ray photoelectron spectroscopy of sol-gel silica modified with covalently bound peptides, *J. Phys. Chem. B*, 111, 11850- 11857 pp.
- Kim, D.H.H., Richardson-Burns, S. M. M, Hendricks, J. L. L, Sequera, C., and Martin, D. C. C.**, 2007, Effect of Immobilized Nerve Growth Factor on Conductive Polymers: Electrical Properties and Cellular Response. *Advanced Functional Materials*, 17(1), 79- 86 pp.
- Kim, I.Y., Seo, S.J., Moon, H.-S., Yoo, M.K., Park, I.Y., Kim, B.C., and Cho, C.S.**, 2008, Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26, 1-21 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kotwal, A., & Schmidt, C. E.**, 2001, Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials, *Biomaterials*, 22(10), 1055- 1064 pp.
- Kumar Gupta, A., and Curtis, A. S. G.**, (n.d.), Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human broblasts in culture, *I*(4), 9- 3 pp.
- Ladoux, B., and Nicolas, A.**, 2012, Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues, *Reports on Progress in Physics*, 75(11), 116-601 pp.
- Lakard, B., Ploux, L., Anselme, K., Lallemand, F., Lakard, S., Nardin, M., and Hihn, J. Y.**, 2009, Effect of ultrasounds on the electrochemical synthesis of polypyrrole, application to the adhesion and growth of biological cells, *Bioelectrochemistry*, 75(2), 148- 157 pp.
- Lee, J. W., Serna, F., Nickels, J., and Schmidt, C. E.**, 2006, Carboxylic acid-functionalized conductive polypyrrole as a bioactive platform for cell adhesion, *Biomacromolecules*, 7(6), 1692- 1695 pp.
- Lee, J. Y., Bashur, C. A., Goldstein, A. S., and Schmidt, C. E.**, 2009, Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*, 30(26), 4325- 4335 pp.
- Martins, N. C. T., Moura e Silva, T., Montemor, M. F., Fernandes, J. C. S., and Ferreira, M. G. S.**, 2008, Electrodeposition and characterization of polypyrrole films on aluminium alloy 6061-T6. *Electrochimica Acta*, 53(14), 4754- 4763 pp.
- Moncelet, D., Bouchaud, V., Mellet, P., Ribot, E., Miraux, S., Franconi, J. M., and Voisin, P.**, 2013, Cellular density effect on RGD ligand internalization in glioblastoma for MRI application, *PLoS ONE*, 8(12), 1- 9 pp.
- Okegawa, T., Pong, R.C., Li, Y., and Hsieh, J.T.**, 2004, The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy, *Acta biochimica Polonica*, 51(2), 445- 457 pp.
- Oyman, G., Geyik, C., Ayranci, R., Ak, M., Demirkol, D. O., Timur, S., and Coskunol, H.**, 2014, Peptide-modified conducting polymer as a biofunctional surface: monitoring of cell adhesion and proliferation, *RSC Adv.*, 4(96), 53411- 53418 pp.
- Oyman Eyrilmez, G., Doran, S., Murtezi, E., Demir, B., Odaci Demirkol, D., Coskunol, H., and Yagci, Y.**, 2015, Selective Cell Adhesion and Biosensing Applications of Bio-Active Block Copolymers Prepared by CuAAC/Thiol-ene Double Click Reactions, *Macromolecular Bioscience*.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Ozturk Kirbay, F., Ayranci, R., Ak, M., Odaci Demirkol, D., and Timur, S.,** 2017, Rhodamine functionalized conducting polymer for dual intention: Electrochemical sensing and fluorescence imaging of cells, *J. Mater. Chem. B*, (unpublished).
- Rahmany, M. B., and Van Dyke, M.,** 2013, Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review, *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5431- 5437 pp.
- Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D.,** 1987, New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, *Science (New York, N.Y.)*, 238(4826), 491- 7 pp.
- Russo, M. A., Paolillo, M., Sanchez-Hernandez, Y., Curti, D., Ciusani, E., Serra, M., and Schinelli, S.,** 2013, A small-molecule RGD-integrin antagonist inhibits cell adhesion, cell migration and induces anoikis in glioblastoma cells, *International Journal of Oncology*, 42(1), 83-92 pp.
- Saif, M. T. A., Sager, C. R., and Coyer, S.,** 2003, Functionalized biomicroelectromechanical systems sensors for force response study at local adhesion sites of single living cells on substrates, *Annals of Biomedical Engineering*, 31(8), 950- 961 pp.
- Shen, Y., Nakajima, M., Kojima, S., Homma, M., Kojima, M., and Fukuda, T.,** 2011, Single cell adhesion force measurement for cell viability identification using an AFM cantilever-based micro puffer, *Measurement Science and Technology*, 22, 115-802 pp.
- Simon, S. I., and Green, C. E.,** 2005, Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation, *Annual review of biomedical engineering*, 7, 151- 185pp.
- Soylemez, S., Demir, B., Eyrilmez, G. O., Kesici, S., Saylam, A., Odaci Demirkol, D., and Toppare, L.,** 2016, Comparative cell adhesion properties of cysteine extended peptide architectures, *RSC Adv.*, 6(4), 2695- 2702 pp.
- Sun, H., Zhu, X., Lu, P. Y., Rosato, R. R., Tan, W., and Zu, Y.,** 2014, Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 3, e182.
- Szekanecz, Z., and Koch, E.,** 2000, Cell-cell interactions in synovitis. Endothelial cells and immune cell migration, *Arthritis research*, 2(5), 368- 73 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Tait, A., Fisher, A. L., Hartland, T., Smart, D., Glynne-Jones, P., Hill, M., and Davies, D. E.**, 2015, Biocompatibility of poly(2-alkyl-2-oxazoline) brush surfaces for adherent lung cell lines, *Biomaterials*, 28 (10), 1741-1751 pp
- Wallace, G. G., Smyth, M., and Zhao, H.**, 1999, Conducting electroactive polymer-based biosensors, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 18(4), 245- 251 pp.
- Wan, Y., Mahmood, M. A. I., Li, N., Allen, P. B., Kim, Y. T., Bachoo, R., and Iqbal, S. M.**, 2012, Nanotextured substrates with immobilized aptamers for cancer cell isolation and cytology, *Cancer*, DOI: 10.1002/cncr.26349
- Wang, X., Ju, J., Li, J., Li, J., Qian, Q., Mao, C., and Shen, J.**, 2014, Preparation of electrochemical cytosensor for sensitive detection of hela cells based on self-assembled monolayer. *Electrochimica Acta*, 123, 511- 517 pp.
- Watanabe, J., and Ishihara, K.**, 2003, Change in cell adhesion property on cytocompatible interface using phospholipid polymer grafted with poly(D,L-lactic acid) segment for tissue engineering, *Science and Technology of Advanced Materials*, 4(6), 539- 544 pp.
- Williams, R. L., and Doherty, P. J.**, 1994, A preliminary assessment of poly(pyrrole) in nerve guide studies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5(6- 7), 429- 433 pp.
- Yang, X., Al Hegy, A., Gauthier, E. R., and Gray-Munro, J.**, 2017, Influence of mixed organosilane coatings with variable RGD surface densities on the adhesion and proliferation of human osteosarcoma Saos-2 cells to magnesium alloy AZ31, *Bioactive Materials*, 2(1), 35- 43 pp.
- Zhan, C., Meng, Q., Li, Q., Feng, L., Zhu, J., and Lu, W.**, 2012, Cyclic RGD-polyethylene glycol-polyethylenimine for intracranial glioblastoma-targeted gene delivery, *Chemistry - An Asian Journal*, 7(1), 91- 96 pp.
- Zhang, Q., Yan, Y., Li, S., and Feng, T.**, 2010, The synthesis and characterization of a novel biodegradable and electroactive polyphosphazene for nerve regeneration, *Materials Science and Engineering C*, 30(1), 160- 166 pp.
- Zhao, J., Zhu, L., Guo, C., Gao, T., Zhu, X., and Li, G.**, 2013, A new electrochemical method for the detection of cancer cells based on small molecule-linked DNA, *Biosensors & bioelectronics*, 49, 329- 33 pp.
- Zhou, M., and Heinze, E.**, 1999, Electropolymerization of pyrrole and electrochemical study of polypyrrole : 1 .Evidence for structural diversity of polypyrrole, 44, 1733- 1748 pp.

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **Kişisel Bilgilerim**

**Adı Soyadı:** Fatma ÖZTÜRK KIRBAY

**TC kimlik No:** 49900381734

**Doğum yeri ve Tarihi:** Gebze/ 12.08.1991

**Medeni Durum :** Evli

### **İletişim Bilgilerim**

**Adres :** İnönü Mahallesi Turgut Reis Caddesi No: 33 Daire :1  
Bornova/İZMİR

**Cep Telefonu :** 05546180160

**e-posta :** ffatma.ozturkk@gmail.com

### **Eğitim Bilgilerim**

#### **Yüksek Lisans**

**Üniversite :** Ege Üniversitesi

**Fakülte Enstitü :** Fen Bilimleri Enstitüsü

**Bölüm :** Biyokimya Ana Bilim Dalı

**Başlangıç - Bitiş Tarihi :** 2014 - devam ediyor

**Lisans**

**Üniversite :** Ege Üniversitesi

**Fakülte :** Fen Fakültesi

**Bölüm :** Biyokimya Bölümü/ Biyoteknoloji Ağırlıklı Biyokimya Opsiyonu

**Dereceyle Mezuniyet :** Bölüm 3.sü olarak mezuniyet

**Diploma Not Ortalaması :** 3.20

**Başlangıç - Bitiş Tarihi :** 2009-2014

**Lise :** Anibal Anadolu Lisesi / Sayısal Ağırlıklı

**Başlangıç - Bitiş Tarihi :** 2005-2009

**Yabancı Dil**

**İngilizce :** 1 yıl Üniversite Hazırlık

**Seviye**

**Okuma:** iyi

**Yazma:** iyi

**Konuşma:** orta

**Lisans Tez Başlığı ve Danışmanı**

Profil oligopeptidaz biyosensörlerinin hazırlanması ve potansiyel inhibitörlerin taranması.

Danışman: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

## ESERLER

### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanacak makaleler

1. **Fatma Öztürk Kırbay**, Caner Geyik, Emine Güler, Ozan Yesiltepe, Z.Pinar Gümüş, Dilek Odacı Demirkol, Hakan Coşkunol, Suna Timur, Testing of bioactive-nanovesicles on hepatotoxicity of atypical antipsychotics using digital holography, *Colloid and Surfaces B*. 152,289-295

2. **Fatma Ozturk Kırbay**, Rukiye Ayranci, Metin Ak, Dilek Odacı Demirkola, Suna Timur, Rhodamine enclosed conducting polymers for dual intention electrochemical sensing and fluorescence imaging of cells, *Journal and Material Chemistry B* . DOI 10.1039/C7TB01716B

### 3. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. **Fatma Öztürk Kırbay**, Caner Geyik, Emine Güler, Z. Pınar Gümüş, Dilek Odacı Demirkol, Hakan Coşkunol, Suna Timur, Atipik antipsikotiklerin hepatotoksitesine bir gıda takviyesinin koruyucu etkisinin araştırılması, 9. Ulusal Alkol ve Madde Bağımlılığı Kongresi, 10-12 Aralık Balkan Kongre Merkezi Edirne/TÜRKİYE

2. **Fatma Ozturk Kırbay**, Rukiye Ayranci, Metin Ak, Suna Timur, Dilek Odacı Demirkol Rhodamine Containing Conducting Polymers for Dual-Purpose Electrochemical and Fluorescence Cytosensing, XXIV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 3-7 Temmuz 2017 Lyon-Fransa

3. **Fatma Ozturk Kırbay**, Esra Evrim Yalcinkaya, Gozde Atik, Gizem Evren, Betul Unal, Suna Timur, Dilek Odacı Demirkol Polycaprolactone/chitosan electrospun nanofibers modified surfaces in cell sensing, XXIV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 3-7 Temmuz 2017 Lyon-Fransa

### Katılan Ulusal ve Uluslararası Kurslar:

1. Deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartlar sertifika eğitim programı, 15.10.2011 Biyokimyagerler Derneği, İzmir/TÜRKİYE

2. Kök Hücre Sempozyumu, Ege üniversitesi Bilim Teknoloji Topluluğu, 30.04.2011 İzmir/TÜRKİYE

3. “BiyoFotonik ve BiyoMEMS’te Yeni Gelişmeler” çalıştayı, 12 Ağustos 2014 İstanbul Şehircilik Üniversitesi İstanbul/ TÜRKİYE

4. “From the Clinic to the basics (and vice versa) for urea cycle disorders: Carbamoyl phosphate synthetase deficiency as an example” Prof.Dr. Vicente Rubio, 9 Ekim 2014, Türk Biyokimyagerler Derneği, İzmir /TÜRKİYE

5. Uygulamalı radyofarmasi kursu, 30 Eylül-02 Ekim 2016, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, İzmir/ TÜRKİYE

6. XI. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi, 12-14 Ekim 2016, Kuşadası/TÜRKİYE

7. XXIV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 3-7 Temmuz 2017 Lyon-Fransa

## **EĞİTİM- ÖĞRETİM VE ARAŞTIRMA FAALİYETLERİ**

### **A. Projelerde Yaptığı Görevler:**

1. Prolil oligopeptidaz biyosensörlerinin hazırlanması ve potansiyel inhibitörlerin taranması, Tübitak 2209 Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı, Yürütücü, 2013

2. Atipik antipsikotiklerin hepatotoksitesine bir gıda takviyesinin koruyucu etkisinin mikroakışkan hücre kültürü sistemleriyle araştırılması" **Fatma Öztürk Kırbay**, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur, Hakan Coşkunol, Tübitak 214Z126, Bursiyer-Çalışan, 2015

3. Beyin hücrelerinin adezyonunda kullanım potansiyeli olan yeni fonksiyonel yüzeylerin hazırlanması, Ege Üniversitesi Araştırma Fonu, 15 Fen 057, Proje personeli,2015 (Devam ediyor)

4. Nanoparçacık etkilerinin çip üstü hücre kültürü ile in vitro olarak belirlenmesi, Suna Timur, Hakan Coşkunol, Görkem Yazarbaş,Yücel Başpınar, Dilek Odacı Demirkol,Tübitak Cost Projesi, 114Z058, Proje çalışanı, 2016

5. Biyo-hibrit platformların tasarımı ve uygulamaları, Dilek Odacı Demirkol, Esra Evrim Yalçinkaya, Suna Timur, Nesrin Horzum, 1001 bilimsel ve teknolojik araştırma projelerini destekleme programı, 215Z194, Bursiyer-Çalışan, 2016 (Devam ediyor).

### **B. Ödüller**

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü/Biyoteknoloji Ağırlıklı Biyokimyagerlik

Dereceyle mezuniyet: Bölüm 3.sü olarak mezuniyet

### **DİĞERLERİ**

#### **A. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:**

1. Biyokimyagerler Derneği

#### **B. Verilen Seminerler:**

Beyin hücrelerinin adezyonunda kullanım potansiyeli olan yeni fonksiyonel yüzeylerin hazırlanması, 3 Haziran 2016, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, İzmir