

**HAVAYOLU MODELLEMESİ AMAÇLI TASARLANAN
MÜHENDİSLİK ÜRÜNÜ 3B HÜCRE KÜLTÜR
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF ENGINEERING PRODUCT 3D
CELL CULTURE SYSTEMS DESIGNED
FOR AIRWAY MODELLING**

SEMA TUNCER

PROF. DR. İBRAHİM ÇAĞATAY KARAASLAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

ÖZET

HAVAYOLU MODELLEMESİ AMAÇLI TASARLANAN MÜHENDİSLİK ÜRÜNÜ 3B HÜCRE KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Sema TUNCER

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Mayıs 2022, 152 sayfa

Kronik hava yolu hastalıkları çevresel ve genetik faktörlerin rol oynadığı bir dizi karmaşık mekanizmaya sahiptir. Bu hastalıkların moleküler patolojilerinin çalışılması ve kritik cerrahi ameliyatlardan sonrasında ihtiyaç duyulan doku nakli için *in vivo* ortamı taklit eden uygun hücre model sistemlerinin kurulması oldukça önemlidir.

Literatürde havayolunu modellemek için çeşitli hücre model *in vitro* model sistemler oluşturulmuştur. Havayolu hücre kültürleri için kullanılan *in vitro* modeller arasında en yaygın yöntemlerden biri hava-sıvı arayüzü (Air Liquid Interface -ALI-) kültür sistemi ve bu sistemde kullanılan transwell-insert membran yapılarıdır. Ancak halihazırdaki ALI-kültür uygulamalarında transwell membranların her iki yüzüne de ekim yapabilecek pratik bir sistem tasarımı bulunmadığı için hücre-hücre etkileşimi incelenirken ALI kültür sisteminin iki yüzü etkin kullanılamamaktadır. Ticari olarak günümüzde satılan sistemlerin 3 boyutlu (3B) hücre ko-kültür sistemlerine yatkınlığı da son derece kısıtlıdır. Çalışmanın ilk basamağında; halihazırda ALI kültür sistemlerinde kullanılan transwell'in kullanımı daha efektif hale getirilerek modifiye edilmiş ve bu amaçla transwell adaptörler 3B yazıcıdan çıkartılmış, sızıntı denemeleri gerçekleştirilmiş ve ALI sistemine uyarlanarak epitel-fibroblast ko-kültürleri yapılmıştır. Ko-kültür modeller üzerinde

immünohistokimya ve gerçek zamanlı PZR çalışmaları gerçekleştirilmiş ve modellerin etkinliği doğrulanmıştır. Denemelerin sonucunda 3B ko-kültür sistemine dönüşümünü sağlayan yeni bir ürün geliştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında epitel doku greft gelişimine uygun transwell yapısında kullanılmak üzere biyobozunur membranlar geliştirilmiştir. Bu amaçla poli (L-laktik asit) (PL24, Corbion, intrinsik viskozite=1.5-2.0 dL/g) ve poli(e-kaprolakton) (PCL12, Corbion, intrinsik viskozite=1.0-1.3 dL/g) polimerleri kullanılarak elektroegirme yöntemiyle örgüsüz nanofiber ağ yapısında membranlar sentezlenmiştir. Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra uygun bulunan membranlar 3B ALI-kültür sistemine entegre edilerek hücre kültür sistemlerinde değerlendirilmiştir. Geliştirilen biyobozunur özellikteki membranın, fizyolojik ortamda doğal olarak oluşan bariyer yapısı gibi sürdürülebilir özellikte olduğu ve havayolu modellemesi için ALI-kültür sistemlerinde kullanımının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: havayolu modellemesi, hava-sıvı arayüzü, biyobozunur membran, 3B ko-kültür.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ENGINEERING PRODUCT 3D CELL CULTURE SYSTEMS DESIGNED FOR AIRWAY MODELLING

Sema TUNCER

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN

Mayıs 2022, 152 pages

Chronic airway diseases have a complex set of mechanisms in which environmental and genetic factors play a role. It is very important to study the molecular pathologies of these diseases and to establish suitable cellular model systems that mimic the *in vivo* environment for tissue transplantation needed after critical surgical operations.

Various cellular *in vitro* model systems have been created in the literature to model the airway. The most prevalent *in vitro* model for airway cell cultures is the air-liquid interface (ALI)-culture system, which uses transwell-insert membrane structures. However, in current ALI cell culture applications, since there is no practical system design that can seed both sides of transwell membranes, the ALI culture system can not sufficient when examining cell-cell interaction. The tendency of commercially available systems to 3D cell culture systems is also extremely limited.

In the first step of the thesis; the use of transwells currently used in ALI culture systems has been modified by making them more effective and for this purpose, transwell adapters

have been printed from a 3D printer, leak tests have been carried out and epithelial-fibroblast co-cultures have been made by adapting them to the ALI system. Immunocytochemistry and real-time PCR studies were performed on co-culture models and the effectiveness of the models was verified. As a result of the trials, a new product has been developed that transforms it into a 3D co-culture system.

In the second part of the study, biodegradable membranes were produced for epithelial tissue graft formation and application in transwell inserts. For this purpose, nonwoven nanofiber mesh membranes were synthesized by electrospinning method using the polymers poly (L-lactic acid) (PL24, Corbion, intrinsic viscosity=1.5-2.0 dL/g) and poly(e-caprolactone) (PCL12, Corbion, intrinsic viscosity=1.0-1.3 dL/g). After the optimization and characterization studies were carried out, the suitable membranes were integrated into the 3D ALI culture-system and evaluated in cell culture systems. The constructed biodegradable membrane was shown to be sustainable, similar to the barrier structure seen in the physiological environment, and acceptable for application in ALI-culture systems for airway modeling.

Keywords: airway modelling, air-liquid interface, biodegradable membrane, 3D co-culture.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösterici olan, hem akademik hem de sosyal konularda yeni bakış açıları kazanmamı sağlayan, çalışmalarım esnasında anlayış ve sabrıyla beni yüreklendiren değerli danışman hocam **Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN**'a saygı ve sevgilerimi sunar; teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasında FHD-2019-18044 numaralı Hızlı Destek Projesi ile **HÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne ve 219S324 numaralı TUBİTAK 1005 projesi ile maddi destek sağlayan **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TUBİTAK)**'a,

YÖK 100/2000 Doktora Projesi ve 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programı kapsamında çalışmalarına verdiği destek için TUBİTAK **BİDEB** ve **YÖK**'e,

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi, tecrübe ve laboratuvar imkanlarını hiçbir şekilde benden esirgemeyen değerli hocam **Prof. Dr. Halil Murat AYDIN**'a, tez çalışmalarımı yaparken sabır ve hoşgörüsü bana yardımcı olan zamanını esirgemeyen canım arkadaşım **Gülçin G. KARATAŞ**'a ve kendisini tanımaktan mutluluk duyduğum ne zaman soru sorsam hiç tereddüt etmeden cevaplayan ve destek olan sevgili **F. Duygu G. ÇELİK**'e,

Tez çalışmalarım sırasında, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesi sürecinde bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren tez izleme komitemde yer alan değerli hocam **Prof. Dr. İbrahim VARGEL**'e ve doktora tez jürimde bulunan değerli hocalarım **Doç. Dr. Murat DEMİRBİLEK** ve **Doç. Dr. Ebru KILIÇAY**'a,

Çalışmalarım sırasında ihtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan, araştırmalarımız üzerine tartışmaktan ve fikirlerini almaktan keyif aldığım ECRG üyesi laboratuvar arkadaşlarım **Hayriye AKEL BİLGİÇ**, **Seçil SUBAŞI**, **Gizem İMRAK**, **Başak Ezgi SARAÇ**, **Büşra KILIÇ**, **Beyza DOĞAN**, **Berfin Doğa KOÇKAYA**, **Dilara KARAGÜZEL**, **Selcan GENÇ**, **Ali Doruk UZUNKAYA**, **Gökhan ARIK** ve **Murat YOLU**'ya,

Hayatımın her evresinde yanımda olan, varlıklarıyla bana güç veren, öncelikle iyi ve erdemli bir insan olmam gerektiğini, başarının daha sonra geleceğini öğreten kıymetli **AİLEM** ve bilhassa doğduğu günden beri yaşamıma renk ve anlam katan, tüm derdi tasayı unutturan neşe kaynağım canım yeğenim **Gökse ÇAYLAK**'a

En derin teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Solunum Sistemi: Yapısı ve Fonksiyonu	3
2.1.1. Akciğer Ekstraselüler Matriksi.....	6
2.1.2. Havayolu Epitelinin Bariyer Fonksiyonu.....	8
2.1.2.1. Hücre-Hücre İletişimi.....	8
2.1.2.2. Hücre-Hücre Dışı Matriks İletişimi.....	11
2.1.3. Astımda Havayolu Epiteli	11
2.1.3.1. Morfolojik ve Yapısal Değişiklikler	11
2.1.3.2. Fonksiyonel Değişiklikler	12
2.2. Solunum Yolu Hastalıkları-Hücre Dışı Matriks (ECM) İlişkisi	13
2.3. Pulmoner ESM Model Sistemler.....	16
2.4. Pulmoner 3B Hücre Kültür Modelleri.....	17
2.4.1. Skafold bazlı modeller	17
2.4.2. Hava-Sıvı Arayüzü (ALI Kültür Uygulamaları)	18
2.4.3. Sferoidler ve organoidler.....	19
2.4.4. Mikroakışkan modeller	19
2.4.5. Akciğer doku eksplantları	20
2.5. Pulmoner Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler	21
2.5.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Polimerler: PLA ve PCL	25
2.6. Elektroegirme Tekniği.....	26

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültür Modeli için Gerekli Adaptörlerin Çizilmesi	28
3.2. Çizilen Adaptör Modellerin 3B Yazıcıdan Çıkartılması	28
3.3. 24 Kuyucuklu Plaka Kapağının Yeniden Yapılandırılması.....	29
3.4. 3B Modeller Üzerinde Gerçekleştirilen Sızıntı-Kontrol Çalışmaları	30
3.5. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması	31
3.5.1. Akciğer bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B).....	31
3.5.2. Akciğer epitel hücre hattı (A549)	31
3.5.3. Akciğer fibroblast hücre hattı (CCD-16Lu).....	32
3.5.4. Fibroblast Hücre Hattı (L-929)	32
3.5.5. Astımlı İnsan Primer Bronş Epitel Hücresi (AB0665)	32
3.6. 3B Modellerde Gerçekleştirilen Sitotoksikite (Özüt) Analizleri.....	32
3.7. Ko-kültür ve Mono-kültür Çalışmaları	34
3.7.1. Corning Model ile Gerçekleştirilen Ko-kültür Deneyleri.....	34
3.7.2. Yeni 3B Modellerde Gerçekleştirilen Ko-kültür Deneyleri	35
3.7.4. Trans-Epithelial Elektriksel Rezistans (TEER) Ölçümü	40
3.7.5. Transwell Membranların Hematoksin & Eozin Boyama ile Görüntülenmesi	41
3.7.6. Transwell Membranların İmmünohistokimya Analizi ile Görüntülenmesi....	42
3.7.7. Farklılaştırılan Hücre Gruplarında Yer Alan Genlerin İfadesinin	
Belirlenmesi.....	43
3.7.7.1. RNA İzolasyonu	44
3.7.7.2. cDNA Sentezi	45
3.7.7.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR)	45
3.8. Oluşturulan Ko-kültür Modellerinin Stimülasyonu ve Validasyonu	47
3.8.1. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Uyarılan Hücrelerde Mitokondriyel Aktivite ve	
Canlı/Ölü Hücre Tespiti	47
3.8.2. HDM ve Sitokinlerle (IL-4 ve IL-13) Uyarılan Hücrelerde Canlı/Ölü Hücre	
Tespiti	47
3.8.3. Tek Tabaka Hücre Kültür Sisteminde HDM ve Th ₂ Sitokinlerle Uyarılan A549	
Hücrelerinde Sıkı Bağlantıların İmmünohistokimya Analizi ile Tespit Edilmesi.....	70
3.8.4. Transwell Sisteminde HDM ve Th ₂ Sitokinlerle Uyarılan Primer Akciğer	
Epitel Sıkı Bağlantıların İmmünohistokimya Analizi ile Tespit Edilmesi	490

3.9. Biyobozunur Nanofiber Membranların Hazırlanması ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu.....	50
3.9.1. Poli (L-Laktik Asit) (PLLA) Membranların Üretilmesi	50
3.9.2. Poli (e-Kaprolakton) (PCL) Membranların Üretilmesi	51
3.9.3. Elektroëirilmiş PLLA ve PCL Membranların Karakterizasyonu.....	52
3.9.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	52
3.9.3.2. Membranların Kalınlıklarının Tayini	52
3.9.3.3. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi.....	52
3.9.3.4. Kapiler Akış Porometresi ile Gözenek Boyutunun Belirlenmesi.....	53
3.9.3.5. Çekme Testi ile Mekanik Dayanım Tayini	53
3.9.3.6. Elektroëirilmiş PLLA ve PCL Membranların Bozunma Davranışlarının Belirlenmesi	53
3.9.3.7. PLLA ve PCL Membranlarının Sitotoksikite Analizi	54
3.9.4. PLLA ve PCL Membranlarda Hücre Kültürü Deneyleri	55
3.9.4.1. Biyobozunur Transwell İnsert'lerin Hazırlanması.....	55
3.9.4.2. PLLA ve PCL Membranlarda Hücre Proliferasyonu Analizi	56
3.9.4.3. PLLA ve PCL Membranlarda Ko-kültür ve Mono-kültür Çalışmaları..	57
3.9.4.3.1. PLLA ve PCL membranlarda mono-kültür deneyi.....	57
3.9.4.3.2. PLLA ve PCL membranlarda ko-kültür deneyi.....	79
3.9.4.4. PLLA ve PCL Membranlarda TEER Ölçümleri	58
3.9.4.5. PLLA ve PCL Membranların Hematoksilin&Eozin Boyama ile Görüntülenmesi	58
3.9.4.6. PLLA ve PCL Membranların İmmünohistokimyasal Analiz ile Görüntülenmesi	59
3.10. İstatistiksel Analiz	59
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	60
4.1. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültür Modeli için Gerekli Adaptörlerin Çizilmesi	61
4.2. Çizilen Adaptör Modellerin 3B Yazıcıdan Çıkarılması.....	63
4.3. 24 Kuyucuklu Plaka Kapağının Yeniden Yapılandırılması	70
4.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hatlarının Pasajlanması	71
4.5. 3B Modellerde Gerçekleştirilen Sitotoksikite (Özüt) Analizleri	71
4.5.1. Ko-kültür Deneyleri	72

4.5.2. Hava-Sıvı Arayüzü (ALI) Kültür Sistemine göre Farklılaştırılan Hücrelerde TEER Ölçümleri	76
4.5.3 Transwell Membranların Hematoksilen & Eozin Boyama ile Görüntülenmesi	79
4.5.4. Transwell Membranların İmmünohistokimya Analizi ile Görüntülenmesi....	79
4.5.5. Farklılaştırılan Hücre Gruplarında Yer Alan Genlerin İfadesinin Belirlenmesi.....	83
4.6. Oluşturulan Ko-kültür Modellerinin Stimülasyonu ve Validasyonu	84
4.6.1. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Uyarılan Hücrelerde Mitokondriyel Aktivite ve Canlı/Ölü Hücre Tespiti	84
4.6.2. HDM ve Sitokinlerle (IL-4 ve IL-13) Uyarılan Hücrelerde Canlı/Ölü Hücre Tespiti	86
4.6.3. HDM+IL-4+IL-13 ile Uyarılan Hücrelerde Sıkı Bağlantıların İmmünohistokimya Analizi ile Tespit Edilmesi.....	87
4.6.4. HDM ve Sitokinlerle (IL-4+IL-13) Uyarılan Primer Hücrelerin Validasyonu ve TEER Analizi.....	88
4.6.5. HDM+IL-4+IL-13 ile Uyarılan Primer Hücrelerde Sıkı Bağlantıların İmmünohistokimya Analizi ile Tespit Edilmesi.....	89
4.7. Transwell Membranlar Üzerinde Ko-kültüre Edilen Epitel Hücrelerinde SEM Analizi	90
4.8. Biyobozunur Nanofiber Membranların Hazırlanması ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu	92
4.8.1. Poli (L-Laktik Asit) (PLLA) Membranların Üretilmesi ve SEM Analizi ile Morfolojilerinin Belirlenmesi.....	93
4.8.2. Poli (ε-Kaprolakton) (PCL) Membranların Üretilmesi ve SEM Analizi ile Morfolojilerinin Belirlenmesi.....	98
4.8.3. PLLA ve PCL Membranların Kalınlıklarının Tayini	101
4.8.4. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi	102
4.8.5. Kapiler Akış Porometresi ile Gözenek Boyutunun Belirlenmesi	105
4.8.6. Çekme Testi ile Mekanik Dayanım Tayini.....	106
4.8.7. Elektroeğirilmiş PLLA ve PCL Membranların Bozunma Davranışlarının Belirlenmesi.....	110
4.8.8. PLLA ve PCL Membranlarının Sitotoksikite Analizi.....	112

4.9. PLLA ve PCL Membranlarda Hücre Kültürü Deneyleri	113
4.9.1. Biyobozunur Transwell İnsert'lerin Hazırlanması.....	113
4.9.2 PLLA ve PCL Membranlarda Hücre Proliferasyonu Analizi	114
4.9.3. PLLA ve PCL membranlarda mono-kültür ve ko-kültür deneyleri	116
4.9.4. PLLA ve PCL Membranlarına Ekilen Bronş Epitel Hücrelerin TEER Ölçümleri	116
4.9.5. PLLA ve PCL Membranlarına Ekilen Bronş Epitel Hücrelerin Hematoksilen&Eozin Boyama ile Görüntülenmesi.....	117
4.9.6. PLLA ve PCL Membranlarına Ekilen Bronş Epitel Hücrelerin İmmünohistokimyasal Analiz ile Görüntülenmesi	118
4.9.7. PLLA ve PCL Membranlar Üzerine Ekilen Epitel Hücrelerinde SEM Analizi 120	
4.9.8. HDM ve Sitokinlerle (IL-4+IL-13) Uyarılan PLLA ve PCL Membranlara Ekili Hücrelerde TEER Analizi	120
5. YORUM.....	123
6. KAYNAKLAR.....	134

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Solunum sisteminin şematik gösterimi [1].	4
Şekil 2.2. İnsan akciğerinin baskın hücre tiplerinin basitleştirilmiş modeli [5].	5
Şekil 2.3. Ekstraselüler matriks bileşenlerinin gruplandırılması [14].	6
Şekil 2.4. Epitel hücresinin bazal kısmının şematik gösterimi [15].	7
Şekil 2.5. Normal bir hava yolundan (solda) ve aktif astımlı bir hastadan (sağda) alınan bir bronş biyopsisinin konfokal immünofloresan mikroskopik görüntüleri. Düzlemsel (üst) ve kesitsel (XZ, alt) görüntülerdir [43].	13
Şekil 2.6. Havayolu epitel hücrelerinin ALI kültür yöntemi ile farklılaştırılması [92]	Hata!
Yer işareti tanımlanmamış....	18
Şekil 2.7. Konvansiyonel bir elektroegirme düzeneğinin şematik gösterimi	27
Şekil 3.1. Adaptör modelin 24 kuyucuklu plakada yerleşiminin gösterilmesi	28
Şekil 3.2. Modellerin 3B yazıcıdan çıkartılması işlemlerinde kullanılan SLA yazıcı (sol) ve fotopolimer sıvı reçine (sağ)	29
Şekil 3.3. 24 kuyucuklu plakaya getirilen ek parçanın ölçülerinin belirlenmesi	30
Şekil 3.4. Baskısı çıkartılan adaptör modeller üzerinde sızıntı-kontrol çalışmaları: besiyeri ilavesinden sonra sızıntı kontrolünün başlatılması	30
Şekil 3.5. Corning sistemi ile gerçekleştirilen ko-kültür deneyinin yapılışı	35
Şekil 3.6. Yeni 3B adaptör modelin kurulum aşamaları. (a) 6,5 mm çapına sahip orijinal transwell insert (b) Transwell insert'in ters çevrilmiş hali (c) b'de gösterilen transwell'in içine geçecek olan ve membranın ters yüzeyine ekim sırasında alt kısma besiyeri geçişini önleyecek sıkıştırıcı aparat (alt adaptör) (d) 1-4 mm ölçülerine sahip O-ring sızdırmazlık elemanı (e) O-ring'in c'deki alt adaptör girintisine takılmış hali (f) Transwell membranın ters yüzeyine hücre ekimi yapıldıktan sonra hücre yapışması ve inkübasyonu sırasında besiyeri haznesini oluşturacak üst adaptör (g) Alt-üst adaptör ve transwell'in bir arada kullanıldığı transwell-adaptör sisteminin birleştirilmiş hali	36
Şekil 3.7. Yeni 3B kültür sistemi ile gerçekleştirilen ko-kültür deneyinin aşamaları. (1: Sistemdeki tüm unsurların deney öncesi hazırlanması (24 kuyucuklu plaka, alt adaptör, üst adaptör, transwell-insert) 2: Plaka içerisine yerleştirilen alt adaptörün gösterilmesi. 3 ve 4: Alt adaptör üzerine ters çevrilerek yerleştirilen transwell insert görüntüleri. 5 ve 6: Transwell insert üzerine geçirilmiş üst adaptör görüntüleri. 7 ve 8: 24 kuyucuklu plaka etrafına yerleştirilen yeni kapak çerçevesi. 9 ve 10: 24	

kuyucuklu plaka kapağının kapatılması. 11: Model üzerinden hücre ekiminin gerçekleştirilmesi. 12: Ekim yapıldıktan sonra plaka kapağının kapatılması. 13: Plakanın inkübatöre yerleştirilmesi. 14: 24 saat sonra plakanın inkübatörden alınıp üzerindeki besiyerin çekilmesi. 15: Üst adaptörün sistemden çıkartılması. 16 ve 17: Transwell'in alt adaptörden ayrılması. 18: Transwell-insert'in pens yardımıyla tutulup 24 kuyucuklu plakaya yerleştirilmesi. 19: Plakanın alt ve üst haznesine (apikal-bazal) besiyeri ilave edilmesi. 20 ve 21: Kapağın kapatılması ve yeniden inkübatöre yerleştirilmesi).....	39
Şekil 3.8. TEER ölçüm cihazı ve yöntemi	41
Şekil 3.9. PZR döngü koşulları	47
Şekil 3.10. PLLA ve PCL membranlarında besiyeri ve Ringer çözeltisi ortamında degradasyonun başlatılması.....	54
Şekil 3.11. Biyobozunur membranların transwellere yapıştırılması	56
Şekil 3.12. Kwik-sil ile yapıştırıldıktan sonra transwell-membranlar üzerinde mono-kültür ve ko-kültür deneylerinin şematik gösterimi [182].	58
Şekil 4.1. Solid Works programı ile çizilen adaptör modelin bileşenleri. (Model-1) (1) Orijinal transwell, (2) Transwell'in ters çevrilmiş hali, (3) İki numarada gösterilen transwell'in içine geçecek; membranın ters yüzeyine ekim sırasında sızıntı yapmayan, zemine paralel oturan parça (alt adaptör), (4) Ters ekim sırasında transwell'e geçirilen ve transwell'deki üçgen alanlara kadar aşağıya ilerletilecek parça (üst adaptör), (5) Alt-üst adaptör ve transwell montajının dıştan görünümü (2, 3 ve 4 numaralı resimlerin montajı), (6) Alt-üst adaptör ve transwell montajının kesit görünümü.	61
Şekil 4.2. Adaptör model çizimi-2. Alt adaptör (a), Modelin montajı (b).	62
Şekil 4.3. Adaptör model çizimi-3	62
Şekil 4.4. Adaptör model çizimi-4	63
Şekil 4.5. Adaptör Model Çizimi-1'in 3B yazıcıdan çıkartılmış hali	64
Şekil 4.6. Adaptör Model Çizimi-2'nin 3B yazıcıdan çıkartılmış hali	64
Şekil 4.7. Adaptör Model Çizimi-3'ün 3B yazıcıdan çıkartılmış hali	65
Şekil 4.8. Modellerin zamana bağlı sızıntı kontrolü. A: 30 dk sonra B: 1,5 saat sonra C: 6 saat sonra D: 14 saat sonra.	66
Şekil 4.9. Adaptör Model Çizimi-4'ün 3B yazıcıdan çıkartılmış hali (A). Model-4'ün montajı (B).	66

Şekil 4.10. Adaptör Model Çizimi-5'in 3B yazıcıdan çıkartılmış hali (A). Model-5'in montajı (B).....	67
Şekil 4.11. Adaptör Model-6'nın 3B yazıcıdan çıkartılmış hali (A) Model-6'nın montajı (B).....	67
Şekil 4.12. Adaptör Model-7'nin 3B yazıcıdan çıkartılmış hali.....	68
Şekil 4.13. Adaptör Model-7 üzerinde gerçekleştirilen sızıntı-kontrol çalışmaları (A); Adaptör Model-7'nin 24 saat sonra parçalanma durumu okla belirtilmiştir (B). ...	68
Şekil 4.14. Adaptör Model-8'in 3B yazıcıdan çıkartılmış hali.....	69
Şekil 4.15. Tasarımı gerçekleştirilen tüm modellerin akış şeması ile gösterimi	69
Şekil 4.16. 24 kuyucuklu plakaya getirilen ek parçanın Solid Works ile çizimi.....	70
Şekil 4.17. 24 kuyucuklu plakaya getirilen ek parçanın 3 boyutlu yazıcıdan çıkartılması	70
Şekil 4.18. Deneylerde kullanılan hücre hatları ve primer hücreler A: bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B), B: fibroblast hücre hattı (CCD-16Lu), C: akciğer epitel hücre hattı (A-549), D: fibroblast hücre hattı (L-929), E: astımlı primer bronş epitel hücre (A, B, C, D: 10X; E: 20X büyütmelelerdir).....	71
Şekil 4.19. Yeni adaptör modelde (Medikal Reçine) özüt (sitotoksiste) analizi	72
Şekil 4.20 Astımlı primer bronş epitel hücrelerinin ko-kültür ve mono-kültür koşullarında transwell membranda çoğaltılması	73
Şekil 4.21 Astımlı primer bronş epitel hücrelerinin ko-kültür ve mono-kültür koşullarında transwell membranda farklılaştırılması	75
Şekil 4.22. Transwell membranının altına ekilen (A) ve 4 saat sonra ters çevrilen (B) fibroblast hücrelerinin membran üstünden faz kontrast mikroskop ile görüntülenmesi (C) (siyah oklar: fibroblast hücrelerini, kırmızı oklar membran porlarını göstermektedir).	75
Şekil 4.23. Corning (A) ve transwell adaptör (B) model sistemlerine göre ekilen fibroblast hücrelerinin 3 saat sonra ters çevrildikten sonra membrana tutunmayan hücrelerin görüntülenmesi.....	75
Şekil 4.24. Epitel (BEAS-2B) ve fibroblast (CCD-16Lu) hücreleri ile gerçekleştirilen 3B kültür modellerinde TEER sonuçları	76
Şekil 4.25. Epitel (A549) ve fibroblast (CCD-16Lu) hücreleri ile gerçekleştirilen 3B kültür modellerinde TEER sonuçları	78
Şekil 4.26. Transwell-adaptör modeli kullanılarak farklılaştırılan epitel hücrelerinde H&E boyama (A) yatay kesit, (B) dikey kesit.....	79

Şekil 4.27. Farklılaştırılan BEAS-2B epitel hücrelerinin 21.gün ZO-1 görüntüleri. (A, B ve C: ko-kültür ekim yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. B` ve C`: B ve C`nin yüksek büyütme görüntüleridir).	79
Şekil 4.28. Farklılaştırılan BEAS-2B epitel hücrelerinin 21.gün β -Tubulin görüntüleri. (A, B ve C: ko-kültür ekim yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. B` ve C`: B ve C`nin yüksek büyütme görüntüleridir).	80
Şekil 4.29. ALI kültür yöntemi ile Transwell-adaptör modeli kullanılarak A549-fibroblast ko-kültür`ün 21.gün ZO-1 görüntüleri. (A: DAPI, B: ZO-1 ve C: Merge. B` ve C`: B ve C`nin yüksek büyütme görüntüleridir).	81
Şekil 4.30. ALI kültür yöntemi ile Transwell-adaptör modeli kullanılarak A549-fibroblast ko-kültür`ün 21.gün $\beta$ -Tubulin görüntüleri. (A: DAPI, B: $\beta$ -Tubulin ve C: Merge. B` ve C`: B ve C`nin yüksek büyütme görüntüleridir).	82
Şekil 4.31. Farklılaştırılmış astımlı primer epitel hücrelerinin 21.gün ZO-1 ve β -Tubulin proteinlerinin floresan boyama görüntüleri. (Çekirdek boyaması (mavi), ZO-1 (yeşil), β -Tubulin (kırmızı)).	83
Şekil 4.32. Transwell adaptör kullanılarak ko-kültüre edilen A549 epitel hücrelerde A: ZO-1(TJP1) ve B: E-kaderin genlerinin mono-kültür gruplarla karşılaştırılarak ifadelerinin belirlenmesi.....	84
Şekil 4.35. HDM alerjisi ile 24 saat uyarılan bronş epitel hücrelerinde MTT testi	85
Şekil 4.36. Bronş epitel hücrelerinin artan konsantrasyonda HDM ile 24 saat uyarımı sonrası canlı (yeşil)/ ölü (kırmızı) hücre boyama görüntüleri (20X, bar 125 μ m)..	85
Şekil 4.37. Bronş epitel hücrelerinin artan konsantrasyonlarda HDM+IL4+IL13 ile 24 saat uyarımı sonrası canlı (yeşil)/ ölü (kırmızı) hücre boyama görüntüleri (20X, bar 125 μ m).	86
Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlarda HDM+IL-4+IL-13 ile uyarılan epitel hücrelerde sıkı bağlantıların floresan mikroskobu ile görüntülenmesi (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: ZO-1 proteini (yeşil), C: A ve B resimlerinin karşılaştırılmış görüntüsü (Merge), bar 79 μ m).	87
Şekil 4.39. Seçilen 100 ug/ml HDM+IL-4+IL-13 konsantrasyonunun epitel hücrelerde sıkı bağlantı yapılarını bozduğunun yakından gösterilmesi (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: ZO-1 boyaması (yeşil), C: Karşılaştırılmış görüntü (Merge).	88
Şekil 4.40. 100 ug/ml HDM+IL-4+IL-13 konsantrasyonunun epitel hücrelerde TEER ölçümü	89

Şekil 4.41. Farklılaştırılarak uyarılmış (alt), uyarılmamış (üst) astımlı primer epitel hücrelerinin 21.gün ZO-1 görüntüleri. (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: ZO-1 boyaması (yeşil), C: Çakıştırılmış görüntü (Merge) D: Yüksek büyütme görüntüleridir).	89
Şekil 4.42. Transwell-adaptör kullanılarak ko-kültüre edilen epitel-fibroblast hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmesi	90
Şekil 4.43. Transwell membran üzerinde ko-kültüre edilen epitel hücrelerinin 7.günde taramalı elektron mikroskobunda görüntülenmesi	91
Şekil 4.44. Transwell membranlara ekilen epitel-fibroblast ko-kültür çalışmasında membranın alt kısmının kesitsel görüntüsü. Fibroblast hücrelerinin 7.günde taramalı elektron mikroskobunda görüntülenmesi.....	92
Şekil 4.45. %4 PLLA-Kloroform çözeltisiyle elde edilen fiberlerin ışık mikroskobu görüntüleri (20X). A: 0,4 mL/sa akış hızı ve 10 cm'lik toplama mesafesi B: 1 mL/sa akış hızı ve 10 cm'lik toplama mesafesi C: 1mL/sa akış hızı ve 15 cm'lik toplama mesafesi parametrelerine ait görüntülerdir. Oklar, boncuk yapılarını göstermektedir.	93
Şekil 4.46. PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı parametresinin fiber oluşumuna etkisi.....	94
Şekil 4.47. PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı (0,4 mL/sa) parametresinin fiber çapı dağılımına etkisi	95
Şekil 4.48. PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı (1 mL/sa) parametresinin fiber çapı dağılımına etkisi	95
Şekil 4.49. PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı ve uçuş mesafesi parametrelerinin fiber çapı dağılımına etkisi	97
Şekil 4.50. Optimize edilen PLLA membranlarına ait fiber çapı dağılımı.....	98
Şekil 4.51. Elektroeğirilmiş PCL membranlarına ait SEM görüntüleri (Koşul-1) 2000X büyütme (sol); 10000X büyütme (sağ)	99
Şekil 4.52. Elektroeğirilmiş PCL membranlarına ait SEM görüntüleri (Koşul-2) 2000X büyütme (sol); 10000X büyütme (sağ)	99
Şekil 4.53. Optimize edilen PCL membranlarına ait fiber çapı dağılımı	100
Şekil 4.54. Elektroeğirme sistemiyle üretilen PLLA (sol) ve PCL (sağ) nanofiber membranların toplanması	102
Şekil 4.55. Elektroeğirilmiş PLLA membranlara ait FTIR spektrumu. PLLA polimer (üst); PLLA membran (alt)	102

Şekil 4.56. Elektroeğirilmiş PCL membranlara ait FTIR spektrumu. PCL polimer (üst); PCL membran (alt).....	103
Şekil 4.57. PLLA membranına ait gözenek boyut dağılımı sonuçları	105
Şekil 4.58. PCL membranına ait gözenek boyut dağılımı sonuçları.....	106
Şekil 4.59. Elektroeğirilmiş PLLA membranların çekme testi ile mekanik dayanımlarının belirlenmesi	107
Şekil 4.60. Elektroeğirilmiş PCL membranların çekme testi ile mekanik dayanımlarının belirlenmesi	107
Şekil 4.61. PLLA membranlarına uygulanan Çekme Testi ve tam kopma anının gösterilmesi	109
Şekil 4.62. PCL membranlarına uygulanan Çekme Testi ve tam kopma anının gösterilmesi	109
Şekil 4.63. PLLA membranlarında enzimatik bozunmanın mg kütle kaybı cinsinden ifadesi	111
Şekil 4.64. PLLA ve PCL membranlarının besiyeri ve Ringer çözeltisi ortamında bozunma profillerinin mg kütle kaybı cinsinden ifadesi (deney statik koşullarda 6 ay boyunca sürdürülmüştür).....	112
Şekil 4.65. PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen sitotoksosite analizi	113
Şekil 4.66. CyQuant Hücre Proliferasyon kit protokolüne göre gerçekleştirilen DNA standart eğrisi	115
Şekil 4.67. PLLA ve PCL membranlara ait hücre proliferasyon grafiği.....	115
Şekil 4.68. PLLA ve PCL membranlarda ko-kültür deneyinin yapılışı (ters ekim).....	116
Şekil 4.69. PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen TEER analizi sonuçları	117
Şekil 4.70. PLLA membranlarına ekilen epitel hücrelerinin hematoksilin&eozen boyama ile görüntülenmesi. Hücre çekirdeği: mor; sitoplazma: pembe. (Oklar PLLA membranını göstermektedir).	118
Şekil 4.71. PCL membranlarına ekilen epitel hücrelerinin hematoksilin&eozen boyama ile görüntülenmesi Hücre çekirdeği: mor; sitoplazma: pembe. (Oklar PCL membranını göstermektedir).	118
Şekil 4.72. PLLA membranlarına ekilen epitel hücrelerde β -Tubulin proteininin immünohistokimya analizi ile görüntülenmesi. (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: β - Tubulin boyama (kırmızı), C: A ve B'nin karşılaştırılmış görüntüsü). (B' ve C': B ve C'nin yüksek büyütme görüntüleridir).....	119

Şekil 4.73. PCL membranlarına ekilen epitel hücrelerde β -Tubulin proteininin immünohistokimya analizi ile görüntülenmesi. (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: β -Tubulin boyama (kırmızı), C: A ve B'nin karşılaştırılmış görüntüsü (B ve C: B ve C'nin yüksek büyütme görüntüleridir).	119
Şekil 4.74. PLLA ve PCL membranlar üzerinde kokültüre edilen epitel hücrelerinin SEM görüntüleri (A: PLLA membran-1000X büyütme; B: PCL membran 2000X büyütme).	120
Şekil 4.75. PLLA membranlarda kültüre edilen A549 epitel hücrelerinin 14.gün uyarımı ve TEER ölçümleri	121
Şekil 4.76. PCL membranlarda kültüre edilen A549 epitel hücrelerinin 14.gün uyarımı ve TEER ölçümleri	121



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Akciğer araştırmalarında kullanılan 3B modellerin avantaj ve dezavantajları	20
Çizelge 2.2. Pulmoner araştırmalarda kullanılan doğal biyomalzemeler ve özellikleri..	22
Çizelge 2.3. Pulmoner araştırmalarda kullanılan sentetik biyomalzemeler ve özellikleri	23
Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre hatları ve besiyerleri	31
Çizelge 3.2. PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere tasarlanan primer dizileri	46
Çizelge 3.3. PZR reaksiyon karışımı.....	46
Çizelge 3.4. %4 (a/a) PLLA-Kloroform çözeltisi için belirlenen sistem parametreleri..	51
Çizelge 3.5. %4 (a/a) PLLA-(DCM/DMF) çözeltisi için belirlenen sistem parametreleri	51
Çizelge 4.1 PLLA membranlarının hazırlanmasında çözücü parametrelerinin belirlenmesi	93
Çizelge 4.2. Optimize edilen PLLA ve PCL membranlarının karakterize edilmiş değerleri	101
Çizelge 4.3. FTIR spektrumunda PLLA polimerine ilişkin dalga boyu ve bağ yapıları	103
Çizelge 4.4. FTIR spektrumunda PCL polimerine ilişkin dalga boyu ve bağ yapıları .	104

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Ω	Ohm
&	Ve
U	Ünite
dk	Dakika
dL	Desilitre
kV	Kilovolt
mM	Milimolar
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
μm	Mikrometre
MPa	Megapaskal
N	Newton
GPa	Gigapaskal
pH	Hidrojen gücü
sa	Saat
°C	Derece santigrat
CO ₂	Karbondiyoksit
cm ²	Santimetre kare
Au/Pd	Altın/Paladyum

Ex/Em	Uyarma/emisyon
Et/Br	Etidyum/Bromür

Kısaltmalar

ALI	Hava-sıvı Arayüzü
APC	Antigen-presenting cell
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BSA	Bovin Serum Albumin
BEGM	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium
cDNA	Komplementer DNA
CDH1	Kaderin-1 geni
DAPI	4',6-Diamidin-2-Fenilindol
DC	Doğru Akım
DCM	Diklorometan
DMF	Dimetilformamid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ESM	Ekstraselüler matriks
FBS	Fetal Bovin Serum
FTIR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrometresi
H&E	Hematoksilen&Eozin
HDM	Ev Tozu Akarı
IFN	İnterferon

IL	İnterlökin
IPF	İdiyopatik Pulmoner Fibrozis
JAM	Birleşme Adezyon Molekülü
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
MUC5AC	Musin 5AC
OCT	Optimum Kesme Sıcaklığı
PBS	Fosfat Tamponlu Salın
PCL	Polikaprolakton
PET	Polietilen Tereftalat
PFA	Paraformaldehid
PLLA	Poli-L-Laktik asit
PTFE	Politetrafluroetilen
PPIA	Peptidilprolil İzomeraz-A
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNaz	Ribonükleaz
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SLA	Selective Laser Additive
TEER	Transepitelyal Elektriksel Rezistans
THF	Tetrahidrofuran
TJP1	Tight Junction Protein-1
Th ₂	Yardımcı T hücresi
TS EN ISO	Türk Standartları Enstitüsü Uluslararası Standart Organizasyonu
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Solunum sistemi, açık bir sistem olması nedeniyle solunan hava içerisindeki farklı boyut ve çeşitteki partiküllere, uçucu kimyasallara, alerjenlere ve patojen mikroorganizmalara sık sık maruz kalmaktadır. Solunum sistemini kaplayan havayolu epitel hücreleri ilk savunma ve cevabı oluşturan hücre grubunu oluşturur. Maruz kalınan maddenin yapısı ve süresi kadar maruz kalan kişinin genetik alt yapısı da oluşan harabiyeti ve cevapta önemlidir. Epitel hücrelerde çevresel ajanlarla karşılaşma sonucunda sıklıkla, epiteller arasındaki sıkı bağlantı moleküllerinin hasar görerek epitellerin birbirinden ayrılması ve epitel hücre dökülmesi görülmektedir. Bu durumda havayolu epiteli, bariyer bütünlüğünü korumak ve bozulan epitel fonksiyonunu düzeltmek için onarım işlemini başlatır, ancak bu süreçler tam olarak aydınlatılamamıştır.

Hava iletiminin düzgün bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan akciğerler, anatomik ve fizyolojik olarak farklı birçok hücre tipini barındıran kompleks bir yapıdan oluşmaktadır. Bu kompleks yapının anlaşılması ve ortaya çıkan akciğer hastalıklarının anlaşılması için model sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut çalışmalar sıklıkla iki boyutlu (2B) hücre kültür plakaları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalara dayanmaktadır. 2B kültür sistemleri hücre-hücre etkileşiminin temelleri hakkında fikir edinmesi açısından gerekli olsa da hücrelerin kendine özgü üç boyutlu (3B) yapısını yansıtmaktan yoksun oldukları için *in vivo* mikroçevrenin zayıf bir temsili olarak kalmaktadır.

Araştırmacılar tarafından 3B kültür sistemleri kullanılarak canlı sistemlerini yansıtan mikroçevrenin elde edilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca bu sistemler ile hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimlerini taklit etmek, hücre davranışlarının anlaşılmasında önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, epitel hücreleriyle ko-kültüre edilen fibroblast hücrelerin, epitel hücre tabakası içindeki bariyer işlevini güçlendirdiğini göstermiştir.

Tez çalışması iki kısımdan oluşmaktadır. İlk kısım, akciğer araştırmalarında sıklıkla kullanılan hava-sıvı arayüzü (ALI) transwell'leri kullanılarak kültüre edilen havayolu epitel hücrelerinin daha fonksiyonel bir şekilde büyütülüp farklılaştırılması için mevcut uygun model sistemlerin geliştirilmesi üzerinedir. Bu amaçla ALI kültür transwell'lerinin hem alt hem de üst kısmına hücre ekilebilmesi için yeni transwell-adaptör modellerin tasarlanması amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ikinci kısmını ise epitel doku greft gelişiminde kullanılacak özel transwell membran sistemlerinin geliştirilmesi oluşturmaktadır. Sentetik olarak üretilen

hücre kültürü matrisleri arasında; polietilen glikol (PEG), polietilen tereftalat (PET), politetrafluoro etilen (PTFE) gibi polimer türevli membranlar yer almaktadır. Bu polimerler tipik olarak biyolojik ortamda parçalanabilir özellikte değildir. Aynı zamanda hücreler için doğru sinyalleri sağlayamadıkları ve bu nedenle hücre adezyonlarının düşük olması bakımından da biyouyumlu değildirler. Dolayısıyla günümüzde ticari olarak satın alınan transweller mikro-gözenekli membran yapılarını kullanmakla birlikte bu ürünlerin akciğer doku grefti olarak kullanılmaları söz konusu değildir.

Bu amaçla elektroğirme tekniği kullanılarak poli (L-laktik asit) (PLLA) ve poli(e-kaprolakton)'dan (PCL) oluşan nanofiber ağ yapısında membranlar sentezlenmiştir. Böylece mevcut transwellerin bazal kısmında kullanılan biyobozunur özellikte olmayan membranların yerine biyobozunur özellikte membranlar tasarlanarak yeni transfer membran sistemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Elde edilen biyobozunur membranların akciğerle ilişkili çeşitli rahatsızlıklarda, doku yaralanmalarında bir doku grefti olarak uygulanabilecek aşamaya getirilmesi için çeşitli karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Geliştirilecek olan biyobozunur transwell membranlar sayesinde trakeal defektler, bronşial yırtılma, bazı cerrahi pulmoner parça alımı gibi çok çeşitli hava yolu hastalıklarında kullanılarak hasarlı bölgeye nakledilmesi anlamında değerli birer araç olarak yerini alması öngörülmektedir.

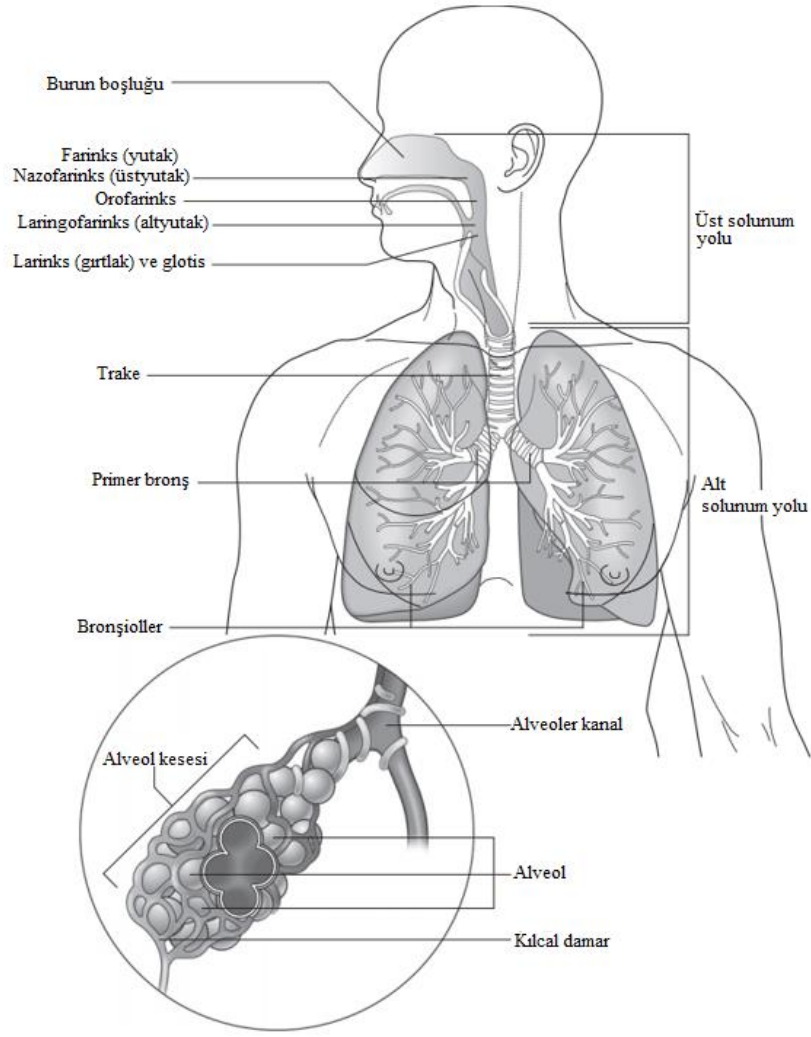
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Sistemi: Yapısı ve Fonksiyonu

Solunum, havanın akciğerlere taşınması (inspirasyon) ve kullanılmış havanın (ekspirasyon) aynı geçiş yoluyla akciğerlerden dışarı atılmasıdır. Burundan akciğerlere kadar olan solunum sistemi üst ve alt solunum yolu olarak ikiye ayrılır. Üst solunum sistemi burun, farinks ve ilişkili yapıları içerirken alt solunum sistemi soluk borusu (trake), bronşlar ve akciğerleri içerir [1, 2] (Şekil 2.1).

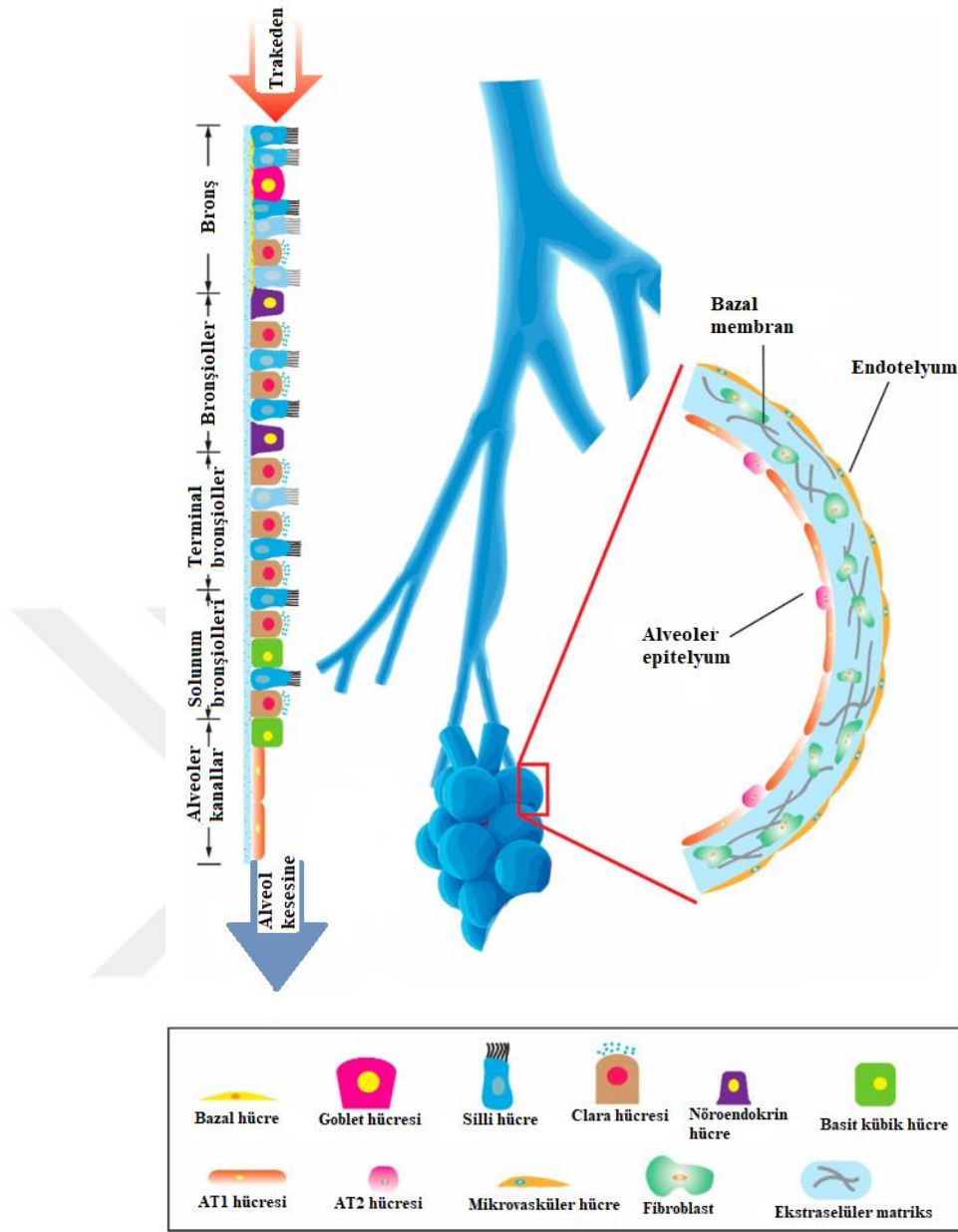
Solunum sisteminin havayı akciğerlere taşıyan ve gaz alışverişi olmayan kısmı burun, yutak, soluk borusu, bronşlar ve bunların dallarını içeren 'iletken' kısmı oluşturur. Kalan kısım 'solunum' olarak adlandırılan ve kan dolaşımı yoluyla oksijen ve karbondioksit gazlarının yer değişimini sağlayan solunum bronşiyollerini, alveolar kanalları, alveolar keseleri ve alveolleri içerir [3]. Bununla birlikte, solunum bronşiyolleri ve alveolar kanallar hem iletim hem de solunum fonksiyonlarını yerine getirir ve bu nedenle geçiş hava yolları olarak adlandırılır. Bronşlar ve dalları, ilişkili kan ve lenf damarları, sinirler, plevral membranlar ve interlobüler septa ile akciğerin parankimal olmayan kısmını oluşturur. Gaz değişiminin gerçekleştiği alveoller, toplam akciğer hacminin yaklaşık %87'sini oluşturan parankimi oluşturur [1, 4]. Solunum yolu, bariyer görevi de gören epitel hücreler ile kaplıdır ve bu hücrelerin tipleri solunum yolundaki konumuna göre değişmektedir. Şekil 2.2, akciğerdeki konumlarına göre çeşitli epitelyal hücre tiplerinin dağılımını gösteren hava yolunun basitleştirilmiş bir versiyonunu göstermektedir [5]. Akciğerler, epitel hücrelerin dışında bağışıklık sistemi hücreleri, düz kas, progenitör hücreler ve karmaşık bir akciğer vasküler sistemi de dahil olmak üzere birçok ek hücre türü içermektedir [4, 6, 7].

Solunum yolunu kaplayan epitel hücreleri, silli, silindirik, nöroendokrin, goblet, club (eski adıyla Clara hücresi) ve bazal hücrelerle dolu yalancı çok tabakalı bir yapıdır ve trake ve bronşlardaki havayollarının tüm yüzeyi boyunca bir süreklilik oluşturur. Üst solunum yolundaki epitel tabakada, mukozal beze sahip çok sayıda seröz ve goblet hücre görülmektedir. Sağlıklı bir kişinin trakesindeki epitel yüksekliği, bazal membrandan ölçüldüğünde kabaca 25–40 µm aralığındadır ve bu yükseklik akciğerin derinliklerine indikçe giderek inceler ve düzleşir [5, 8] (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Solunum sisteminin şematik gösterimi [1].

Daha küçük bronşiollerde hava yolu epitelinin hücresel popülasyonu; goblet hücrelerinin yerini nöroendokrin hücre odaklarına sahip Club hücreleri alacak şekilde ve epitel tabaka giderek daha az siliyer hücre ile küboidal hale gelecek şekilde değişir. Terminal bronşiyoller, alveoller içeren ve gaz değişiminin meydana geldiği ince duvarlı zarlardan oluşan alveolar keselerde sonlanan solunum bronşiyollerini oluşturmak üzere bölünür. Akciğerin dallanma mimarisinde bu noktada solunum bölgesi başlar [8].



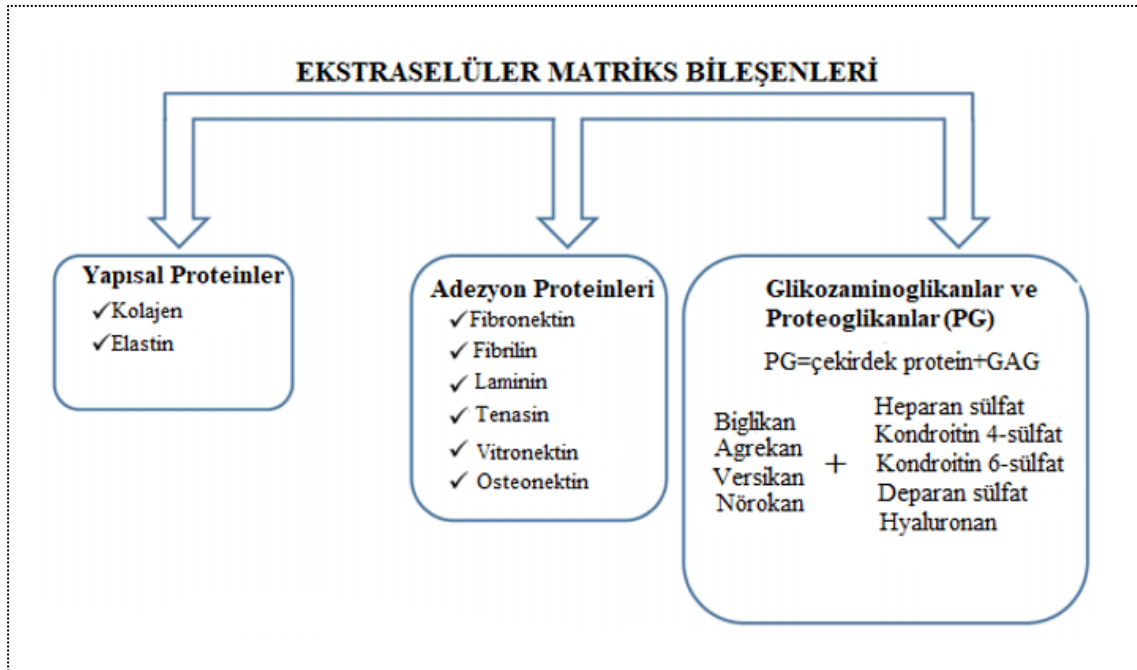
Şekil 2.2. İnsan akciğerinin baskın hücre tiplerinin basitleştirilmiş modeli [5].

Alveoller ince bir bazal membran tarafından desteklenir ve bir tarafta Alveolar tip 1 (AT1) ve Alveolar tip 2 (AT2) hücreleri, diğer tarafta da mikrovasküler endotel ile kaplı hücreler yer alır (Şekil 2.2). AT1 hücreleri son derece ince ve yassıdır ve öncelikle gaz alışverişinde yer alır; öte yandan akciğer parankimindeki AT2 hücrelerinin ise birincil işlevi hava-sıvı ara yüzeyinde yüzey gerilimini azaltan yüzey aktif madde (surfaktan) üretimidir [9]. Ortalama bir yetişkin insan akciğerinde 300 milyona yakın alveol vardır ve alveolar membranın yüzey alanı etkin gaz alışverişi için 50–100 m²'dir [10]. Bir alveolün ortalama çapı, inhalasyon sırasındaki hafif bir artışla yaklaşık 200 µm'dir ve her

alveolün etrafı da yüzey alanının yaklaşık %70'ini kaplayan bir kılcal damar ağı ile sarılıdır [1, 11].

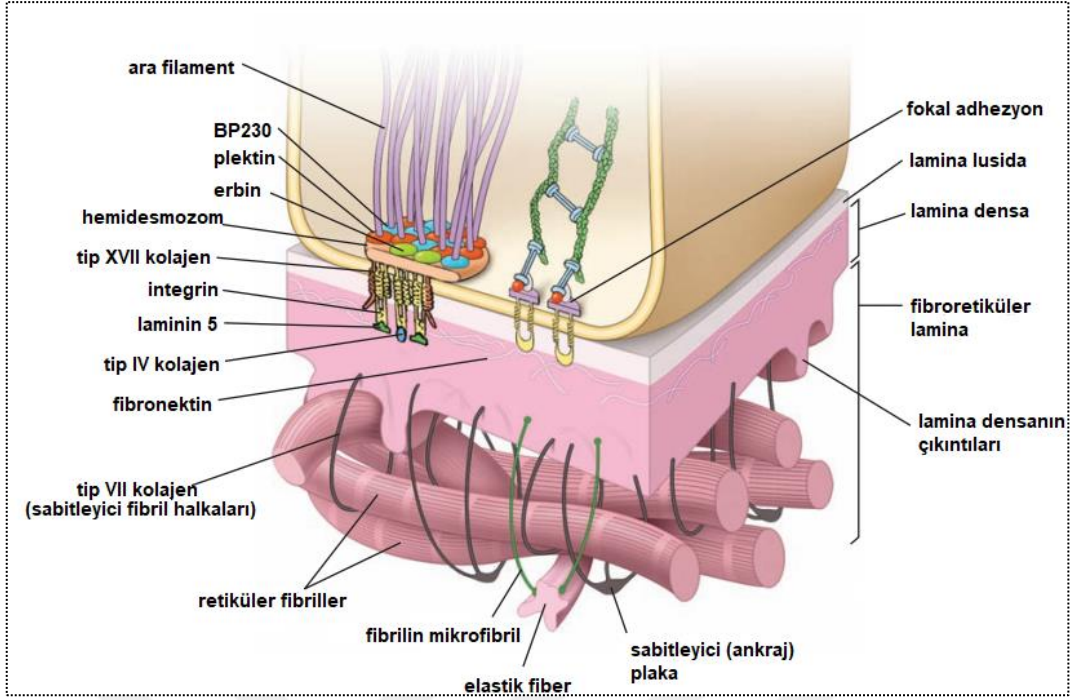
2.1.1. Akciğer Ekstraselüler Matriksi

Ekstraselüler matriks, bazal membran ve intertisyel bağ dokusunun (stromal matriks) bileşenlerini kapsayan genel bir terimi ifade eder. Dokuların hücresel olmayan kısmını oluşturan; lifli proteinler, glikoproteinler ve proteoglikanlardan (PG) oluşan ve doku lokalizasyonuna ve fizyolojik koşullara göre bileşiminde değişiklik gösteren oldukça dinamik bir komplekstir [12, 13] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Ekstraselüler matriks bileşenlerinin gruplandırılması [14].

Ekstraselüler matriks bileşenlerinden olan bazal membran, bazolateral epitel üzerinde yer alan ve epitel dokusunu bağ dokusundan ayıran ince bir tabakadır; stromal matriks bileşeni ise bağ dokusu ile ilişkilidir. Bazal membranın üç bileşenli ince tabakasını *lamina lusida* (*lamina rara*), *lamina densa* ve *lamina fibroreticularis* oluşturmaktadır. Bazal lamina terimi ise hem lamina lusida hem de lamina densa yapıları için kullanılmaktadır [12]. Bazal membranlar, vasküler endotelyumu çevrelemesinin yanı sıra hem hava yolu hem de alveolar epitel hücrelerinin altında yer alır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Epitel hücresinin bazal kısmının şematik gösterimi [15].

Akciğerlerin birincil işlevi gaz değişimidir ve pulmoner ekstraselüler matriksin yapısı, akciğer ventilasyonunu ve gaz difüzyonunu kolaylaştırmak için oldukça özelleşmiştir. Proksimal (merkeze yakın) iletili hava yollarında, kıkırdak; ekstraselüler matriksin özelleşmiş bir formudur ve hava yolu kollapsını önleyen yapısal destek sağlar [12, 14]. Pulmoner intertisyum, soluk alıp verme sırasında akciğer hacminde dalgalanmalara izin veren sürekli bir lif ağı oluşturur. Organın distal (merkezden uzak) bölgesinde ise oksijen ve karbon dioksit, alveolar gazı pulmoner kapillerden ayıran son derece ince, yüksek yüzey alana sahip bir bariyer (membran) boyunca yayılır.

Bu bariyer, kılcal endotel hücrelerinin ve pulmoner alveolar hücrelerin birbirine yakın olduğu alveol alanlarında bulunur (Şekil 2.2). Bu durumda, kılcal endotelin bazal membranları ile alveolar epitel birleşir [12]. Sonuç olarak, bazal membranlar arasında intertisyum bulunmaz ve gaz difüzyonu için yolun kalınlığı en aza indirilmiş olur [16, 17].

Akciğer ekstraselüler matriksini ‘havayolu’ ve ‘pulmoner intertisyum’ yapıları olarak inceleyecek olursak; fibronektin, glikozaminoglikanlar, laminin, tip IV kollajen ve tenasin C'nin yanı sıra integrinler, metalloproteinazlar ve bir hücre yüzey proteoglikanı olan sindekan, hava yolu dallanmasına ve akciğer morfogenezine yol açan yerlerde bulunurken, akciğer fonksiyonunun önemli bir belirleyicisi olan pulmoner intertisyum ise

ventilasyon sırasında akciğerin bütünlüğünü koruyan mekanik iskeleyi oluşturur [18]. Pulmoner intertisyum hem hücresel hem de hücresel olmayan bileşenlerden oluşur. İntertisyel hücreler (fibroblastlar, miyofibroblastlar, perisitler) ve inflamatuvar hücreler (mononükleer fagositler, lenfositler ve mast hücreleri) başlıca hücresel bileşenlerdir [18]. Bu hücre tipleri arasında sayıca en çok bulunan hücre fibroblastlardır. Pulmoner interstisyumun hücresel olmayan bileşenleri öncelikle kollajen, elastin lifleri ve proteoglikanlardır. Fibroblastlar, hücresel olmayan intertisyum bileşenlerinin çoğunu sentezleyebilme yeteneğine sahiptir. Akciğer fibroblastlarının tip I ve III kollajen, elastin, fibronektin, heparan sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat proteoglikanları ve hyaluronik asit sentezlediği bildirilmiştir [14, 19-22].

2.1.2. Havayolu Epitelinin Bariyer Fonksiyonu

2.1.2.1. Hücre-Hücre İletişimi

Havayolu epiteli, dış çevre ile akciğerin iç ortamı arasındaki arayüzü oluşturur. Solunabilir partiküller, kirleticiler, solunum yolu virüsleri ve havadaki alerjenlerle ilk temasın olduğu yerdir. Normal koşullar altında, havayolu epiteli, bir dizi protein kompleksinin oluşumu yoluyla yüksek düzeyde düzenlenmiş, yarı geçirgen bir bariyer oluşturur; apikal-bağlantı kompleksi (AJC) sıkı bağlantılar, yapışık bağlantılar ve dezmozomlardan oluşur [23].

Sıkı bağlantılar en üstteki apikal-bağlantı kompleksini oluşturur, hücreler arasında iyonların ve çözünen maddelerin paraselüler hareketini düzenleyen ve apikal ve bazolateral membran alanlarını fiziksel olarak ayıran yarı geçirgen bir bariyer oluşturur.

Ana bileşenler tetraspanin proteinleri (okludin ve claudin ailesinin üyeleri) ve sitoplazmik yapı iskelesi veya çapraz bağlayıcı proteinler (zonula okludens [ZO]1, ZO2, ZO3; birleşme adezyon molekülü [JAM]-1 ve cingulin) olmasına rağmen, türe bağlı olarak, sıkı bağlantılarda 40'tan fazla protein tanımlanmıştır [23, 24].

Proteolitik aktiviteye sahip ev tozu akarı (HDM) alerjenleri ve polenden gelen proteazlar, sıkı bağlantı proteinlerinin doğrudan hücre dışı bölünmesi yoluyla epitel bütünlüğünü bozabilir. Bu proteolitik alerjenler, hücre hasarına veya ölümüne neden olmadıkları için sadece hücre dışı yolları (paraselüler) etkiliyor gibi görünmektedir [25].

Adherens bağlantıları, hücre-hücre temasını başlatır ve bu temasın olgunlaşması ve sürdürülmesine aracılık eder. Yapışma, transmembran proteini E-kaderin, p120 katenin

ve α , β ve γ -kateninlerin varlığını gerektirir. Bu etkileşimler yoluyla, E-kaderin, aktin hücre iskeletine dinamik olarak bağlanır. E-kaderin'i bozan antikorlar sıkı bağlantıların oluşumunu da bloke ettiğinden, sıkı bağlantıların oluşumu için yapışık bağlantıların birleşmesi gerekli görünmektedir [23].

Dezmozomlar, epitele mekanik güç ve kayma gerilimlerine karşı direnç sağlar. Dezmozomlar, plakoglobin ve desmoplakin gibi hücre içi bağlantı proteinlerinin kompleksinden oluşan yoğun sitoplazmik plaklardır ve sitokeratinler gibi ara filamentlerin transmembran yapışma proteinlerine bağlanmasından sorumludur [26]. AJC çalışmaları, epitelin oluşumu, işlevi ve sürdürülmesinde yer alan moleküler mekanizmalar hakkında bilgi sağlamıştır. Örneğin, sıkı bağlantıların oluşumu ve bağlantıların yapışması, apikal ve bazolateral membran proteinlerinin karışmasını önleyen bir intramembranöz difüzyon çiti (bariyeri) oluşturarak hücrelerin polaritesini güçlendirir.

Sıkı bağlantılar ve yapışık bağlantılar ayrıca, epitelyal hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını, ZO1 ile ilişkili nükleik asit bağlayıcı protein ve siklin bağımlı kinaz-4 dahil olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri aracılığıyla düzenleyebilir. Yaralanmadan sonra epitel hücreleri çoğalma, göç ve farklılaşma yoluyla hücre-hücre temasını yeniden kurmalıdır. Hasarlı komşu hücrelerden salınan AJC ve inflamatuvar uyarılar, hücre-hücre temaslarını başlatmak ve göç etmek için bir yaranın ön kenarındaki hücrenin lamellipodia ve filopodia'sını dışarı çıkartmak için hücrenin yapısal iskeletine sinyal gönderir [26].

Astımda yaygın olarak görülen tip 2 yardımcı T (Th2) sitokin ortamı epitel bariyer fonksiyonunu olumsuz etkiler. Artan geçirgenliğin eşlik ettiği interlökin4 (IL-4) veya IL-13'e maruz kaldıktan sonra epitel hücre hatlarında ZO1 ve okludin ekspresyonunda önemli bir azalma gösterilmiştir [27].

İnterlökinler

İnterlökinler (IL), geniş bir sitokin ailesidir. İnterlökinlerin çoğu, CD4 yardımcı T-lenfosit tarafından ve ayrıca monosit, makrofaj ve endotel hücreleri aracılığıyla sentezlenir. Bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu ve farklılaşmasının yanı sıra çoğalma, olgunlaşma, göç ve yapışmada önemli roller oynarlar [28].

İnterlökinlerin birçoğunun, *in vitro* paraselüler geçirgenlik üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bunlar, epitelyal ve endotelyal paraselüler geçirgenlik üzerinde çeşitli

etkilere sahip olduğu bulunan IL-1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 13'tür [29]. Prototipik tip 2 sitokinlerin, interlökin IL-4 ve IL-13'ün anormal üretimi, uzun süredir alerjik bozuklukların patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Muazzam bilimsel araştırmalara rağmen, yapılarındaki ve reseptör kullanımlarındaki benzerlikler, bu iki benzer sitokinin alerjik inflamasyonun başlangıcında ve devamında oynadığı belirgin rolü tespit etmeyi zorlaştırmıştır [30]. IL-13 dahil olmak üzere diğer sitokinlerin, epitelyal apoptozu indükleyerek ve klaudin-2 gibi klaudin proteinlerinin sentezini uyararak sıkı bağlantı bariyer fonksiyonunu azalttığı rapor edilmiştir [31]. Öte yandan *in vivo* çalışmalar, IL-13'ün kronik inflamatuvar hastalıkta doku fibrozunun kritik bir aracısı olduğunu göstermektedir [32]. IL-13, alerjik inflamasyon ile ilişkili biyolojik etkilerin üretilmesinde ve parazitlere karşı savunmada IL-4 ile birlikte çalıştığı gösterilmiştir [33]. Pek çok benzerliklerine rağmen, sitokinler, sitokin üreten hücreler veya spesifik reseptör alt birimlerinden yoksun farelerin kullanıldığı bir dizi *in vivo* fonksiyonel deney, IL-4 ve IL-13'ün *in vivo* alerjik astımda farklı roller oynadığını göstermiştir [34]. Özellikle IL-4'ün, Th2 hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmasını ve IgE sentezini düzenlemedeki rolü sayesinde, alerjik hava yolu yanıtlarının ve hümoral yanıtların başlatılmasında gerekli olduğu gösterilmiştir; ancak alerjik inflamasyon bağlamında *in vivo* AHR (havayolu aşırı duyarlılığı), mukus üretimi veya subepitelyal fibrozisi düzenlememektedir [30, 35]. Buna karşılık, IL-13'ün efektör faz yanıtlarında daha önemli bir rol oynadığı ve AHR, mukus üretimi, hava yolu düz kas değişiklikleri ve alt epitelyal fibroz dahil alerjik hastalığın ana belirtilerini indüklemek için yeterli olduğu düşünülmektedir. Bu iki sitokinin alerjik yanıtın farklı özelliklerini düzenlediği kesin mekanizma(lar) ve bu eylemlerin tek tek veya birlikte hastalığın patofizyolojik belirtilerini nasıl indüklediği hala açıklığa kavuşmamıştır [30]. Bu mekanizmalar karmaşık olsa da pekçok inflamatuvar hastalıkların altında yatan önemli bir temel, lümen antijenlerine ve patojenlere anormal doku maruziyeti ile sonuçlanan anormal bir "sızıntılı" epitel bariyerinin varlığıdır. Hava yolu epitel hücrelerinin IL-13 ile doğrudan muamelesi, TEER değerlerinin azalmasına, paraselüler akışın artmasına ve ZO-1 protein seviyelerinin düşmesine neden olmaktadır [29, 36]. Benzer şekilde Calu-3 havayolu epitel hücrelerinin 24 saatlik IL-4 muamelesi sonra TEER'in azalarak geçirgenliği artırdığı gösterilmiştir. Uzatılmış IL-4 uygulaması (48 saat) ile epitel boyunca küçük molekül akışının arttığı, bu da ZO-1 ve okludin protein seviyelerinde bir azalmaya neden olduğu anlaşılmıştır [29, 37].

2.1.2.2. Hücre-Hücre Dışı Matriks İletişimi

Hücreler arası adezyon moleküllerine ek olarak, hücre dışı matris adezyonu, mukozal bariyerin korunmasında ve epitel hücre fenotipinin ve onarıcı potansiyelinin düzenlenmesine katılmada önemli bir rol oynamaktadır. Hücre dışı matriks (ECM) proteinlerinin etkilerine spesifik hücre yüzeyi reseptörleri aracılık eder; integrinler, α zinciri boyunca taşınan ligand özgülüğü ve β zinciri aracılığıyla sinyal iletimi ile heterodimerik transmembran glikoprotein α ve β zincirlerinden oluşur [24]. 24'ten fazla integrin kombinasyonuna sahip 18 α ve 8 β alt birimi tanımlanmıştır.

Epitel hücreleri 9 ayrı integrin ifade etmekte ve bunlardan ikisi, $\alpha 3\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$, bazal membranın bileşenlerini tanımakta ve spesifik adezyon molekülleri olarak işlev görmektedir. Diğerleri, epitel hücelere yakın olmayan ESM proteinlerini tanımaktadır [24, 38]. Hava yolu hastalığının klinik öncesi modellerinden elde edilen veriler, epitelyal hücrelerde eksprese edilen integrinlerin, yaralanma ve iltihaplanmaya karşı hücrel tepkileri düzenleyebileceğini düşündürmektedir.

Hava yolu epitel hemidesmozomları morfolojik olarak dezmozomlara benzerler ve dezmozomlar gibi ara filamentlere bağlanırlar ve gerilme mukavemetini epitel boyunca dağıtmak için odak noktaları görevi görmektedirler. Bununla birlikte, birincil olarak integrin $\alpha 6\beta 4$ 'ten oluşan hemidesmozomlar, bitişik epitel hücrelerini birleştirmek yerine, hücrelerin bazal yüzeyini laminin bakımından zengin ECM'ye bağlama görevini üstlenmektedirler [24].

2.1.3. Astımda Havayolu Epiteli

2.1.3.1. Morfolojik ve Yapısal Değişiklikler

1990'ların başında yapılan transmisyon elektron mikroskobu çalışmaları, astımlı hastalardaki havayolu epitelinin, astımlı olmayanlardaki epitelden daha az hücre içi yapışma kompleksine sahip olduğunu göstermiştir. Ancak moleküler mekanizmalar tam anlamıyla açıklanmamıştır. APC'nin bileşenleri olan E-kaderin ve ZO1'in astımlı hava yollarında değiştiğini göstermek neredeyse 25 yıl almıştır. Genel düzeyde, astımlı hava yolu epitelinin bileşimi, astımlı olmayanlarınkinden farklıdır [24]. Örneğin, goblet hücre hiperplazisi ve aşırı mukus üretimi, astımın morbidite ve mortaliteye önemli ölçüde katkıda bulunan ortak özellikleridir. Transkripsiyon faktörlerinden olan FOXA2 ve FOXA3'ün IL-13 ve EGFR'ye bağlı ifadesi, astımda epitelyal hücre müsin üretiminde merkezi bir adımdır. Bu sürecin potansiyel bir aracısı, farelerde ev tozu akarı (HDM)

alerjeni veya IL-13'e yanıt olarak Clara hücrelerinin goblet hücrelerine farklılaşmasını indükleyen SAM-işaretili-alan-içeren-ETS-transkripsiyon faktörüdür (SPDEF) [39]. Bu transkripsiyon faktörünün hedeflerinden biri de siliyer hücre farklılaşmasının ana düzenleyicisi FOXJ1'dir [40].

Astımlı epitel kırılıgandır ve siliyer tabakasını kaybetmiştir. Bu durum yetişkinlerde ve çocuklarda gözlenir ve E-kaderin, ZO1 gibi AJC proteinlerinin ekspresyonunun azalmasıyla da tutarlıdır. Epitel hasarı alt hava yollarıyla sınırlı değildir; astımlı çocukların nazal poliplerinde bozulmuş dezmozom oluşumu gösterilmiştir [24, 41].

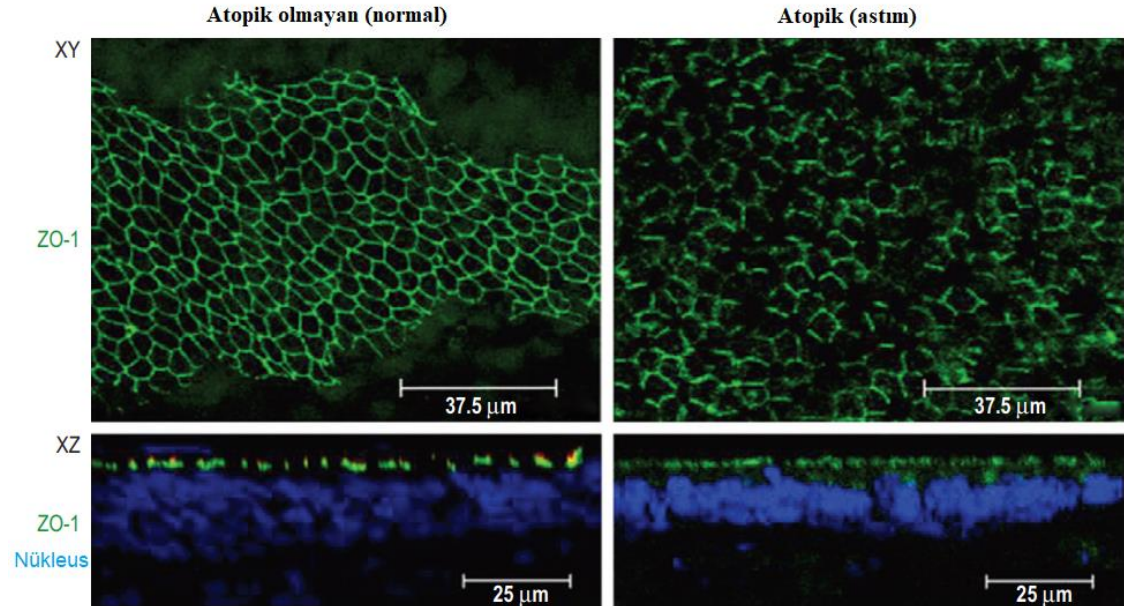
Astımlı hastaların hava yollarında rapor edilen yapısal değişiklikler arasında epitelyal kırılglanlık, goblet hücre hiperplazisi, genişlemiş submukozal mukus bezleri, anjiyogenez, hava yolu duvarında artan matriks birikimi, artan hava yolu düz kas kütlesi, duvar kalınlaşması ve elastin anormallikleri yer almaktadır [42].

2.1.3.2. Fonksiyonel Değişiklikler

Kusurlu sıkı bağlantı ifadesi, tehlikeye atılmış bir bariyer oluştursa da astımdaki epitel hücre kusurları, fiziksel bariyer işlevlerinin çok ötesine uzanır [43]. Örneğin, astım hastalarından izole edilen epitel hücreleri, tip I antiviral interferonlardan, özellikle rinovirüs enfeksiyonu sırasında IFN- β salınımından kaynaklanan yetersiz bir doğal bağışıklık tepkisine sahiptir [43, 44]. Astımlı hastalardan gelen epitel hücreleri de IFN- β 'ye yanıt olarak apoptozdan ziyade nekroz geçirir, bu da daha fazla viral yük ile sonuçlanır. IFN- β takviyesi ile, rinovirüse karşı apoptotik yanıtın kurtarıldığı ve ekzojen IFN- β tedavisi ile viral yüklerin normal seviyelere düştüğü gösterilmiştir [45]. Astımlı çocuklardan elde edilen epitel hücreleri, astımı olmayan hastalara kıyasla daha yüksek seviyelerde PGE2 ve diğer lipid aracıları ifade etmektedir. Bu araçılar ayrıca mekanik stres, yaralanma, virüs enfeksiyonu veya astımda bol olabilen nötrofiller ve eozinofiller gibi inflamatuvar hücrelerle etkileşim ile arttığı bilinmektedir [46].

Şekil 2.5.'te sağlıklı bir hava yolundan ve aktif astımlı bir hastadan alınan bronş biyopsisinin konfokal görüntüleri verilmiştir. Astımlı hastaların sıkı bağlantılarındaki (ZO-1) bozulmalar açıkça görülmektedir [43]. Birkaç *in vitro* çalışma, proinflamatuvar sitokinlerin TJ'lerin bozulmasına neden olduğunu göstermiştir. En önemlisi, IL-13, bronş epitel hücre kültürlerinde TJ bütünlüğünü azaltırken, TNF- α ve IFN- γ 'nın, gastrointestinal epitel hücrelerinde TJ'leri bozduğu, ancak bunların etki biçimlerinin farklı olduğu görülmektedir. IL-13, astımda TJ bozulmasının bir aracısı olarak

gösterilebilirken, *in vitro* veriler, astımlı deneklerden alınan kültürlerde temel bariyer işlevi daha düşük olduğundan, IL-13'ten bağımsız bir etki olduğunu düşündürmektedir [43, 47, 48].



Şekil 2.5. Normal bir hava yolundan (solda) ve aktif astımlı bir hastadan (sağda) alınan bir bronş biyopsisinin konfokal immüno Floresan mikroskopik görüntüleri. Düzlemsel (üst) ve kesitsel (XZ, alt) görüntülerdir [43].

2.2. Solunum Yolu Hastalıkları-Hücre Dışı Matriks (ESM) İlişkisi

Pulmoner hastalıklar ve bozukluklar, kalıtsal ve edinsel faktörler de dahil olmak üzere birçok nedenden dolayı ortaya çıkabilir. Pulmoner hücre dışı matris, akciğerlerin doku mimarisini belirleyen ve fizyolojik akciğer fonksiyonu için gerekli olan mekanik stabiliteyi ve elastik geri tepmeyi sağlayan önemli bir bileşimdir. ESM tarafından başlatılan biyokimyasal ve biyomekanik sinyaller, hücresel işlevi ve farklılaşmayı yönlendirir ve böylece akciğer gelişiminde, doku yeniden modelleme süreçlerinde ve yetişkin homeostazinin korunmasında belirleyici bir rol oynar [49].

Yakın tarihli araştırmalar, ekstraselüler matriksin akciğerlere sadece fiziksel destek ve stabilite sağlayan inert bir yapı olmayıp aynı zamanda çevresindeki hücresel tepkileri de düzenleyen biyoaktif bir ortam olduğunu ortaya koyan yeni bilgiler sağlamıştır [50]. Hava yolu veya parankimal dokuların ekstraselüler matrikslerindeki değişiklikler artık astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), idiyopatik pulmoner fibrozis (IPF) dahil olmak üzere birçok solunum yolu hastalığının patolojik profillerinde tanınmaktadır.

Çeşitli akciğer hastalıklarında değişen ESM'yi inceleyecek olursak;

- **Astım;** Hava yolu düz kasının işlevindeki değişiklikler, çevreleyen hücre dışı matriste artan kollajen ve fibrillin birikimi ile ilişkilidir [51]. Hava yolu bazal membranının kalınlaşması, bronş epitelinin gerçek bazal laminasının altında yer alan subepitelyal lamina retikularis'in kalınlaşmasından oluşur ve tip I, III ve IV kollajen ve fibronektin birikimini içerir [50, 52]. Hafif astımda bile ortaya çıkan ESM birikintileri, subepitelyal bölgedeki I, III ve V kolajenlerinin yanı sıra bronş epitelinin lamina retikularisindeki fibronektinleri içerir. Ölümcül astımda, büyük hava yollarında elastik liflerde, MMP-9 ve MMP-12'de artış bildirilmiştir [53, 54]. Vasküler yeniden şekillenme, VEGF ve VEGF reseptör lokalizasyonu ve ekspresyonunun moleküler patolojisindeki değişikliklerin bir sonucu olarak dokudaki kan akışını değiştirdiği anlaşılmıştır [55]. Astımda anjiyogenez, bronşiyal vasküler yapıların düzensiz genişlemesi ile karakterizedir ve hava yolu duvar kalınlaşmasına katkıda bulunur [14, 56]. Bu nedenle, ESM'deki değişiklikler, astımın moleküler patolojisinde çok önemli bir olay olan havayolu düz kasların artan büyümesine yol açan mekanizmaları harekete geçirebilir. Ayrıca, havayolu düz kaslar üzerine yapılan *in vitro* çalışmalar, astımdaki post-translasyon seviyelerde de ESM'deki değişikliklerin meydana geldiğini düşündürmektedir. ESM bileşenlerinin anormal birikimi, akciğerin biyomekanik özelliklerini farklı şekillerde etkiler. Hava yollarının etrafındaki ESM birikimi, hava yollarının daralmasını alevlendirir ve doku sertliğinde değişikliklere neden olur [49, 57].
- **KOAH;** KOAH hastalığında akciğerlerin farklı kompartmanları, anormal kollajen birikiminden farklı şekilde etkilenir. Elektron mikrografları, amfizematöz dokunun alveolar septal duvarlarında yüksek miktarda kollajen ve elastin ortaya çıkarırken, KOAH'lı hastaların hava yollarında daha düşük kollajen I ekspresyonu bulunmuştur [49, 58]. Yapılan çalışmalarda çeşitli akciğer kompartmanlarındaki KOAH'lı hastalardan alınan ESM'nin ayrıntılı bileşimi analiz edilmiştir ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında tüm akciğer bölmelerinde elastik lifler, fibronektin, kollajenler, tenasin-C ve versikan'da değişiklikler olduğunu göstermiştir [58]. Hücre adezyonu ve göçünde işlevleri olan bir ESM glikoproteini osteopontin'in ekspresyon seviyelerinin KOAH'lı hastaların balgamında yükseldiği bulunmuştur [59]. KOAH'ın akut alevlenmeleri

sırasında, kollajenler, versikan ve elastinler gibi ESM proteinlerinin proteaz tarafından parçalanmasına yol açan hızlandırılmış bir ESM proteini yapım-yıkım döngüsü meydana gelir. Bu kanda dolaşan ESM protein parmak izleri, KOAH hastalığının ilerlemesini tahmin etmede güçlü biyobelirteçler olarak kullanılabilir [60].

- **Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH);** Pulmoner arterler, kalıcı vazokonstriksiyon ve vasküler yeniden şekillenmeden etkilenmekte, bu da pulmoner arter uyumluluğunun (kompliyansın) azalmasına neden olmaktadır. PAH'da arter duvarının üç katmanlı mimarisinin tamamı yeniden şekillenir ve böylece bu üç katmanın kalınlaştığı görülmüştür [61]. Buna göre, radyoaktif madde kullanılarak yapılan çalışmaları, hipoksik pulmoner hipertansiyon sırasında pulmoner arterlerde elastin ve kollajenin hızlı sentezlendiğini ortaya çıkarmıştır [62]. Ayrıca ESM bileşenlerinden olan tenasin-C, hastalığın ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. PAH'lı hastalarda ve benzer deneysel hastalık modellerinde, tenasin-C, düz kas hücresi (SMC) proliferasyonu ve FGF2'ye mitojenik yanıt ile korelasyon gösterdiği bulgulanmıştır. Benzer şekilde, fibrotik fare akciğerlerinde tenasin-C'nin akciğer uyumu ile negatif korelasyon gösterdiği, yani bu proteinin daha büyük miktarları, daha sert akciğer dokusu ile ilişkilendirilmiştir [63]. Yeniden şekillendirilmiş pulmoner arterlerde hyaluronik asit (HA) gibi glikozaminoglikanların (GAG) artan birikimi de gözlenmiştir. Ayrıca, PAH'lı hastaların akciğer dokusunda, lökosit adezyonunu ve aktivasyonunu desteklediği öne sürülen HA'nın patolojik bir ağır zincir modifikasyonu tanımlanmıştır [64-66].
- **Akciğer Kanseri;** Biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleriyle ESM, kansere özgü özelliklerin altında yatan hücresel tepkilerin düzenleyicisi olduğundan, ESM'nin neoplastik ilerleme üzerindeki etkisini incelemek gerekli hale gelmiştir. Örneğin, küçük hücreli akciğer kanserleri (SCLC'ler), yüksek seviyelerde fibronektin, laminin, kollajen Tip IV ve tenasin-C barındıran geniş bir ESM stroması ile çevrilidir [67]. Tümör stromasının yeniden şekillenmesi doku sertliğini güçlü bir şekilde etkilemekte, bu da hücrelerin mekanobiyolojisini etkileyerek hücresel tepkileri tetiklemektedir. Kollajenin akciğer mimarisinde gerilme kuvvetinin ana katkı maddesi olduğu bildirildiğinden, kollajen metabolizması tümör stromasının sertleşmesinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Akciğer kanserinde anormal

kolajen birikimi ve yapım-yıkım döngüsünün yanı sıra kolajen çapraz bağlanmasında değişiklikler gözlenmiştir [68].

2.3. Pulmoner ESM Model Sistemler

ESM'nin bileşimi ve biyomekanik özellikleri, çoğalma ve farklılaşmanın yanı sıra hücre morfoloji, hareketlilik, yayılma, hücre canlılığı ve apoptoz üzerinde bir etkiye sahiptir. Öyleyse, hücre davranış ve ESM birbirine yüksek oranda bağlı olduğundan, *in vivo*'da bulunan fizyolojik ve patolojik koşulları tam olarak taklit eden *in vitro* hücre kültürü sistemlerine ihtiyaç vardır [69].

Fizyolojik olarak ESM'ye gömülü mezenkimal hücreler üzerine yapılan çalışmalar, pulmoner interstisyel ESM'nin yapısına ve biyomekaniğine çok benzeyen *in vitro*, *in vivo* veya *ex vivo* modellerden faydalanılabilir. 3B hücre kültürü sistemlerinin en basitleştirilmiş modeli, ESM molekülleri ile kaplanmış doku kültürü plastiği uygulamalarıdır. Basitleştirilmiş tasarımı sayesinde, belirli ESM moleküllerinin hücrelerle etkileşimini incelemek için kullanılabilen, ancak burada hücreler bir ESM içine gömülme yerine iki boyutlu (2B) bir yüzeye bağlanmaktadır [70]. Üstelik, hücre kültürü plastiğinin sertliği, *in vivo*'da fizyolojik olarak bulunan değerin çok ötesindedir; atomik kuvvet mikroskobu ile ölçülen hücre kültürü plastiğinin Young modülü 2 ile 4 GPa arasında değişirken, **normal akciğer dokusu ölçülen bölgeye bağlı olarak 0,44 ile 7,5 kPa** arasında değişmektedir. IPF'li hastalardan alınan fibrotik insan akciğer dokusu ise ortalama 16.52 kPa olarak bulunmuştur [71-73]. Bununla birlikte, sentetik akrilamid veya polietilen glikol bazlı matriksler kullanılarak mekanik olarak ayarlanabilen 2B modeller, gradyan oluşumunu indüklemeye ve ESM sertliğinin sıkı kontrolünü sağlamaktadır [70, 74]. Bu yapay sentezlenmiş makromoleküler yapıların yanı sıra kolajen [75], elastin [76], fibrin [77] veya laminin [78] içeren doğal ve mühendislik ürünü biyopolimerler, *in vitro* ESM model sistemleri için yaygın olarak kullanılmaktadır [79].

Bazal membrandan ekstrakte edilen jeller ve hücreleştirilmiş fibroblast türevli matrisler de günümüzde kullanılmaktadır ve bunlar fizyolojik ESM'nin kompozisyonunu, 3B yapısını ve biyomekaniklerini daha yakından taklit etmektedir [80]. Ancak bu modellerin hiçbirisi pulmoner dokunun benzersiz uzaysal geometrisini taklit edememektedir. Bu biyomimetik sınırlamaları aşmak için, çeşitli hayvan hastalık modellerinden ve ayrıca hastalıklı insan dokularından alınan vibratom-dilimli *ex vivo* matriksler, doğal veya hücreleştirilmiş formlarında kullanılabilir [81-84].

Hücreleştirilmiş (deselülerizasyon teknikleri ile) akciğer dokusu kullanılarak yapılan *ex vivo* modeller, ESM'nin akciğer patolojileri üzerindeki etkisini mekanik olarak daha fazla tanımlamaya yardımcı olmaktadır. Gelecekte 3B biyobaskı teknolojileri veya eklemeli üretim teknikleri, biyomekanik olarak gerçek dokuya benzeyen biyouyumlu ESM yapı iskeleleri yaratmada umut vadetmektedir. Bu tür fabrikasyon yapı iskeleleri, ESM'nin kompleks yapısını incelemek için ayarlanabilir *in vitro* modeller olarak veya hücrelerle başarılı bir şekilde yeniden kültüre edildiğinde, hastalıklı dokuları veya tüm organları değiştirmeye hazır bir biyomühendislik dokusu olarak kullanılabilirler [85].

2.4. Pulmoner 3B Hücre Kültür Modelleri

Hava iletiminin düzgün bir şekilde gerçekleşmesi için akciğerler, anatomik ve fizyolojik olarak farklı birçok hücre tipini barındıran kompleks bir yapıya sahiptir [86]. Bu kompleks yapının anlaşılması ve ortaya çıkan akciğer hastalıklarının anlaşılması için model sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut çalışmalar genellikle iki boyutlu (2B) hücre kültür plakaları üzerinde gerçekleştirilen çalışmalardan oluşmaktadır. 2B kültür sistemleri hücre-hücre etkileşiminin temelleri hakkında fikir edinmesi açısından gerekli olsa da hücrelerin kendine özgü üç boyutlu (3B) yapısını tam olarak yansıtmamakta ve *in vivo* mikroçevrenin zayıf bir temsili olarak kalmaktadır. Bu nedenle 3B model sistemleri giderek önem taşımaktadır. Son yıllarda akciğer doku mühendisliği ile ilgili yapılan çeşitli metodolojik gelişmeler skafold bazlı, ALI modeller, mikrofluidik modeller, sferoidler ve akciğer doku eksplantları gibi birçok 3B hücre kültür modellerinin oluşturulmasına fırsat oluşturmaktadır [86, 87]. Akciğer araştırmalarında kullanılan 3B modellerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.1'de verilmiştir [88].

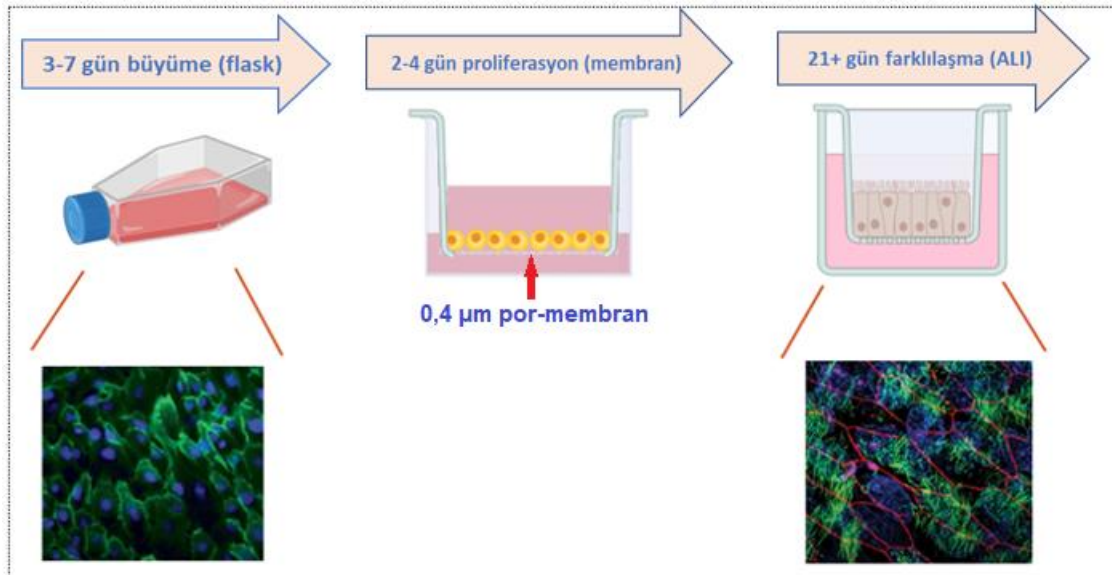
2.4.1. Skafold bazlı modeller

Skafold bazlı kültürlerde, hücre süspansiyonları, hücrelerin tutunduğu ve kültür sisteminin 3B yapısını belirleyen doku iskeleleri üzerine ekilir. Bu iskeleler, doğal veya sentetik malzemelerden oluşturulabilir. Skafold bazlı modeller membranlar, deselülerize matrisler, hidrojeller ve 3B baskılama gibi doku mühendisliği yaklaşımlarını kapsamaktadır [86]. Bu nedenle elde edilecek doku iskelesinin, akciğerlerin doğal mekanik dayanımı, yüzey özellikleri ve elastikiyetini sağlayacak yapıya sahip olması beklenmektedir. Bu sayede uygun tasarım ve modellerle akciğer yenilenmesine katkı sağlayacak doku greftlerinin üretilmesi mümkün hale gelmiştir. Akciğer için oluşturulan skafold tabanlı modellerin tasarımında doğal veya sentetik polimerler kullanılmaktadır.

Akciğer doku mühendisliği uygulamalarında en çok tercih edilen polimerler Poli Laktik Asit (PLA), Poli Glikolik Asit (PGA), Poli(Laktik Asit ko-Glikolik Asit) (PLGA), Polikaprolakton (PCL), kolajen, elastin, ipek fibroin ve kitosandır [89]. Bu polimerler, ihtiyaç duyulan doku mühendisliği uygulamasına özgü olarak tasarlanarak kullanılabilmektedir. Elektroğirilmiş membranlar hücre kültürü uygulamaları için basit ve uygun maliyetli doku iskelesi üretiminde alternatif yöntem olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bu membranlar kontrol edilebilir fiziksel ve kimyasal özelliklerin yanısıra geniş yüzey alanı/hacim oranına sahip olması nedeniyle biyomedikal uygulamalar için iyi bir biyomalzeme olma özelliği taşımaktadır [90].

2.4.2. Hava-Sıvı Arayüzü (ALI Kültür Uygulamaları)

Akciğer 3B hücre kültür çalışmalarında en yaygın kullanılan modellerden biri ALI-kültür sistemleridir. Bu modelde hücreler geçirgen bir membran üzerine ekilir ve farklılaştırmaya kadar hem alt hem üst hazneden besleme yapılır, farklılaştırma aşamasına geçildikten sonra ise hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilir ve hücreler sadece alt haznedeki besiyerinden membran yardımıyla beslenir. Bu sayede hücrelerin üst kısımda hava; alt kısımda ise besiyeri ile teması sağlanarak akciğer fizyolojisi 3B *in vitro* sistemlerde kısmi olarak taklit edilmiş olur [91]. Şekil 2.6'da hava-sıvı arayüzü yöntemi ile farklılaştırılan epitel hücrelerin şematik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.6. Havayolu epitel hücrelerinin ALI kültür yöntemi ile farklılaştırılması [92]

ALI kültür sistemi, moleküler mekanizmaların anlaşılması, çeşitli ilaç ve toksisite çalışmalarının vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Akciğer ALI kültür sistemler için

primer epitel hücreler veya akciğer epitel hücre hatları kullanılmaktadır. En yaygın kullanılanlar Calu-3 ve A549 adenokarsinom hücre hatlarıyken, BEAS-2B ve 16HBE14o- sağlıklı epitel hücre hatlarıdır [93]. Ayrıca bu hücreler Matrigel, MucilAir TM-HF (Epithelix) gibi ticarileşmiş 3B epitel hidrojel matris modelleri ALI hücre kültür sistemiyle bir arada kullanılabilir. Bu sistemler *in vitro* hücre kültür sistemlerinin etkinliğinin artırılmasında etkili olsa da çeşitli limitasyonlara sahiptir. Bu modeller hazır kültürler olduğu için kişinin kendi hücreleri için greft oluşturması zor olmakta, ayrıca maliyet açısından avantajlı sistemler değildir.

2.4.3. Sferoidler ve organoidler

Sferoid ve organoidler kendi kendine organize olabilen çoklu hücrelerin oluşturduğu organ benzeri yapılar olarak tanımlanmasına rağmen, organın bütünü yansıtmamaktadır. Bu sistemler daha çok tümör modelleri için kullanılmaktadır. Sferoid kültürler zayıf bağlantılı U-tabanlı plakalar, matrigel gibi hücre dışı matrisler, rotatif hücre kültürü sistemleri veya asılı damla yöntemi kullanılarak üretilmektedir. Asılı damla yöntemi, kanser hücrelerinin *in vivo* koşullarının daha iyi yansıtılması için 3B mono ve ko-kültür sferoidleri üretmek için kullanılmaktadır [86]. Kanser hücrelerinin sinyal iletimi, akciğer gelişimi, tümör-stroma ilişkileri gibi araştırmaların yapılması için bu sistemler oldukça önemlidir [94].

2.4.4. Mikroakışkan modeller

Son yıllarda, hücre süspansiyonlarının bir mikro kanal sisteminden geçirildiği, bu hücreleri içeren mikro kuyucuklara bölündüğü “mikroakışkanlar” adlı yeni bir teknoloji geliştirilmiştir. Bu mikroakışkan yöntemiyle birlikte az miktarda sıvı hacmi ve hücre sayısı ile karmaşık, tekrarlanabilir ve ayarlanabilir 3B modellerin ve test sistemlerinin üretilmesi mümkün olmaktadır [95]. Mikroakışkan teknolojisi kullanılarak, akciğerin fizyolojik ve işlevsel karmaşıklığını yeniden oluşturmak ve böylece *in vivo* ortamı taklit etmek için minyatür platformlarda *in vitro* bir ortam sunan “lung-on-chip” model sistemleri geliştirilmiştir [87]. Bu sistemler genellikle organa spesifik belirli bir mekanizmanın anlaşılması için tasarlanmaktadır. Ayrıca yüksek verimli tarama ve analizlerde anlık gözlem ve görüntüleme yapma imkânı sunan biyosensörle sağlanabilecek gelişmiş sistemlerle birlikte kullanım için uygun kültür modelleridir. Mikro akışkan bazlı modeller ilaç ve toksikoloji çalışmaları için avantajlıdır. Lung-on-a-chip modeller akciğer hastalık fenotiplerinin çıkarılmasında, alveol-bariyer mikroçevresi

ve hava-sıvı arayüzey etkileşimlerinin araştırılmasında, akciğer fonksiyonun mekanik etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır [96].

2.4.5. Akciğer doku eksplantları

Akciğer havayolunun 3B taklit edilmesini sağlayan *in vitro* modellerin yanısıra *ex vivo* modeller de geniş bir araştırma yelpazesine olanak tanımaktadır. *Ex vivo* akciğer kültürü, doğal hasta dokusunun heterojenliğinin temsil edilmesiyle birlikte, kontrollü deney koşullarından yararlanan organa özgü 3B dinamik yapısına ilişkin bir araştırma ortamı sunar. *Ex vivo* akciğer eksplant kültür sistemleri cerrahi işlem sonrasında elde edilen dokunun dondurularak veya homojenize edilerek kullanılmasına dayanmaktadır. Literatürde incelenen doku eksplantlarının çoğu, farklı akciğer kanseri türlerine bağlı olarak göğüs cerrahisinden elde edilen doku parçalarına dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda eksplant kültür teknikleri antibiyotik metabolizmasının anlaşılması, moleküler belirteçler ve patojen tespitleri için de kullanılmıştır [86].

Çizelge 2.1. Akciğer araştırmalarında kullanılan 3B modellerin avantaj ve dezavantajları

Model	Avantaj	Dezavantaj	Ref.
Hava-Sıvı Arayüzü (ALI)	•Uzun süreli kültüre alma (haftalar ile aylar arası) •Maddelerin doğrudan uygulanması için fırsat •Perfüzyon mümkün •Çok çeşitli fonksiyonel çalışmalar •Akciğerin solunum hareketlerini simüle etme - Ticari olarak ulaşılabilirlik: •Yüksek veri tekrarlanabilirliği •Partiden partiye düşük değişkenlikler •İyi karakterizasyon •Birkaç patoloji taklit edilebilir •Uzun süreli kültüre alma (12 aya kadar)	•Kompleks sistemlere uygun değil •Modifiye etmek zor	[97-101]
Sferoid	•Basit yöntem •Farklı hücre tipleri ile ko-kültüre elverişli	•Yüksek kayma kuvveti •Uzun süreli kültüre almak zor (saat ile günler arası)	[102-104]
Akciğer Doku Eksplantları	•Hücrel ve moleküler etkileşim modellenir •Doğal bağışıklık olaylarının karakterizasyonu •Canlı hücre görüntüleme mümkün •Genetik modifikasyonlar mümkün olabilir	•Kısa süreli kültüre alma (96 saate kadar) •Bağışıklık hücre aktivasyonu yok •Sistemik perfüzyon yok •Ventilasyon yok •Genetik modifikasyonlar zor	[105-107]

Hassas Kesim Akciğer Kesitleri (PCLS)	•Uzun süreli kültüre alma (1 haftaya kadar) •Akciğerin hücrel ve yapısal organizasyonu korunur	•Düşük erime sıcaklığına sahip agaroz ile yıkama gerekli • Kısa süreli kültüre alma (96 saate kadar) •Bağımsızlık hücre aktivasyonu yok • Sistemik perfüzyon yok • Ventilasyon yok • Genetik modifikasyonlar zor • Hastalıklı dokudan üretimi zor	[108, 109]
Bronşiyal Halkalar	•Bronşiyal fizyolojik tepkilerin doğrudan araştırılması-, örn. kasılma-farmakolojik kontrol edilebilirlik	• Kısa süreli kültüre alma •Teknik olarak kültüre alma devirleri gerekli	[110-115]
Ex vivo Perfüzyon ve Ventilasyon	•Akciğer ödemi oluşumu, oksijenasyon kapasitesi, vasküler reaktivite, bakteriyel enfeksiyon ve kök hücre tedavisinin araştırılması	• Sınırlı ulaşım • Ayrıntılı teknik •Sadece birkaç saat kültürlenebilme	[116-123]
Skafold Bazlı Modeller	•İlgili hastalık patolojilerinin özelliklerinin korunması • Yapay bir plevra ile hücrelerin ya hava yoluna ya da vasküler bölmelere fizyolojik ekilmesi •Hastalığın heterojenliğini tekrarlayabilme • 1 aya kadar kültüre alma	•Hücreler iki veya üç boyutta ekilir • İlk hücre ekimi stokastiktir •Skafoldun iç kısımlarında besin ve oksijene sınırlı erişim	[124-129]

2.5. Pulmoner Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Biyomalzemeler doku mühendisliği uygulamalarında 20 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır; bununla birlikte yakın zamanlarda biyomalzemelerin modifiye edilmesi (hücre varlığında veya yokluğunda) doku rejenerasyonuna izin vermiştir. Bir organ veya doku zarar gördüğünde, hücre dışı matris (ESM) hasar görür ve biyomateryal yapı iskeleleri, doku yenilenmesini destekleyen sinyaller sağlayarak doğal ESM'ye benzeyen bir mikro çevre oluşturur.

Doku mühendisliği, yeni yaklaşımlar kullanarak, gerekli işlevi yerine getiremeyen hastalıklı veya hasarlı organları onarmaya çalışır. İşlevselliğin geri kazanılabilmesinin bir yolu, yapı iskelesinin (biyomalzemenin) biyolojik özelliklerinin doğal organın özelliklerini iyi şekilde taklit edebiliyor olmasıdır.

Poli Laktik Asit, Polikaprolakton, Poli Laktik-ko-Glikolik asit gibi sentetik biyomalzemeler, istenen mekanik özellikleri, iskele mimarisini ve bozunma oranını oluşturmak için doğru bir şekilde değiştirilerek sentezlenebilmektedirler [130]. Mekanik

özellikler; elastisite, sertlik ve Young modülü gibi malzeme özelliklerini, iskele (skafold) mimarisi ise fiber çapı ve oryantasyonu ile gözenek boyutu ve yüzde gözeneklilik içermektedir. Elastin, kolajen, ipek ve keratin gibi doğal biyomalzemeler hücre yapışma ligandları gibi spesifik proteinleri zaten içerir ve hücre yapışması ve farklılaşmasına yatkınlardır [131].

Bir biyomalzemenin dikkatli seçimi, istenen işlevi gerçekleştirmesi amaçlanan uygulama için önemlidir; modern yaklaşımlar ayrıca doğal ve sentetik biyomalzemelerin karışımına da odaklanmış durumdadır. Çizelge 2.2 ve 2.3. doku mühendisliği ve pulmoner ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyomalzemelerin özelliklerini listeleyen bazı doğal ve sentetik biyomalzemeleri vurgulamaktadır [132].

Çizelge 2.2. Pulmoner araştırmalarda kullanılan doğal biyomalzemeler ve özellikleri

Doğal Biyomalzemeler		
Biyomalzeme	Özellik	Ref.
Kolajen	- Yüksek biyouyumluluk - Ayarlanabilir biyobozunurluluk - Yeterli mekanik dayanım ve esneklik - Fizyolojik koşullara yüksek adaptasyon	[133, 134]
Elastin	- İyi elastikiyet - Uzun süreli stabilite - Kendi kendine organize olabilme (self-assembly) - İyi biyolojik aktivite gösterme	[135, 136]
İpek Fibroin	- Yüksek mekanik dayanım - Yüksek biyouyumluluk ve biyobozunurluluk - Değiştirilebilir yüzey özellikleri - İlaç vb. teratötiklerin akciğerlere ulaşabilmesi	[137-140]
Keratin	- Ayarlanabilir farklı skalalarda mekanik karakteristikler - Modifiye edilebilir protein özellikleri	[141, 142]
Albumin	- Yüksek biyouyumluluk - Düşük maliyet, kolay erişilebilirlik - Uygun biyobozunurluluk - Sürdürülebilir salım profili - Sistemik toksisite göstermeyişi	[143-147]
	- Fonksiyonel grupların varlığı - Kolay işlenebilirlik	

Jelatin	• Isıyla geri-dönüşümlü jel oluşturabilme • Hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçları kapsülleyebilme yeteneği • Biyouyumluluk ve biyobozunurluluk	[148-152]
Kitosan	• İlaç ve terapötikler için iyi bir taşıyıcı • Kontrollü ilaç salımına uygunluk • İyi biyouyumluluk ve biyobozunurluluk • Hücrelerarası bağlantıları açabilme yeteneği, böylelikle ilaçların emilimi ve biyoyararlanımı için uygun aday • Hedefli ve sürdürülebilir salım potansiyeli	[153, 154]
Hyaluronik asit	• Kimyasal olarak modifiye edilebilir • Çeşitli maddelerle kombine edilebilir • Pekçok tümör hücresinde aşırı ifade olan CD44 reseptörlerinin bir ligandıdır. • Diğer ilaçlarla reaksiyona girme ve konjugat oluşturma yeteneği • Konjugatların hedefe yönelik etkisi ve kontrollü salımı	[155, 156]

Çizelge 2.3. Pulmoner araştırmalarda kullanılan sentetik biyomalzemeler ve özellikleri

Sentetik Biyomalzemeler		
Biyomalzeme	Özellik	Ref.
Poli Laktik Asit (PLA)	• Yavaş bozunurluluk • Düşük tokluk • Mukavemet, sertlik ve gaz geçirgenliği • Çok yönlü fabrikasyon • Molekül ve hücrelerle uyumluluk • Diğer polimerlerle (doğal/sentetik) modifiye edilebilme • Yüksek yüzey alanı • Doğal ECM mimarisini taklit edebilme (biyomimik)	[157, 158]
Poli Glikolik Asit (PGA)	• Uygulamaya bağlı kolay modifiye edilebilirlik • Yüksek Young modülü • Belirli süreden sonra çekme mukavemeti kaybı • Zayıf çözünürlük • Kopolimer sentezlemeye uygun • Sulu ortamlarda kararsız • Bağışıklık tepkisi (bazı <i>in vivo</i> çalışmalarda)	[159, 160]

Poli Laktik-ko Glikolik Asit (PLGA)	• Biyouyumluluk • Modifiye edilebilir yüzey özellikleri • İlaç salım sistemleri için EMA ve FDA onayı • Kontrollü ve hedefli ilaç salımı	[161, 162]
Poli Kaprolakton (PCL)	• Çok yönlü işlenebilirlik • Mükemmel viskoelastik yapı • Düşük erime noktası • Biyolojik olarak emilebilirlik • Düşük ıslanabilirlik ve hücre bağlanmasında kısıtlılık • Hidrofobik yüzey özelliği	[141, 163]
Poli Etilen Tereftalat (PET)	• Bozunmayan termoplastik polimer yapısı • Suya dayanıklılık • Çoğu gaz ve sıvıya karşı dirençlilik • Suyu absorblama yeteneğinden yoksun • Sabit yükler altında kalıcı deformasyon	[143-147]
Poli Vinil Alkol (PVA)	• Biyobozunur ve biyouyumlu • Sulu ortamlarda jel formuna dönüşebilme • Bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi ve granülom oluşumu gibi ilginç özellikleri içermesi • Kopolimerizasyon özelliği	[164-166]

Akciğer hastalıklarını tedavi etmek için son birkaç on yılda birtakım stratejiler kullanılmıştır. Bunlar arasında akciğer nakli en yaygın tedavi seçeneklerinden biriydi, ancak dezavantajları avantajlarından daha ağır basmıştır. Örneğin yeterli donör organın olmaması, pıhtılaşma sorunları, tüberküloz, diyabet ve yeni akciğerin vücut tarafından reddedilme riski bu yöntemin sınırlamaları arasındadır. Buna karşılık, akut son dönem akciğer hastalığı olan hastaların çözümü olan mekanik ventilasyon ve ekstrakorporeal membran oksijenasyonu, aşırı hava yolu genişlemesi, solunum kas atrofisi ve çok fazla kompresyon nedeniyle yaralanmalara neden olabilmektedir [166-170].

Doku mühendisliği yöntemleri kullanılarak eşleniği olabilecek yeni fonksiyonel dokularının üretilmesi, organ kıtlığının yarattığı soruna olası bir çözüm olarak görülmektedir. Doku mühendisliği, kemik, kırık, karaciğer ve pankreas dahil olmak üzere bir dizi doku için büyük umut vaat etmekte iken akciğer dokusu mühendisliği, sentetik polimer yapı iskeleleri üzerinde hava yolu epitel hücrelerinin geliştirilmesine odaklanan birkaç yayınlanmış raporla sınırlı kalmış, önemli ölçüde ilerleme kaydetmemiştir [167, 168].

Doku mühendisliği ve biyomalzeme araştırmalarındaki son gelişmelerde kilit unsur farklı tip iskelelerin tasarımı olmuştur. Biyoyumluluk, bozunma özellikleri, mekanik, kimyasal ve biyolojik özellikler, yapay biyomalzemelerin kullanımı için temel kriterlerdir. Pulmoner ve nazal yollardan ilaç salımı için nanoteknolojiden yararlanmanın avantajları olarak hedefli ilaç salımı, artan biyoyararlanım, daha az toksisite ve hasta konforu bildirilmiştir [168, 171].

2.5.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Polimerler: PLA ve PCL

Di-laktitten ve çoğunlukla tarım ürünlerinden elde edilen polilaktik asit (PLA), termoplastik lineer alifatik polyester ailesinin bir üyesidir [172]. PLA, ya bir kondenzasyon reaksiyonu ile laktik asitten ya da daha yaygın olarak siklik laktit monomerinin halka açma polimerizasyonu ile sentezlenir. Laktit monomeri üç farklı biçimde bulunur: iki stereoizomer L- ve D-laktit (L- ve D-LA) ve rasemik D, L-laktit (mezo-laktit) formlarıdır. Poli(L-laktid) (PLLA) formu, nispeten yavaş hidroliz hızına sahip yarı kristal bir polimerdir. Medikal, gıda, tarım ve endüstriyel sektörlerde de geniş bir uygulama alanına sahip olan PLA, LA (Laktik Asit) birimlerinin kiralitesi, fiziksel ve mekanik özelliklerin yanı sıra bozunma oranlarını ayarlamak için de bir araç sağlar.

Doku mühendisliğinde en sık kullanılan biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ailesinden olan Poli (laktik asit), ester bağlarının hidrolizi yoluyla bozunmaya uğrar.

Sulu ortamda yarı kristal polyesterlerin bozunması iki aşamada gerçekleşir. İlk aşama, daha az organize olan ve suyun daha kolay nüfuz etmesine izin veren amorf bölgelere suyun difüzyonu ile başlar. İkinci aşama, amorf bölgelerin çoğu bozulduğunda başlar. Hidrolitik saldırı daha sonra kristalin bölgelerin kenarından merkezine doğru ilerler.

Çeşitli çalışmalar, örneğin pronaz, proteinaz K ve bromelain gibi belirli enzimlerin varlığının polilaktidin bozunma hızını artırırken, diğer enzimlerin, örneğin esteraz ve laktat dehidrojenazın bozunma hızı üzerinde hiçbir etkisi olmadığını göstermiştir. %0 ile %99 arasında değişen L tekrar birim içeriğine sahip birkaç polilaktidin enzimatik bozunabilirliği incelendiğinde, proteinaz K'nin PDLLA'ya kıyasla PLLA'yı tercihli olarak bozundurduğu gösterilmiştir [172-174]. Bununla birlikte, saf PLLA'nın yüksek kristallliği bozunma hızını azalttığı bilgisine ulaşılmıştır. En hızlı ağırlık kaybı ve yüzey bozulması, %92 L-birimleri içeren polimer için olduğu gösterilmiştir. Buna göre, proteinaz K'nin D,D bağlarının aksine L,L-, D,L- ve L,D-bağlarını tercihli olarak bozduğu anlaşılmıştır [175, 176].

PLA'nın olası uygulamaları arasında özellikle kâğıt-plastik gıda ambalajı, çocuk bezi, kontamine hastane atıkları gibi toplama ve geri dönüşüme uygun olmayan tek kullanımlık malzemelerdir. PLA polimerleri ayrıca çok çeşitli tıbbi uygulamalarda; biyolojik olarak emilebilir cerrahi sutureler, diş implantları, kemik vidaları ve plakaları, kontrollü ilaç salımı, doku mühendisliği iskeleleri vb. uygulamalarda kullanım alanına sahiptir.

Poli(e-kaprolakton) (PCL) polimeri ise e-kaprolaktonun halka açma polimerizasyonu ile elde edilen bozunabilir bir yarı kristal alifatik polyesterdir. PCL kristalleri yaklaşık 60°C'de erirken amorf bölgeler ise -60°C'de camsı geçiş sıcaklığına sahiptir [177]. Bu koşullar, PCL'yi oda ve vücut sıcaklığında daha elastik hale getirir. PCL'nin fizyolojik bir ortamda su hidrolizi ile bozunduğu bilinmektedir [178, 179]. Genel olarak, bu polimerin daha hidrofobik doğası nedeniyle PCL'nin bozunma hızı PLA'ya kıyasla yavaştır. Bu durum hızlı doku rejenerasyonunun gerektiği durumlarda kullanımını sınırlasa da diğer yandan PCL'yi daha uzun süreli implante edilebilir cihazlar için uygun hale getirmektedir. Bununla birlikte PCL'nin bozunması, lipazlar gibi enzimlerin varlığında katalize edilebilir olduğu gösterilmiştir [177].

2.6. Elektroeğirme Tekniği

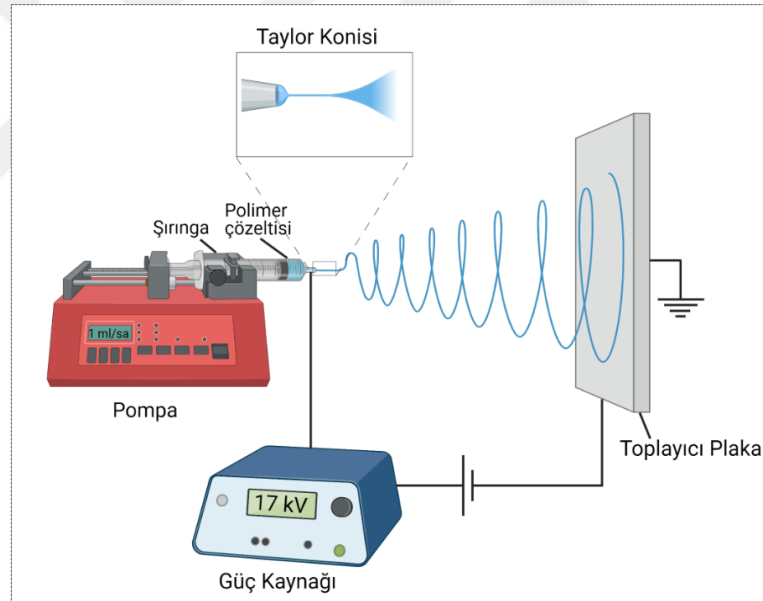
Elektroeğirme, geniş yüzey alanı/hacim oranı ile karakterize edilen ve nano-mikron boyutlu fiberlere sahip yapı iskeleleri üretmek için popüler bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Ayarlanabilirliğinin ötesinde, elektroeğirmenin görece düşük maliyetli ve basit kurulumu, onu iskele üretimi için popüler bir seçim haline getirmiştir [180].

Elektrospun yapı iskelelerinin lifli doğası, doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit etmek için iyi bir yöntem sağlar ve doku rejenerasyonu sırasında hücreler için geçici, işlevsel bir ortam görevi görür. Çok yönlülüğü nedeniyle, elektrospun yapı iskeleleri, vasküler ve deri greftlerinden ilaç salım araçlarına kadar çok çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için araştırma alanı bulmuştur [181].

Elektroeğirme tekniğinde polimerler, yüzey gerilimi ve viskoelastik kuvvetlerin üstesinden gelmek için çok yüksek bir voltaja tabi tutulmadan önce uygun bir çözücü içinde çözülür veya eritilir. Elektroeğirme işlemi, topraklanmış veya zıt yüklü bir kollektörden, belirlenmiş bir mesafeye yerleştirilmiş bir iğne ucundan polimer çözeltisinin pompalanması yoluyla gerçekleştirilir. İğne ucuna bir voltaj uygulandığında, damlacık içindeki elektrostatik kuvvet, iğne ucundaki damlacığın yüzey gerilimini yenerek iğneden bir sıvı jeti püskürmesine neden olur. Elektrik yüklü jet daha sonra,

kollektöre giderken birden fazla genişleyen döngüde hızla çırpılmasına neden olan bir bükülme kararsızlığına maruz kalır. Bu çırpma işlemi, solventin buharlaşmasını kolaylaştırırken mikrometre ve nanometre çaplı liflerin gerilmesine ve incelmesine neden olur. Ortaya çıkan iskele, toplayıcı ve elektroëğirme düzeni tarafından belirlenen geometriye sahip dokunmamış (non-woven) veya rastgele (random) oluşturulmuş bir fiber ağı olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.7). Bu nanolifli yapı iskeleleri, geleneksel yapı iskeleleriyle karşılaştırıldığında hücre bağlanması, göçü, çoğalması ve farklılaşması için daha iyi bir ortam sağlamak için kullanılabilir.

Elektroëğirme işlemi esas olarak (i) polimer moleküler ağırlık, moleküler ağırlık dağılımı ve çözelti özellikleri (örn. viskozite, yüzey gerilimi, iletkenlik) gibi sistem parametrelerinden ve (ii) akış hızı, elektrik potansiyeli, kapiler ve toplayıcı arasındaki mesafe, kollektörün hareketi vb. gibi proses parametrelerinden etkilenir.



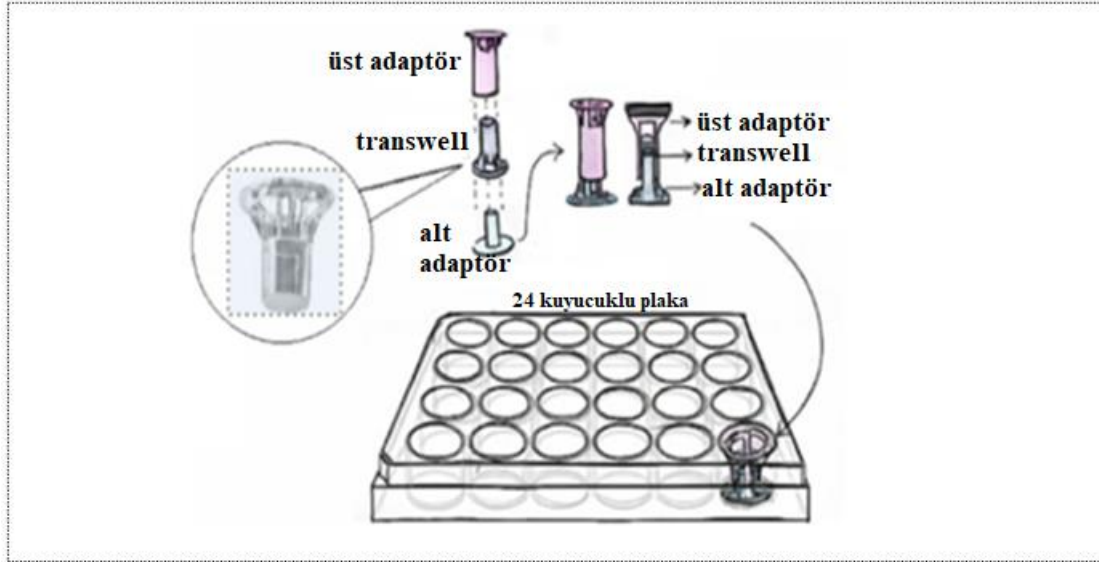
Şekil 2.7. Konvansiyonel bir elektroëğirme düzeneğinin şematik gösterimi

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültür Modeli için Gerekli Adaptörlerin Çizilmesi

Tez çalışmasının ilk kısmında transwellerin 3B kültür sistemlerine dönüşümünün sağlanması amaçlanmıştır. Transwell adaptörlerin çizim işlemleri öncelikli olarak kâğıt üzerinde tasarlanmıştır. Tasarlanan modelin profesyonel çizim işlemleri Solid Works yazılımı (2017 sürümü) ile gerçekleştirilmiştir. Solid Works programı, bilgisayar teknolojisini kullanarak 3B katı model oluşturan bilgisayar destekli tasarım (CAD) ve bilgisayar destekli bir mühendislik (CAE) programıdır.

Tasarımı yapılan bu adaptör modelin ve transwell sistemlerinin birleştirilip 24 kuyucuklu plaka içerisine yerleştirilmiş görüntüsü Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Adaptör modelin 24 kuyucuklu plakada yerleşiminin gösterilmesi

Solid Works yazılımı kullanılarak çizilen modellerin nihai görüntülerine ‘Sonuçlar’ bölümünde yer verilmiştir.

3.2. Çizilen Adaptör Modellerin 3B Yazıcıdan Çıkarılması

Adaptör modellerin 3B yazıcıdan çıkartılması işlemleri SLA (Selective Laser Additive) teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ‘‘Stereolitografi tekniği’’ olarak da adlandırılan bu sistem, bir hazne içerisinde bulunan fotopolimer reçinelerin ışık/lazer kaynağı kullanılarak kürlenmesine (katılaştırılmasına) dayanan katmanlı imalat teknolojilerinden biridir.

Tez çalışmasında kullanılan modellerin baskıları FormLabs (Form 2) fotopolimer sıvı reçineleri (kartuş) kullanılarak alınmıştır. Bu reçineler ince detaylara sahip hassas tasarımların yüksek hassasiyet ve çok yüksek çözünürlüklere ulaşabilmesinden dolayı tercih edilmiştir [182].

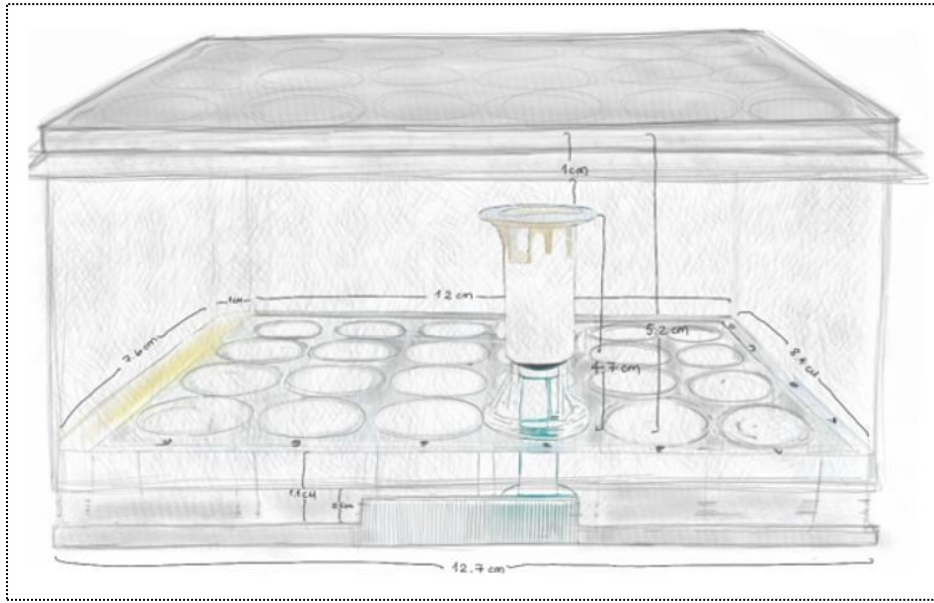
Kullanılan 3B yazıcı ve fotopolimer reçine Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Modellerin 3B yazıcıdan çıkartılması işlemlerinde kullanılan SLA yazıcı (sol) ve fotopolimer sıvı reçine (sağ)

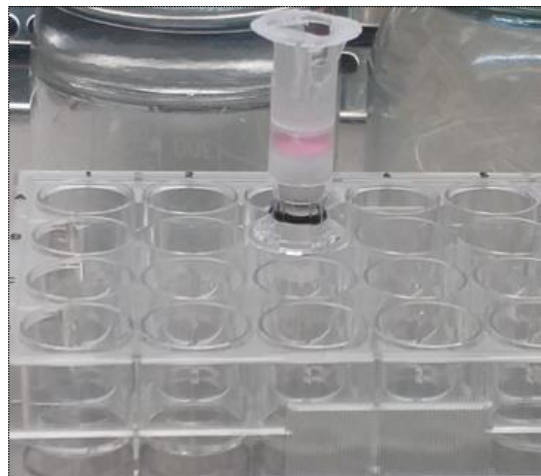
3.3. 24 Kuyucuklu Plaka Kapağının Yeniden Yapılandırılması

Yeni oluşturulan 3B modeller, hücre kültürlerinde rutin kullanılan 24 kuyucuklu plakalara uyumlu hale getirilmesi için modifiye edilmiş ve plaka yüksekliğinin artırılması için ölçümler alınmıştır. Plaka ebatlarıyla uyum gösterecek şekilde en: 7,6 cm; boy: 12 cm ve yükseklik: 5,2 cm olacak şekilde hesaplanıp plaka kapağı yeniden yapılandırılarak çizimler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Transwell insert ve üzerine geçirilen yeni adaptör modelin toplam uzunluğu 4,7 cm olduğundan kapak boyu bu yapıyı içerisine dahil edecek şekilde tasarlanmıştır. Böylece plakanın mevcut kapak boyu 1,0 cm iken 5,2 cm’ye uzatılıp plaka etrafına ek parça getirilmiştir. 24 kuyucuklu plakaya getirilen bu ek parça Solid Works programı ile çizilip 3B yazıcı kullanılarak baskısı alınmıştır.



3.4. 3B Modeller Üzerinde Gerçekleştirilen Sızıntı-Kontrol Çalışmaları

Tasarlanan ve baskısı alınan modeller üzerinde öncelikli olarak sızıntı-kontrol çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak malzemeler 6 kuyucuklu plaka içerisinde sterilize edilmiştir (1 saat %70'lik alkol+15 dk UV+30 dk %70'lik alkol). Modelin montajı yapıldıktan sonra apikal kısımdan 500 µl besiyeri konularak sızıntı olup olmadığı test edilmiştir (Şekil 3.4). Model üzerinden sızıntı kontrolleri 30 dakika, 1,5 saat, 6 saat, 14 saat veya 24 saat sonra bakılarak kontrol edilmiştir. Sızıntı-kontrol çalışmaları her bir modelin baskısı alındıktan sonra aynı şekilde gerçekleştirilmiş olup sızıntı olup olmama durumuna göre diğer modeller tasarlanmıştır.



3.5. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre hatları ve besiyerleri Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre hatları ve besiyerleri

Hücre Kodu	Hücre Adı	Besiyeri
BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™)	İnsan bronş epitel hücre hattı	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM)
A549 (ATCC® CCL-185™)	İnsan akciğer epitel hücre hattı	Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)
CCD-16Lu (ATCC® CCL-204™)	İnsan akciğer fibroblast hücre hattı	Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)
AB0665 (Epithelix)	Astımlı insan bronş epitel hücresi	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM)
L929 (ATCC® NCTC clone 929)	Fare (<i>Mus musculus</i>) fibroblast hücre hattı	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

3.5.1. Akciğer bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B)

BEAS-2B hücreleri sağlıklı bireylerin otopsisinden elde edilen normal insan bronş epitel hücre hattıdır. BEAS-2B hücreleri 75 cm²'lik flasklarda, bronş epitel büyüme besiyerinde (BEGM) (hidrokortizon (0,5 mg/mL), insülin (5 mg/mL), transferrin (10 mg/mL), epinefrin (0,5 mg/mL), triiodotironin (6,5 mg/mL), gentamisin (50 mg/mL), amfoterisinB (50 mg/ mL), retinoik asit (0,1 ng/mL), EGF (epidermal growth factor, 0,5 ng/mL human recombinant), 100 U/mL penisilin, 5% FBS, 100 µg/mL streptomisin içeren) 2-3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler %80-90 kaplama oranına ulaşana kadar 2 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücrelerin dondurulması işleminde ise %5 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %95 serumlu besiyeri kullanılmıştır.

3.5.2. Akciğer epitel hücre hattı (A549)

A549 hücreleri akciğer kanseri olan bir insanın akciğer dokusundan izole edilen akciğer epitel hücre hattıdır. A549 hücreleri %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) içeren

RPMI (L-glutamin) içerisinde 37°C’de, %5 CO² içeren inkübatörde 75 cm²’lik flasklara ekilerek kültüre edilmişlerdir. Hücreler %80-90 kaplama oranına ulaşana kadar 2 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücrelerin dondurulması işleminde ise %5 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %95 serumlu besiyeri kullanılmıştır.

3.5.3. Akciğer fibroblast hücre hattı (CCD-16Lu)

CCD-16-Lu hücreleri sağlıklı akciğer dokusundan izole edilen insan akciğer fibroblast hücre hattıdır. CCD-16-Lu hücreleri %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) içeren EMEM (L-glutamin) içerisinde 37°C’de, %5 CO² içeren inkübatörde 75 cm²’lik flasklara ekilerek kültüre edilmişlerdir. Hücreler %80-90 kaplama oranına ulaşana kadar 2 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücrelerin dondurulması işleminde ise %5 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %95 serumlu besiyeri kullanılmıştır.

3.5.4. Fibroblast Hücre Hattı (L-929)

L-929 hücreleri farenin normal deri altı areolar ve yağ dokusundan izole edilen fibroblast hücre hattıdır. L-929 hücreleri %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM (Lonza Katalog no:12-707F) içerisinde 37°C’de, %5 CO² içeren inkübatörde 75 cm²’lik flasklara ekilerek kültüre edilmişlerdir. Hücreler %80-90 kaplama oranına ulaşana kadar 2 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücrelerin dondurulması işleminde ise %5 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %95 serumlu besiyeri kullanılmıştır.

3.5.5. Astımlı İnsan Primer Bronş Epitel Hücresi (AB0665)

İnsan primer bronş epitel hücreleri 55 yaşında, sigara kullanmayan, Kafkasyalı ve astım hastası bir kadından elde edilmiştir. Astımlı bronş epitel hücreleri 75 cm²’lik flasklarda, bronş epitel büyüme besiyerinde (BEGM) (hidrokortizon (0,5 mg/mL), insülin (5 mg/mL), transferrin (10 mg/mL), epinefrin (0,5 mg/mL), triiodotironin (6,5 mg/mL), gentamisin (50 mg/mL), amfoterisinB (50 mg/ mL), retinoik asit (0,1 ng/mL), EFG (epidermal growth factor, 0,5 ng/mL human recombinant), 100 U/mL penisilin, 5% FBS, 100 µg/mL streptomisin içeren) 2-3 gün süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler %80-90 kaplama oranına ulaşana kadar 2 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır.

3.6. 3B Modellerde Gerçekleştirilen Sitotoksosite (Özüt) Analizleri

Baskısı alınan her bir modelin hücre kültür sistemlerinde değerlendirilmesinden önce malzemenin sitotoksosite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler TS EN ISO 10993-12 *Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi- Numune Hazırlanması ve Referans*

Malzemeler standardı ve ayrıca TS EN ISO 10993-5 Vücut Dışı Sitotoksosite Deneyleri standardı referans alınarak gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla test edilecek malzeme, ISO 10993-12 standardının belirlediği ölçülere göre *standart yüzey alanları ve özüt sıvı hacimlerinin yer aldığı çizelgedeki özütleme koşullarına uygun şekilde hazırlanmıştır. Çizelgeye göre ‘düzensiz şekilli sert cihazlar’ kategorisinde değerlendirilen modelimiz 0,2 g/ml özütleme oranı kullanılarak belirlenen hacimde ve 24 saatlik özütleme süresine tabi tutularak test edilmiştir. (Standartta göre, doku kültürü ortamlarında (24±2) sa süre ile (37±1)°C’deki özütleme sitotoksosite deneyi için kabul edilebilirdir).*

Model üzerinde uygulanacak sitotoksosite analizi L-929 fibroblast hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %80 kaplama oranına ulaşan hücreler pasajlanarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekimi yapılmıştır.

- Özüt analizi yapılacak malzeme öncelikli olarak %70’lik izopropil alkolde 5 dk boyunca bekletilerek steril edilmiştir.
- Ardından PBS ile yıkandıktan sonra temiz cam bir şişe içerisine alınmış ve üzerine serumsuz, antibiyotiksiz besi ortamı eklenerek CO₂ etüvünde 37°C’de, 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- Bu süre sonunda malzeme şişe içerisinden uzaklaştırılarak besi ortamı üzerine yukarıda bahsi geçen oranlarda serum, antibiyotik ve L-glutamin katkısı sağlanarak ekstraksiyon besi ortamı büyüme ortamına dönüştürülmüştür.
- Ardından bu ortam daha önce 24 saat boyunca kültüre edilen 96 kuyucuklu kültür kabındaki hücreler ile numune özütünün 5 farklı derişimi olacak şekilde seyreltilerek (%100; %50; %25; %12,5; %6,25) etkileştirilmiştir.
- Sitotoksosite analizi malzeme yoğunluğuna bağlı olarak gerçekleştirilmiş olup; negatif kontrol olarak hücrelerin çoğaltıldığı büyüme ortamı kullanılmış, pozitif kontrol olarak %20 DMSO çözeltisi tercih edilmiştir.
- 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besi ortamı atılıp, 100 µL serumsuz, antibiyotiksiz besiyeri ve MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol- 2-il)-difeniltetrazolyum bromür) (Katalog no. M2128) ilave edilerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Süre bitiminde kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 150 µL DMSO ilavesi yapılmıştır.

- Plaka 160 rpm’de çalkalayıcı üzerinde 5 dakika bekletilmiş ve 570 nm filtreye sahip mikropilaka okuyucuya (Perkin Elmer, ABD) yerleştirilerek absorbans okuması yapılmıştır. Sonuçlar; pozitif ve negatif kontrolleri de içerecek şekilde malzeme derişimlerini içeren % canlılık değeri üzerinden değerlendirilmiştir.

3.7. Ko-kültür ve Mono-kültür Çalışmaları

Tez çalışmasının ilk kısmını oluşturan 3B modellerde ko-kültür çalışmaları hem geleneksel Corning model hem de yeni 3B adaptör model sistemler ile gerçekleştirilmiş olup kontrol grubu olarak mono-kültür ALI deneyleri yapılmıştır.

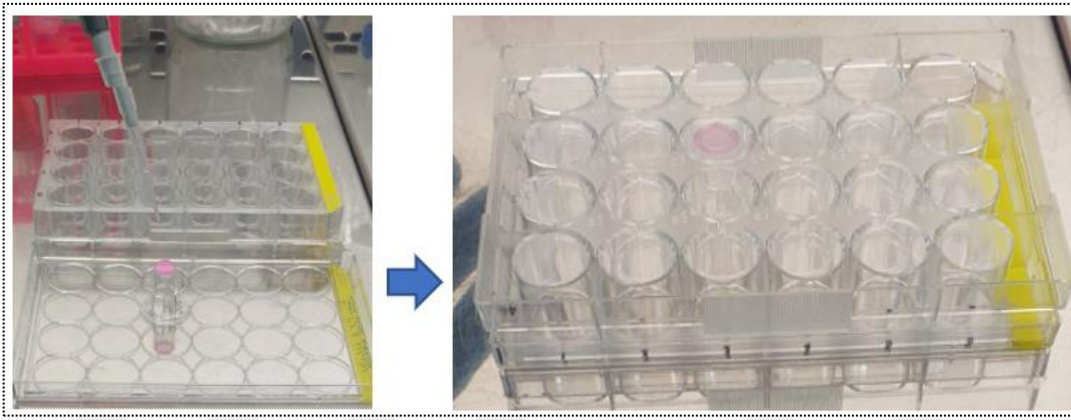
3.7.1. Corning Model ile Gerçekleştirilen Ko-kültür Deneyleri

ALI-kültür uygulamalarında kullanılan Corning firmasının önerdiği ve literatürde kullanılan yöntemle göre de ko-kültür çalışmaları yapıp yeni 3B adaptör model sistemler ile gerçekleştirilen ko-kültür deneyleri ile karşılaştırılmıştır.

Corning firmasının önerdiği sisteme göre deneyin yapılışı

- 24 kuyucuklu plakanın kapağı zemine konulmuş ve üzerine ters çevrilmiş şekilde transwell insert yerleştirilmiştir (Şekil 3.5).
- Ters çevrilmiş olan insert’in üzerine fibroblast hücresi (ATCC® CCL-204™) (pasaj 11) ($1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk) alınarak membranın tam üzerine gelecek şekilde bir damla (50 μ l) bırakılmıştır.
- Plakanın alt gövdesi insert’i kuyucuk içerisinde tutacak şekilde üzerine kapatılmıştır (Şekil 3.5).
- Plaka, sarsmadan alınarak ters bir şekilde inkübatöre yerleştirilmiş ve hücrenin tutunma süresine göre (fibroblast hücreleri için 3 saat) inkübatörde bekletilmiştir.
- Bu süre sonunda plaka inkübatörden alınarak kabin içerisinde ters döndürülerek kapak kaldırılmıştır.
- Bundan sonraki işlemde transwell insert’in apikal kısmına $1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde epitel hücre ekimi gerçekleştirilmiştir; insert apikalden BEGM besiyeri ile bazalden ise EMEM ile beslenerek plaka yeniden inkübatöre alınmıştır.

- Epitel hücreler transwell membran üzerini tamamen kaplayıncaya kadar (2-4 gün) beslemeye devam edilmiştir.
- Epitel hücrelerin membran yüzeyini %100 kaplamasından sonra farklılaştırma prosedürü uygulanmıştır.
- Hava-sıvı arayüzü (ALI) ortamına maruz bırakılmak üzere apikal kısmından besiyeri tamamen uzaklaştırılmış; hücreler sadece bazalden (500 µl) beslenmiştir.
- Epitel hücreler 21 gün boyunca farklılaştırılmak üzere sadece bazalden beslenmeye devam edilmiştir.



Şekil 3.5. Corning sistemi ile gerçekleştirilen ko-kültür deneyinin yapılışı

3.7.2. Yeni 3B Modellerde Gerçekleştirilen Ko-kültür Deneyleri

3B baskısı alınmış adaptör modeller, otoklav ile steril edildikten sonra biyogüvenlik kabini içerisine alınmış ve montajı yapıldıktan sonra (Şekil 3.6) plaka içerisine yerleştirilmiştir.



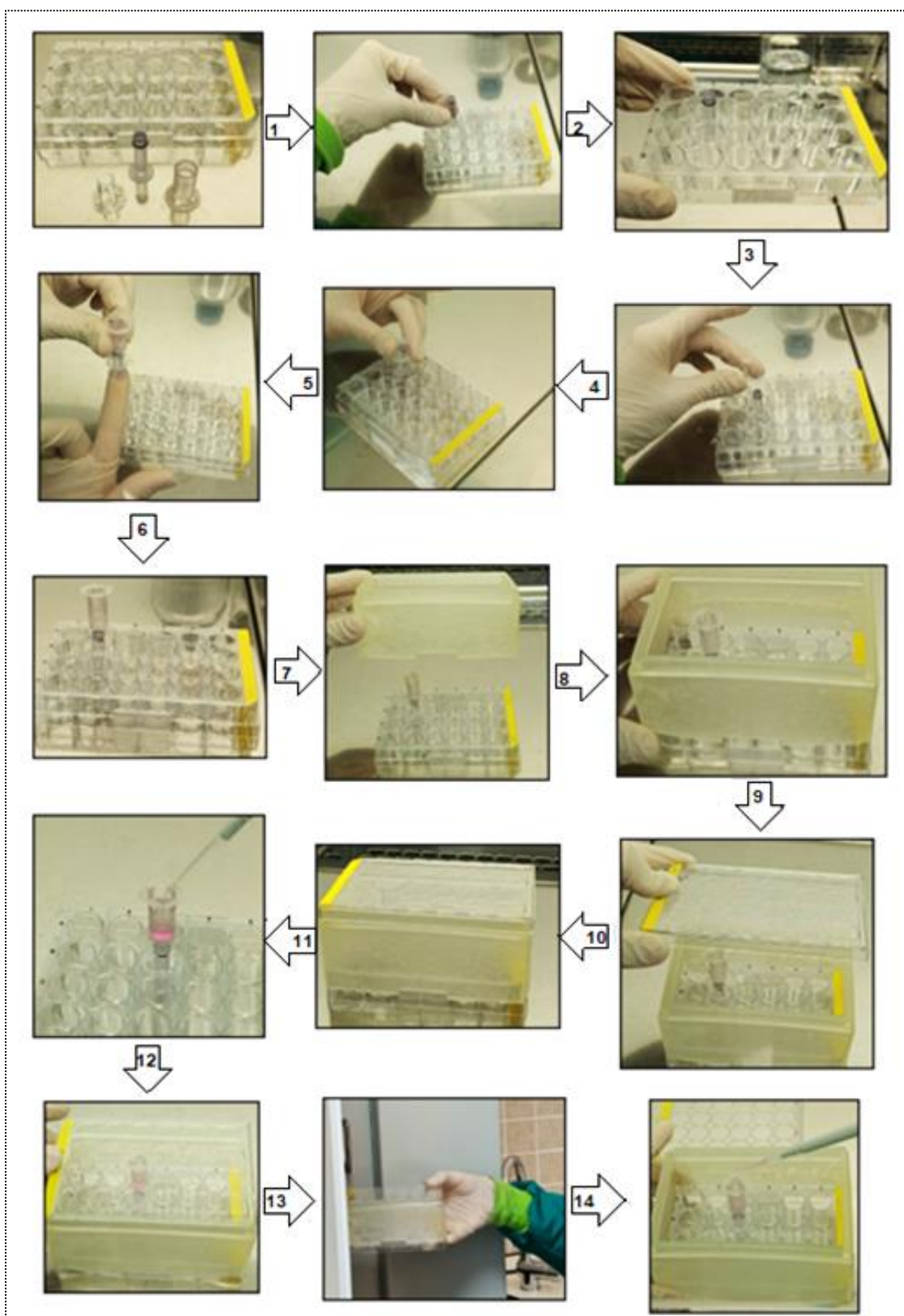
Şekil 3.6. Yeni 3B adaptör modelin kurulum aşamaları. **(a)** 6,5 mm çapına sahip orijinal transwell insert **(b)** Transwell insert'in ters çevrilmiş hali **(c)** b'de gösterilen transwell'in içine geçecek olan ve membranin ters yüzeyine ekim sırasında alt kısma besiyeri geçişini önleyecek sıkıştırıcı aparat (alt adaptör) **(d)** 1-4 mm ölçülerine sahip O-ring sızdırmazlık elemanı **(e)** O-ring'in c'deki alt adaptör girintisine takılmış hali **(f)** Transwell membranin ters yüzeyine hücre ekimi yapıldıktan sonra hücre yapışması ve inkübasyonu sırasında besiyeri haznesini oluşturacak üst adaptör **(g)** Alt-üst adaptör ve transwell'in bir arada kullanıldığı transwell-adaptör sisteminin birleştirilmiş hali

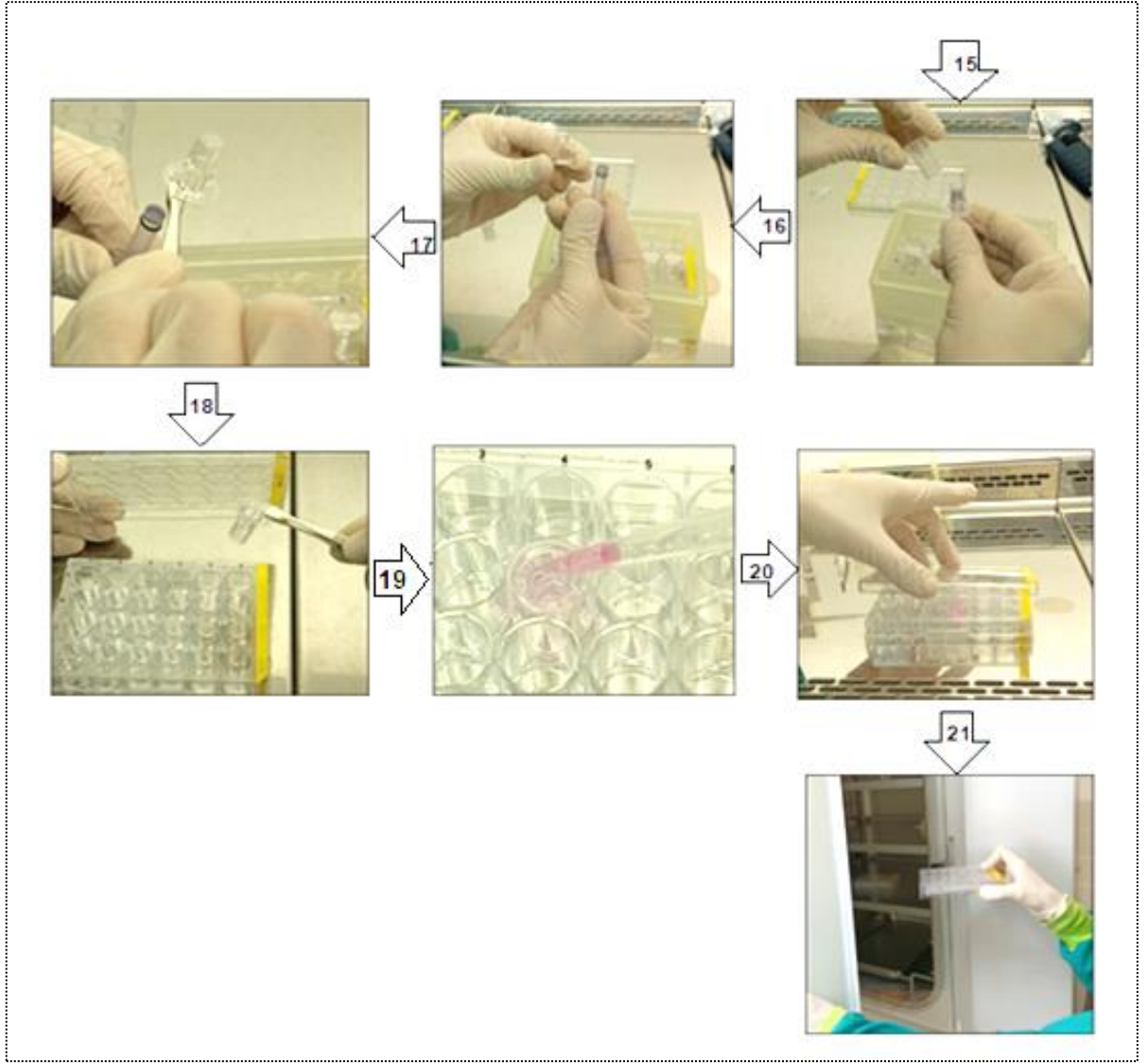
Kurulumu tamamlanan modeller üzerinde hücre ekim (ko-kültür) çalışmalarına geçilmiştir.

Yeni 3B adaptör modellerde ko-kültür deneyinin yapılışı

- Transwell insert, alt ve üst adaptör, O-ring halkası ve 24 kuyucuklu plaka hazırlanarak kabin içerisine alınmıştır.
- 24 kuyucuklu plaka içerisine O-ring takılı alt adaptör yerleştirilmiş ve üzerine üst adaptör takılarak iyice sıkıştırılmıştır.
- Montajı yapılmış tüm sistem plaka içerisindeki kuyucuklara yerleştirilmiştir.

- Plakanın yeni yapılmış ek parçası plaka üzerine oturtularak hazır hale getirilmiştir.
- Ters çevrilmiş transwell membranının üzerine $1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk fibroblast hücresi ekilmiş ve plakanın kapağı kapatılarak inkübatöre yerleştirilmiştir.
- 3-4 saatlik süre sonunda plaka inkübatörden alınmış; modelin üst ve alt adaptörü sistemden sökülerek kaldırılmış ve transwell insert orijinal düz haline getirilerek plaka içerisine yerleştirilmiştir.
- Bu aşamadan sonra transwell üzerine $1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde epitel hücresinin ekimi gerçekleştirilmiştir.
- Transwell insert'in alt kısmında fibroblast hücre için kullanılan EMEM besiyeri; üst kısmında ise epitel hücre için kullanılan BEGM besiyeri konularak inkübatöre alınmıştır.
- Hücrelerin besiyerleri bazalden 500 μ l, apikalden 100 μ l olacak şekilde iki günde bir değiştirilerek çoğalmaları kontrol edilmiştir.
- Transwell insert'ler yüzey alanını tamamen kaplayacak seviyeye geldiğinde farklılaştırma adımına geçilmiştir (Yaklaşık 2-4 gün).
- Farklılaştırma adımı için hücrelerin apikal ve transwell insertin bazal kısmında yer alan besiyerleri uzaklaştırılarak alt hazneye farklılaştırma besiyeri (1:1) eklenmiştir.
- Transwell'in apikal kısmına besiyeri eklenmeden hücrelerin hava yüzeyi ile temas etmesi sağlanmıştır.
- Hücreler 37°C sıcaklıkta, %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortam koşullarında inkübe edilmiştir.
- Farklılaştırma besiyerinin iki günde bir değişimi yapılarak 21 gün boyunca farklılaşma işlemine devam edilmiştir. Yeni 3B adaptör modellerde ko-kültür deneyinin yapılışı Şekil 3.7'de gösterilmiştir.





Şekil 3.7. Yeni 3B kültür sistemi ile gerçekleştirilen ko-kültür deneyinin aşamaları. **(1:** Sistemdeki tüm unsurların deney öncesi hazırlanması (24 kuyucuklu plaka, alt adaptör, üst adaptör, transwell-insert) **2:** Plaka içerisine yerleştirilen alt adaptörün gösterilmesi. **3 ve 4:** Alt adaptör üzerine ters çevrilerek yerleştirilen transwell insert görüntüleri. **5 ve 6:** Transwell insert üzerine geçirilmiş üst adaptör görüntüleri. **7 ve 8:** 24 kuyucuklu plaka etrafına yerleştirilen yeni kapak çerçevesi. **9 ve 10:** 24 kuyucuklu plaka kapağının kapatılması. **11:** Model üzerinden hücre ekiminin gerçekleştirilmesi. **12:** Ekim yapıldıktan sonra plaka kapağının kapatılması. **13:** Plakanın inkübatöre yerleştirilmesi. **14:** 24 saat sonra plakanın inkübatörden alınıp üzerindeki besiyerin çekilmesi. **15:** Üst adaptörün sistemden çıkartılması. **16 ve 17:** Transwell'in alt adaptörden ayrılması. **18:** Transwell-insert'in pens yardımıyla tutulup 24 kuyucuklu plakaya yerleştirilmesi. **19:** Plakanın alt ve üst haznesine (apikal-bazal) besiyeri ilave edilmesi. **20 ve 21:** Kapağın kapatılması ve yeniden inkübatöre yerleştirilmesi).

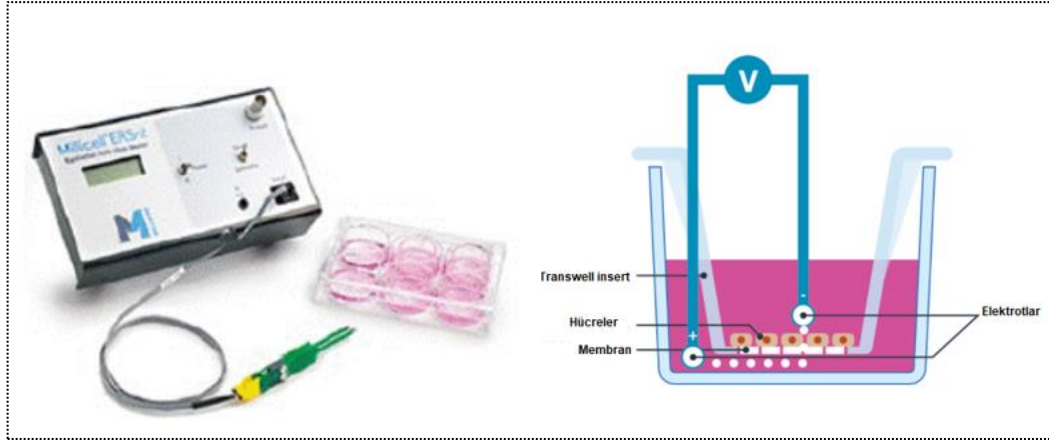
3.7.3. Epitel Hücrelerin Hava-Sıvı Arayüzü (ALI) Yöntemi ile Farklılaştırılması

Tripsin ile kaldırılan epitel hücreleri 0,4 µm por çapına sahip transwell insertler'in apikal kısmına $1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Bu şekilde yaklaşık 3-4 gün süresince kültüre edilen hücreler transwelli tamamen kapladığında üst besiyerleri uzaklaştırılarak transwell'in bazal kısmına 25 µM retinoik asit içeren 1:1 oranında BEGM: DMEM besiyeri konularak farklılaştırmaya alınmıştır. Transwell'in bazal kısmında besiyeri değişimi yapılarak 21 gün süreyle hücreler 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiş ve besiyeri 2 günde bir değiştirilmiştir. 7 günde bir TEER (Transepitelyal Elektriksel Rezistans) ölçümü gerçekleştirilmiş ve 3 hafta boyunca değerler kaydedilmiştir.

3.7.4. Trans-Epitelyal Elektriksel Rezistans (TEER) Ölçümü

Trans-epitelyal elektrik direnci, bir hücresel tek tabaka boyunca elektrik direncinin ölçümüdür ve tek tabakanın bütünlüğünü ve geçirgenliğini doğrulamak için kullanılan çok hassas ve güvenilir bir yöntemdir [183]. Bu teoriye göre direnç, elektrotlara bir doğru akım (DC) voltajı uygulanarak ve elde edilen akım ölçülerek belirlenir. Ohm (Ω) cinsinden ölçülen TEER değerleri hücrelerin bariyer bütünlüğü ile doğru orantılıdır. Örneğin, hücreler çoğaldıkça hücre katmanının sağlam olduğu öne sürülür ve TEER değerleri yükselir. Öte yandan azalan TEER değerleri, bariyer bütünlüğünün bozulduğunun ve/veya sıkı bağlantıların gevşediğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [184].

- TEER ölçümleri bir epitelyal voltmetre (Millicell® ERS-2 Voltohmmeter) cihazı kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 3.8).
- Ölçüm öncesi besiyeri ve PBS, su banyosunda 37 °C'ye ısıtılmıştır.
- Transwell insertine ekilmiş olan hücrelerin üstüne 200 µl PBS eklenerek 5 dakika boyunca etüvde inkübe edilmiştir.
- TEER ölçüm cihazının kısa ucu transwell insertin apikal kısmına, uzun ucu ise transwell'in bazal kısmındaki sıvı içerisine yerleştirilerek iki çember arasındaki elektriksel fark ölçülmüştür.
- Ölçüm sonrasında apikalde bulunan PBS uzaklaştırılmış ve bazal kısmına yeni besiyeri eklenerek etüve kaldırılmıştır.



Şekil 3.8. TEER ölçüm cihazı ve yöntemi

3.7.5. Transwell Membranların Hematoksilen & Eozin Boyama ile Görüntülenmesi

Farklılaştırılan hücre gruplarında çekirdek boyaması yapılmış ve bu amaçla ticari olarak satın alınan “Hematoksilen ve Eozin Boyama Kiti” (ScyTek Laboratories, ABD) kullanılmıştır.

Transwell membranların kesit alınması işleminde kriyostat cihazından (Thermo Fisher Scientific) yararlanılmıştır. Bu amaçla aşağıdaki adımlar gerçekleştirilmiştir:

- Transwell membranlar önce %4'lük paraformaldehit çözeltisi ile fiksede edilmiştir.
- PBS içerisinde %30'luk sükröz çözeltisi hazırlanmış ve membranlar bu çözelti içerisinde 4°C'de gece boyu bekletilmiştir.
- Ertesi gün membranlar %30 sükröz: OCT (1:1) karışımı içerisine aktarılmış ve oda sıcaklığında 1-2 saat inkübe edilmiştir.
- Bu süre sonunda membranlar %100 OCT içerisine aktarılmış ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
- Membranlar 2-4 parçaya bölünerek soğuk metal kasetler üzerindeki %100 OCT içerisine dikey olacak şekilde gömülmüştür.
- Cihaz içerisinde kuru buzda 5-10 dakika bekletilen donmuş örnekler kriyostat cihazı kullanılarak kesilmiştir. 5-10 µm olacak şekilde kesitler alınmıştır.
- Kesitler boyama işlemi gerçekleştirilinceye kadar -20°C'de saklanmıştır.

H&E boyaması kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir:

- Kriyostat kullanılarak kesit alınan lamalar OCT kalıntıları giderilinceye kadar distile su ile yıkanmıştır.
- Kesitlerin üstünü tamamen kaplayacak şekilde hematoksilen boyası uygulanmış ve 3 dakika inkübe edilmiştir.
- Kesitlerde yer alan hücreleri fazla boyadan arındırmak için lamalar distile su ile iki kez durulanmıştır.
- Kesitlerin üzerini tamamen kaplayacak şekilde “Mavileştirme Reaktifi” (Bluing Reagent) solüsyonuyla 10-15 saniye inkübe edilmiştir.
- Lamalar tekrar distile suyla iki kez durulanmış ve %100 alkol içerisine konulmuştur.
- Kesitler sitoplazma boyaması için Eozin Y solüsyonuyla kaplanarak 2-3 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında lamalar %100 alkol içerisinde tutulmuş ve 2 kere %100 alkolden geçirilerek dehidre edilmiştir.
- Lamalar temizlenerek üzerine ksilen (substitute) solüsyonu damlatılmış ve uzun süre korunması için entellan (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile kapatılmıştır.

3.7.6. Transwell Membranların İmmünohistokimya Analizi ile Görüntülenmesi

Epitel hücrelerin farklılaşmış ve farklılaşmadıklarının belirlenebilmesi amacıyla ZO-1, β -Tubulin, E-Kaderin ve MUC5AC proteinleri değerlendirilmiştir. *β -Tubulin IV*, silli epitel hücrelerinin apikal kısmında ifade edilen hücre iskeleti farklılaşma belirteci; *Muc5AC*, goblet hücreleri tarafından ifade edilen bir mukus komponenti; *ZO-1*, epitel hücrelerde bariyer oluşumuna katkıda bulunan sıkı bağlantı proteini; *E-Kaderin* ise hücre adhezyon molekülü ve epitel hücre belirteçidir.

- İmmünohistokimya yöntemi, farklılaştırılan hücre membranlarının bistüri yardımıyla çıkartılıp bir lam üzerine yerleştirilmesi ve bu lamlar üzerinde floresan boyamanın yapılması suretiyle gerçekleştirilmiştir.
- Lamaların etrafı hidrofobik kalem ile işaretlenmiş ve membranlar bu işaretli daire içerisine yerleştirilmiştir.

- Fiksasyon için hücelere 100 µl %4 PFA eklenerek +4°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Fiksatif madde membranlardan uzaklaştırılmış ve 3 kez PBS ile yıkanmıştır.
- Geçirgenliklerinin artırılması için 100 µl %0,2 Triton X-100 + PBS membranların üzerine eklenmiştir ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Triton X-100 uzaklaştırılmış ve 3 kere PBS ile yıkanmıştır.
- Primer antikorlar kullanılan antikor çeşidine göre (ZO-1: 1/50, β-tubulin: 1/50, E-kaderin: 1/250, MUC5AC: 1/50) %1 BSA içerisinde seyreltilmiş ve 100 µl membranlara eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir.
- Primer antikor uzaklaştırılmış ve membranlar 4 kere PBS + %0,2 Triton X-100 ile yıkanmıştır.
- Sekonder antikorlar %1 BSA içerisinde seyreltilerek (primer antikorların seyreltme oranıyla aynı) hazırlanmıştır ve 100 µl lamellere eklenerek oda sıcaklığında 1 saat karanlıkta inkübe edilmiştir.
- Sekonder antikor uzaklaştırılmış ve membranlar 4 kez PBS + %0,2 Triton X-100 ile yıkanmıştır.
- Hücre çekirdeklerinin boyanması için kapatma çözeltisi içeren DAPI boyası (1 µg/mL) kullanılmıştır.
- Membranların üzeri kapatılarak floresan mikroskopta görüntü alınmıştır.

3.7.7. Farklılaştırılan Hücre Gruplarında Yer Alan Genlerin İfadesinin Belirlenmesi

Yeni 3B ko-kültür, Corning model ko-kültür ve mono-kültür yapılarak gerçekleştirilen hücrelerde yer alan genlerin ifadesinin belirlenmesi amacıyla ‘‘Power SYBR Green PCR kiti’’ kullanılmıştır. Kullanılan bu kit ile epitel hücre farklılaşması ile ilişkili 4 spesifik genin ifadesi belirlenmiştir. İnternal kontrol olarak Peptidilprolil İzomeraz-A (PPIA) geni kullanılmıştır. İfadesi belirlenen genler Çizelge 3.2’de belirtilmiştir. Bu amaçla hücrelerden RNA izole edilmiş ve elde edilen RNA’dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.7.7.1. RNA İzolasyonu

- RNA izolasyonu ‘‘E.Z.N.A Total RNA Kit I’’ (Omega Biotek, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- Transwell’lerin üzerindeki besiyeri çekildikten sonra PBS (1X) ile yıkanmıştır.
- %2 β -Merkaptoetanol ilave edilmiş 350 μ l RLT tamponu transwell’lerin apikal kısmına ilave edildikten sonra pipetaj yapılarak parçalanmıştır.
- Temiz ependorfa alınan hücrelerin üzerine DEPC su ile sulandırılmış 350 μ l %70 soğuk etanol ilave edilmiştir. Tüpte oluşan faz ayrımı el ile hafifçe vurularak giderilmiştir.
- Daha sonra bu karışımın tamamı 2 ml’lik toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş kolon içerisine aktarılmıştır.
- Tüpler 10.000 g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır ve üzerine 500 μ l Yıkama Tamponu I (Wash Buffer I) ilave edilmiştir.
- Tüpler 10.000 g’ de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
- Kolon yeni bir toplama tüpü içerisine yerleştirilir. Üzerine 500 μ l Yıkama Tamponu II (Wash Buffer II) solüsyonu ilave edilir ve 10.000 g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır. Üzerine yine 500 μ l Wash Buffer II solüsyonu ilave edilmiştir.
- Tüpler 10.000 g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır. Üzerine hiçbir şey ilave edilmeden tektar maksimum devirde 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon steril 1,5 ml ependorf tüp üzerine alınmış ve üzerine 50 μ l RNaz içermeyen su ilave edilerek maksimum devirde 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen RNA örnekleri mikro-hacim spektrofotometre (Quawell, Çin) cihazı ile ölçülmüş ve kullanılıncaya kadar -80° C’ de saklanmıştır.

3.7.7.2. cDNA Sentezi

- RNA'dan cDNA eldesi için “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Fisher, K1622) kullanılmıştır.
- Kitin içerisindeki tüm reaktifler çözündürülerek kısa süre santrifüj edilmiştir.
- Örnekleri sulandırmadan önce tüm örnek konsantrasyonları eşit olacak şekilde hesaplama yapılmıştır (150 ng’a göre normalizasyon).
- Hesaplanan RNA örneklerinin üzerine totalde 11 µl olacak şekilde distile su PZR tüplerine eklenmiştir.
- Kitin içerisinde bulunan Oligo dT solüsyonundan 1 µl ilave edilmiş ve 65°C’de 5 dakika boyunca PZR cihazında inkübe edildikten sonra 1 dakika buz üstünde bekletilmiştir.
- Bu sırada her bir örnek için 4 µl reaksiyon tamponu, 2 µl dNTP, 1 µl Reverse Transcriptase ve 1 µl Ribolock RI içeren reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlanmıştır.
- 5 dakika bitiminde reaksiyon karışımından örnek başına 8 µl alınarak PZR tüplerine eklenmiştir.
- Hazırlanan PZR tüpleri tekrar termal döngüleyiciye konulmuştur ve cihaz 42°C’de 60 dakika, 70°C’de 5 dakika olacak şekilde ayarlanarak örnekler inkübe edilmiştir.
- Böylece elde edilen cDNA’lar gerçek zamanlı PZR’de kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

3.7.7.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR)

Gerçek zamanlı PZR ile gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla transwell insert’lerde büyütülen ve farklılaştırılan hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmış ve cDNA’ya çevrilmiştir. Bu amaçla Power SYBR Green PCR kiti ABI 7500 fast cihazında kullanılmıştır.

ZO-1 (TJP1) ve E-Kaderin (CDH1) genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile gen ifadelerine bakılmıştır. Kontrol olarak Peptidilprolil İzomeraz-A (PPIA) geni kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR’de kullanılacak genlere özgü primerler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

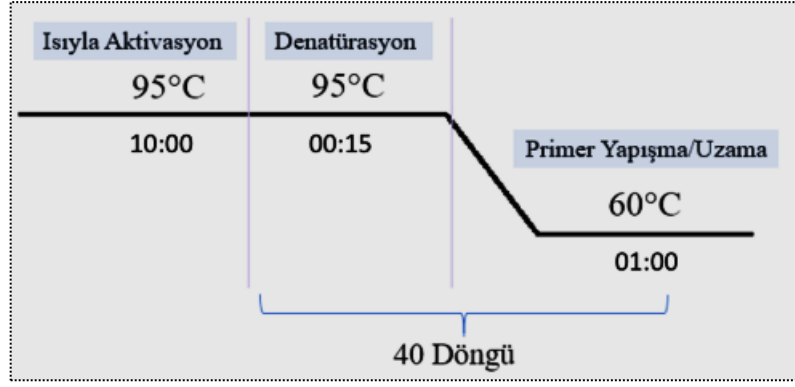
Çizelge 3.2. PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere tasarlanan primer dizileri

Gen-Sembol	İleri (forward) Primer	Geri (reverse) Primer
TJP1	GGGAGCACATGGTGAAGGTA	ATCTTCTCGGTTTGGTGGTCTG
CDH1	CCCAATACATCTCCCTTCACAG	CCACCTCTAAGGCCATCTTTG
PPIA	TCTTTCACCTTTGCCAAACACC	CATCCTAAAGCATACGGGTCC

- Tüm cDNA örneklerinin değerleri en büyük değere göre eşitlenerek hesaplama yapılmıştır. Buna göre örnekler distile su kullanılarak uygun oranlarda seyreltilmiştir.
- Bir örnek için gerekli reaksiyon karışımı; 5 µl 2X SYBR Green, 0,1 µl ileri primer, 0,1 µl geri primer ve 1,8 µl distile su ile hazırlanmıştır (Çizelge 3.3).
- Örnekler belirlenen 96-kuyucuklu plaka düzenindeki yerlerine kuyucuk başına 3 µl olacak şekilde konulmuştur.
- Örneklerin üzerine her kuyucuk için 7 µl hazırlanan reaksiyon karışımı eklenmiştir.
- Şekil 3.9'daki döngü koşullarına göre gerçek zamanlı PZR gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR reaksiyon karışımı

Master Mix İçeriği	Bir Örnek için	13X Total
2X SYBR Green	5 µl	5 µl x 13 = 65 µl
Forward Primer	0,1 µl	0,1 µl x 13 = 1,3 µl
Reverse Primer	0,1 µl	0,1 µl x 13 = 1,3 µl
Nükleazsız Su	1,8µl	1,8 µl x 13 = 23,4 µl



Şekil 3.9. PZR döngü koşulları

3.8. Oluşturulan Ko-kültür Modellerinin Stimülasyonu ve Validasyonu

ALI kültürde oluşturulmuş ko-kültür modelleri, hastalık modelinin taklit edilebilmesi amacıyla epitel hücre sıkı bağlantılarını yaktığı daha önce literatürde gösterilmiş olan alerjenlerden ev tozu akarı (House Dust Mite; HDM) ile muamele edilerek 24 saat uyarılmıştır. Primer bronş epiteli ile oluşturulan 3B transwell sistemleri HDM (Citeq, Hollanda; katalog no: 02.01.85) ile uyarım sonrasında hücre-hücre sıkı bağlantı oluşumunun kontrolü için TEER deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ardından immünositokimya tekniği ile sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1, E-kaderin) boyaması yapılarak validasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Uyarılan Hücrelerde Mitokondriyel Aktivite ve Canlı/Ölü Hücre Tespiti

Epitel hücrelerinin uyarımında uygun doz ve süre belirlemek amacıyla sağlıklı bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B) 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 1, 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında 24 saat HDM uyarımları yapılmıştır. Uyarım sonunda hücre canlılığı testleri (MTT; mitokondriyal aktivite testi ve canlı/ölü hücre boyaması) gerçekleştirilmiştir (n=3). Doz ve saate bağlı hücre görüntüleri incelenerek canlı ve ölü hücreler floresan mikroskopunda tespit edilmiştir. Her bir kuyucuğun en az 5 farklı bölgesinden görüntüler alınmıştır.

3.8.2. HDM ve Sitokinlerle (IL-4 ve IL-13) Uyarılan Hücrelerde Canlı/Ölü Hücre Tespiti

Epitel hücrelerinin HDM ile uyarılması deneyinden sonra ayrıca TH₂ tip sitokinlerden olan IL-4 ve IL-13'ün HDM alerjeni ile 24 saatlik uyarımı yapılarak hücre canlılığı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Uygun doz ve sürenin belirlenmesi amacıyla IL-4+IL-

13 sitokinlerinin yanında 1, 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında HDM uyarımı ve HDM olmadan sadece IL-4+IL-13 uyarımı yapılmıştır. Uyarım sonunda hücre canlılığı testi EtBr/Kalsein AM floresan boyama kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

MTT solüsyonunun hazırlanışı

- MTT tuzu 5 mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde steril PBS içerisinde ışık görmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılarak 50 ml'lik falkonda çözündürülmüştür.
- Hazırlanan solüsyon 0,22 µm'lik filtre kullanılarak süzölmüş ve alikotlanarak daha sonra kullanılmak üzere -20° C'de ışık almayacak şekilde saklanmıştır.

MTT testi

- 96 kuyucuklu plakalara 100 µl'de 1×10^4 olacak şekilde epitel hücre ekimi yapılmıştır.
- Ertesi gün besiyeri uzaklaştırılarak hücreler belirlenen süre ve dozlarda HDM ile inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon süresi sonunda besiyeri uzaklaştırılarak kuyucuklara 100 µl besiyeri koyulmuştur.
- Üstüne 10 µl MTT solüsyonundan (5 mg/ml) eklenerek inkübasyona bırakılmıştır.
- Yaklaşık 3 saat sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve formazan kristallerinin çözünmesi için kuyucuklara 100 µl DMSO eklenmiştir.
- 570 nm'de plaka okuyucuda absorbans değerleri kaydedilmiş ve yüzde canlılık hesaplanmıştır.

Canlı/ölü hücre tespiti

- Canlı/ölü hücre ayırımı için EtBr/Kalsein AM floresan boyama kiti (Biotium Katalog no: 30002-T) kullanılmıştır.
- 96 kuyucuklu plakalara 100 µl'de 1×10^4 olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.
- Ertesi gün kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler belirlenen süre ve dozlarda HDM alerjeni ile inkübe edilmiştir.
- Kit içerisinde yer alan boya stok çözeltileri deney öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir. 10 ml PBS içerisine 5 µl kalsein AM (4 mM) ve 20 µl EthD-III (2

mM) eklenerek 2 μ M kalsein AM/4 μ M EthD-III boyama solüsyonu hazırlanmıştır.

- Serum esteraz aktivitesini kaldırmak için besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır.
- Yıkama sonrası hazırlanan boya çözeltisinden hücrelerin üzerine 50 μ l eklenmiştir.
- Boya eklendikten sonra plaka ışık görmeyecek şekilde alüminyum folyo ile kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda canlı ve ölü hücreler floresan mikroskopunda incelenmiştir.

3.8.3. Tek Tabaka Hücre Kültür Sisteminde HDM ve Th₂ Sitokinlerle Uyarılan A549 Hücrelerinde Sıkı Bağlantıların İmmünohistokimya Analizi ile Tespit Edilmesi

Gerçekleştirilen sitotoksik analizler sonrasında akciğer epitel hücre hattı olan A549 hücrelerinde HDM alerjeni (50, 100 ve 200 μ g/mL) ile IL-4 (25 ng/mL) ve IL-13 (25 ng/mL) sitokinleri kullanılarak uyarım yapılmış ve sıkı bağlantı proteinlerin (ZO-1, E-kaderin) analizi immünohistokimya yöntemi ile floresan mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla çalışma öncelikli olarak yuvarlak lameller üzerine $1,0 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler çoğalıp lamellerin üzerini kapladıktan sonra üzerindeki besiyeri çekilmiş ve konsantrasyonları (1) 50 μ g/ml HDM + IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml); (2) 100 μ g/ml HDM + IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml); (3) 200 μ g/ml HDM + IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml) olacak şekilde uyarım gerçekleştirilmiştir. Plaka 37°C'ye ayarlı inkübatöre koyularak 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonra inkübatörden alınarak lameller üzerinde immünohistokimya analizi yapılmıştır. İmmünohistokimya prosedürü Bölüm 3.7.6.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.8.4. Transwell Sisteminde HDM ve Th₂ Sitokinlerle Uyarılan Primer Akciğer Epitel Sıkı Bağlantıların İmmünohistokimya Analizi ile Tespit Edilmesi

Astımlı primer epitel hücrelerinin ALI kültür koşullarında HDM+IL-4+IL-13 alerjen ve sitokinleri ile uyarılması amacıyla öncelikli olarak $1,2 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde

transwell insertler üzerine ekilmiştir. Hücreler çoğalıp membran yüzeyini kapladıktan sonra farklılaşmaya alınmıştır. 21 gün boyunca bazal kısımdan farklılaştırma besiyeri verilerek farklılaştırılan astımlı primer epitel hücreler, 21.günde transwell insert'lerin apikal kısmına 100 µg/ml HDM ve bazal kısmına da IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml) olacak şekilde uyarımları yapılmıştır. Plaka 37°C'ye ayarlı inkübatöre koyularak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası transwell membranlar üzerinde immünohistokimya analizi yapılmıştır. İmmünohistokimya prosedürü Bölüm 3.7.6.'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.9. Biyobozunur Nanofiber Membranların Hazırlanması ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Tez çalışmasının ikinci kısmını oluşturan nanofiber membranlar elektroegirme tekniği kullanılarak üretilmiştir. Bu amaçla Poli (L-Laktik Asit) ve Poli (e-Kaprolakton) polimerleri kullanılmıştır.

3.9.1. Poli (L-Laktik Asit) (PLLA) Membranların Üretilmesi

Çalışma kapsamında kullanılan PLLA (PL24, Corbion, intrinsik viskozite=1,5-2,0 dL/g) membranlarının hazırlanması ve üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı çözücü ve/veya çözücü sistemleri kullanılmıştır. Çalışmalarda diklorometan (DCM), dimetilformamid (DMF), kloroform ve tetrahidrofuran (THF) çözücülerini kullanılarak literatürde belirlenen derişimlere göre PLLA'nın değişen konsantrasyonlarında çözelti hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan PLLA (Purac-PL24 MA: 290.000-300.000 g/mol, Hollanda) polimeri tartılarak 20 mL'lik cam şişe içerisine alınmıştır. Tetrahidrofuran, dimetilformamid ve kloroform çözücülerini ayrı ayrı kullanılarak %4'lük (a/a) PLLA çözelti hazırlanmıştır. Bunun dışında ikili çözücü sistemleri kullanılarak Kloroform/DMF ve DCM/DMF %4'lük PLLA çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti 50°C'ye ayarlı manyetik karıştırıcıya alınmış ve çözününceye kadar karıştırılmıştır. Yaklaşık 48 saat sonra homojen bir çözelti elde edilmiştir.

Elde edilen bu çözelti 2 mL'lik enjektöre (21G, Genject) alınarak elektroegirme pompasına aktarılmıştır. Pompa üzerinde önce akış hızı belirlenerek polimerik çözeltinin enjektörden sabit bir hızla akıp akmadığı kontrol edilmiştir. Ardından elektroegirme pompası başlatılarak sabit hızda akan polimerik çözeltiye 17kV değerinde bir potansiyel

fark (voltaj) uygulanmıştır. Elektroegirme süreci boyunca DC güç kaynağı (ES30P, Gamma High Voltage) 17 kV’de tutulmuştur. İki bakır plaka üzerinde toplanan fiberlerin toplayıcı plaka üzerinde toplanma süreleri 2, 4 ve 6 saat ile sınırlandırılmıştır. Çalışmalarda uygulanması gereken optimal voltaj, uçuş mesafesi ve akış hızı parametrelerinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiş olup bu parametreler Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.4. %4 (a/a) PLLA-Kloroform çözeltisi için belirlenen sistem parametreleri

Akış Hızı (mL/sa)	0,4		1	
Mesafe (cm)	10	15	10	15
Voltaj (kV)	17		17	
İğne Uç Çapı (G)	21		21	

Çizelge 3.5. %4 (a/a) PLLA-(DCM/DMF) çözeltisi için belirlenen sistem parametreleri

Akış Hızı (mL/sa)	0,4		1	
Mesafe (cm)	10	15	10	15
Voltaj (kV)	17		17	
İğne Uç Çapı (G)	21		21	

3.9.2. Poli (e-Kaprolakton) (PCL) Membranların Üretilmesi

Çalışma kapsamında kullanılan PCL membranlarının hazırlanması ve üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla çalışmalarda DMF ve THF çözücülerini kullanılarak literatürde belirlenen derişimlere göre PCL’nin değişen konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır.

PCL (Purasorb PCL12; Corbion, intrinsik viskozite=1,0-1,3 dL/g) membranının hazırlanması amacıyla %12,5; %15 ve %17,5 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiler Tetrahidrofuran ve Dimetil formamid çözücülerinden birebir oranda karıştırılarak hazırlanmıştır [1:1 THF/DMF (a/h)]. Hazırlanan bu çözeltiler

manyetik karıştırıcıya alınmış ve çözününceye kadar karıştırılmıştır. Yaklaşık 3 saat sonra homojen bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen bu çözelti, önceden kesilip uçları küt haline getirilen insülin enjektörü (26G) ve 2 ml'lik (21 G) şırıngaya alınarak elektroegirme pompasına aktarılmıştır. Pompa üzerinde akış hızı belirlenerek polimerik çözeltinin enjektörden sabit bir hızla akıp akmadığı kontrol edilmiştir. Ardından elektroegirme pompası başlatılarak sabit hızda akan polimerik çözeltiye 17kV'lık bir potansiyel fark (voltaj) uygulanmıştır. Elektroegirme süreci boyunca DC güç kaynağı (ES30P, Gamma High Voltage) 17 kV'de tutulmuştur ve 2, 4 ve 6 saat olmak üzere farklı sürelerde elektroegirme işlemi uygulanmıştır.

3.9.3. Elektroegirilmiş PLLA ve PCL Membranların Karakterizasyonu

3.9.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Elektroegirilmiş PLLA ve PCL membranların morfolojileri, fiber çap kalınlıkları ve dağılımlarının belirlenmesi amacıyla SEM (TESCAN, GAIA3) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla üretilmiş membranlardan 1 cm²'lik örnekler hazırlanarak analiz öncesinde iletken karbon bant (stub) üzerine konularak altın/paladyum (Au/Pd) alaşımı ile kaplanmıştır ve farklı büyütmelerde görüntüler alınmıştır. Kaplama cihazına (Leica EM ACE600) alınan örnekler 4 nm kalınlığında kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobunda incelenmiştir. Elde edilen görüntüler üzerinden rasgele örneklemeler alınarak Image J yazılımı yardımıyla fiber çapları ortalama±standart sapma cinsinden hesaplanmıştır.

3.9.3.2. Membranların Kalınlıklarının Tayini

Toplayıcı plaka üzerinden dikkatli bir şekilde sıyrılarak kaldırılan elektroegirilmiş membranlar 3x3 cm olacak şekilde kesilerek hazırlanmış ve toplam 10 numunenin üzerinden 3 farklı noktadan dijital kumpas (ölçüm aralığı: 0-150mm / 0-6 inç; doğruluk: ±0,03 mm Insize, Çin) kullanılarak kalınlık ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen ölçüm sonuçları ortalama±standart sapma şeklinde kaydedilmiştir.

3.9.3.3. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi

Elektroegirilmiş PLLA ve PCL membranlara ait kimyasal yapı analizlerinin yapılması ve üretim metodundan kaynaklanan olası safsızlıkların belirlenebilmesi amacıyla ATR-FTIR spektrofotometresi (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) kullanılmıştır.

Spektrum 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte kaydedilmiştir ve elde edilen spektrumlar Thermo Electron Corporation, Omnic yazılımı kullanılarak incelenmiştir.

3.9.3.4. Kapiler Akış Porometresi ile Gözenek Boyutunun Belirlenmesi

PLLA ve PCL membranlarının ortalama gözenek çapı ve dağılımının belirlenebilmesi amacıyla Porometre cihazından (Capillary Flow Porometry/Quantachrome 3G, İTÜ/MEMTEK) yararlanılmıştır. Elektroğirme tekniği ile üretilen membranlar örnek haznesinin içini kaplayacak boyutlarda (18 mm) kesilerek porometre cihazına yerleştirilmiştir. Ve belirlenen basınç altında analiz gerçekleştirilmiştir.

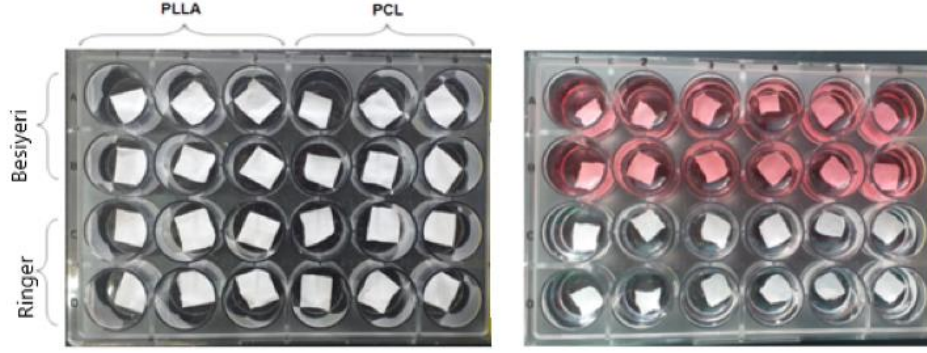
3.9.3.5. Çekme Testi ile Mekanik Dayanım Tayini

Elde edilen membranların mekanik dayanımları 50 N'luk yükleme kapasitesine sahip mekanik test cihazı ile test edilmiştir (Zwick/Roell Z250, Almanya). Bu amaçla, farklı kalınlıklara sahip (3 farklı koşul) elektroğirilmiş membranlar 1x1 cm şeklinde kesilip cihazın kulpları arasına yerleştirilmiş ve mekanik test cihazının germe hızı 10 mm/dk'ya ayarlanmıştır. İşlem sonunda membranların maksimum gerilim dirençleri ve elastik modülleri kaydedilmiştir (n=3).

3.9.3.6. Elektroğirilmiş PLLA ve PCL Membranların Bozunma Davranışlarının Belirlenmesi

PLLA ve PCL membranlarının *in vitro* bozunma testleri için, membranlar 1x1 cm^2 lik kare parçacıklar şeklinde kesilerek hazır hale getirilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce örnekler %70'lik etanol çözeltisi içerisinde 2 saat boyunca steril edilmiş ve etanol kalıntılarının giderilmesi amacıyla 3 kere steril PBS ile yıkanmıştır. Sterilizasyon işlemi sonrası membranlar 24 kuyucuklu plakaya yerleştirilerek enzimatik ve hidrolitik bozunma şeklinde iki gruba ayrılmıştır. Hidrolitik bozunma; 1 mL PBS (0.01M, pH 7,4) ile enzimatik bozunma ise 1 mL Proteinaz-K (2 mg/mL) çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Membranlar çalkalamalı inkübatör içerisinde 37°C sıcaklıkta 28 gün boyunca inkübe edilmiş ve haftada 1 kez inkübasyon çözeltileri yenilenmiştir. Deney süresini tamamlamış malzemeler yıkanıp fazla suyu uzaklaştırılmış ve tartım işlemine kadar inkübatör içerisinde kurutulmuştur. Kuru membran ağırlıkları her hafta 7, 14, 21 ve 28. günlerde inkübatörden alınıp kurutulmuş ve ağırlıkları ölçülerek başlangıç kuru ağırlıklarına göre kütle kayıpları not edilmiş ve % kütle kaybı cinsinden grafiğe aktarılmıştır.

28 günlük bozunma deneyinin dışında membranlar ayrıca ek bozunma testlerine tabi tutulmuştur. Bu amaçla hücre kültür koşullarını birebir yansıtacak şekilde PLLA ve PCL membranları (1) besiyeri ortamında (2) PBS'e göre daha fizyolojik koşulları yansıtan bir çözelti olan Ringer çözeltisi içerisinde 6 ay boyunca inkübasyona bırakarak iki farklı deney seti daha gerçekleştirilmiştir. Deney setinin düzeneği Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. PLLA ve PCL membranlarında besiyeri ve Ringer çözeltisi ortamında degradasyonun başlatılması

3.9.3.7. PLLA ve PCL Membranlarının Sitotoksosite Analizi

Elektroegirilmiş PLLA ve PCL membranlarının *in vitro* sitotoksosite etkilerinin araştırılması amacıyla TS EN ISO 10993-5 *Vücut Dışı Sitotoksosite Deneyleri* ve TS EN ISO 10993-12 *Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi- Numune Hazırlanması ve Referans Malzemeleri* standartları esas alınarak yapılmıştır.

Çalışma kapsamında üretilen malzemelerin sitotoksosite analizleri ISO uzmanlarınca uygunluğu belirlenmiş standart hücre hatlarından biri olan L929 fare fibroblast hücreleri (NCTC clone 929, ATTC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pasaj 35 halinde sıvı azot ortamında saklanan hücreler hızlı bir şekilde 37°C'de çözülüp %10 fetal bovin serumu (FBS) (Biowest, Fransa), %1 Penisilin/Streptomisin (Katalog no. PS-B, Capricorn, Almanya) ve %1 L-glutamin (Sigma G6392) içeren düşük glikozlu DMEM (Katalog no. 12-707F, Lonza) besiyerinde, 75 cm²'lik flasklar içinde, 37 °C'de, %95 O₂ ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. %80-90 üreme yoğunluğuna ulaşan hücreler pasajlanarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucukta 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır.

Sitotoksosite analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla test edilecek malzemeler standarttaki çizelgede belirtilen özütleme oranı ölçülerine göre 2 cm x 6 cm boyutlarında kesilerek hazırlanmış ve %70 (h/h) alkol ile 2 saat steril edilmiştir. Ardından 6 cm²/mL derişiminde olacak şekilde ekstraksiyon (özüt) besiyeri hazırlamak için membranlar üzerine serumsuz

besi ortamı eklenerek 37°C’de, CO₂ etüvünde 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre bitiminde membranlar uzaklaştırılarak ekstraksiyon besiyeri üzerine serum ve antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu besiyerine ekildikten ve 24 saat kültüre edildikten sonra ekstraksiyon besiyerinin hazırlanan farklı derişimleri (%100; %50; %25; %12,5; %6,25) ile muamele edilmiştir (100 µl besiyeri/kuyucuk). Tüm kuyucuklara 10 µl MTT (5 mg/ml) solüsyonundan eklenerek 3 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve formazan kristallerinin çözünmesi için her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiştir. Plaka okuyucuda 570 nm’de absorbans okunmuş ve yüzde canlılık değerleri olarak grafiğe aktarılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olup negatif kontrol olarak hücrelerin çoğaldığı besi ortamı, pozitif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır.

3.9.4. PLLA ve PCL Membranlarda Hücre Kültürü Deneyleri

PLLA ve PCL biyobozunur membranlar üzerinde gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları ko-kültür ve mono-kültür deneyler olarak gerçekleştirilmiş olup farklı hücre ve hücre hatları (insan) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla BEAS-2B sağlıklı bronş epitel hücresi, A549 akciğer kanserli alveolar bazal epitel hücresi, CCD-16Lu sağlıklı akciğer fibroblast hücresi kullanılarak hücre kültürü deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.9.4.1. Biyobozunur Transwell İnsert’lerin Hazırlanması

PLLA ve PCL membranlarda hücre kültürü çalışmalarına geçmeden önce bir dizi hazırlık sürecinden geçilmiştir. Bu amaçla önceden kullanılmış ve işlevi tamamlanmış Corning transwell’ler üzerinde bulunan ve biyobozunur olmayan PET (polietilentereftalat) membranlar bistüri yardımıyla kesilerek yerinden çıkarılmıştır. Membran içermeyen transwell insert’ler %70 etil alkol içerisinde 6 saat tutularak steril edilmiştir. Süre sonunda transwell’ler yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Biyobozunur nanofiberlerin Corning transwell’lere yapıştırılması, biyoyumlu bir yapıştırıcı olan Kwik-sil (silikon elastomer, WPI) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla PLLA ve PCL membranlar yaklaşık 7 mm çapında olacak şekilde yuvarlak diskler halinde kesilerek hazırlanmıştır. Mevcut transwellerdeki biyobozunur olmayan PET membranı, biyobozunur nanofiber membranlar ile yer değiştirilerek manuel olarak yapıştırılmıştır (Şekil 3.11). Transwell’lere yapıştırılan membranlar yine %70 alkol ile sterilizasyon işlemine tabi

tutulmuş ve ardından fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkama yapıldıktan sonra kurutulmuştur.



Şekil 3.11. Biyobozunur membranların transwellere yapıştırılması

3.9.4.2. PLLA ve PCL Membranlarda Hücre Proliferasyonu Analizi

PLLA ve PCL membranlar üzerinde hücre proliferasyonunun olup olmadığı, DNA miktar artışı (ng/ml) üzerinden “CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit” (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Deneyin yapılışı:

- PLLA ve PCL membranlar 96 kuyucuklu plaka ölçülerinde 6 mm’lik yuvarlak diskler şeklinde kesilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan membranlar %70 alkol ile 2 saat steril edildikten sonra PBS ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır.
- Membranların üzerine hücre yapışmasını artırmak amacıyla her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde FBS eklenerek 37°C’de %95 nem %5 CO₂ içeren inkübatörde gece boyu bekletilmiştir.
- Başlangıç hücre konsantrasyonu 1,0x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde CCD 16-Lu fibroblast hücrelerinin ekimi gerçekleştirilmiştir.
- Deney 1., 2., 3. ve 4. günlerdeki hücre proliferasyonunu test edecek şekilde tasarlanmış ve “CyQuant Cell Proliferation Assay” kitine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.
- 4.günün sonunda her bir kuyucuk içerisindeki besiyeri çekilerek 1X PBS ile yıkama yapılmış ve plakalar -80°C’ye kaldırılmıştır.
- Kit içeriğinde belirtilen talimatlara uygun olarak DNA standardı ve çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
- Hücreler, içeriğinde CyQuant GR boyası ve lizis tamponunun olduğu bu çalışma solüsyonu ile muamele edildikten sonra 2-5 dk inkübe edilmiştir.

- Bu süre sonunda floresan mikropilaka okuyucu yardımıyla (eksitasyon:480 nm ve emisyon:520 nm) ölçüm yapılmıştır. Sonuçlar, DNA standart grafiği baz alınarak ng/ml olarak hesaplanmış ve Hücre Proliferasyon Grafiği olarak verilmiştir.

3.9.4.3. PLLA ve PCL Membranlarda Ko-kültür ve Mono-kültür Çalışmaları

PLLA ve PCL membranların transwell insert'lere Kwik-Sil ile yapıştırılmasından sonra membranlar üzerinde hem ko-kültür hem de mono-kültür deneyleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12).

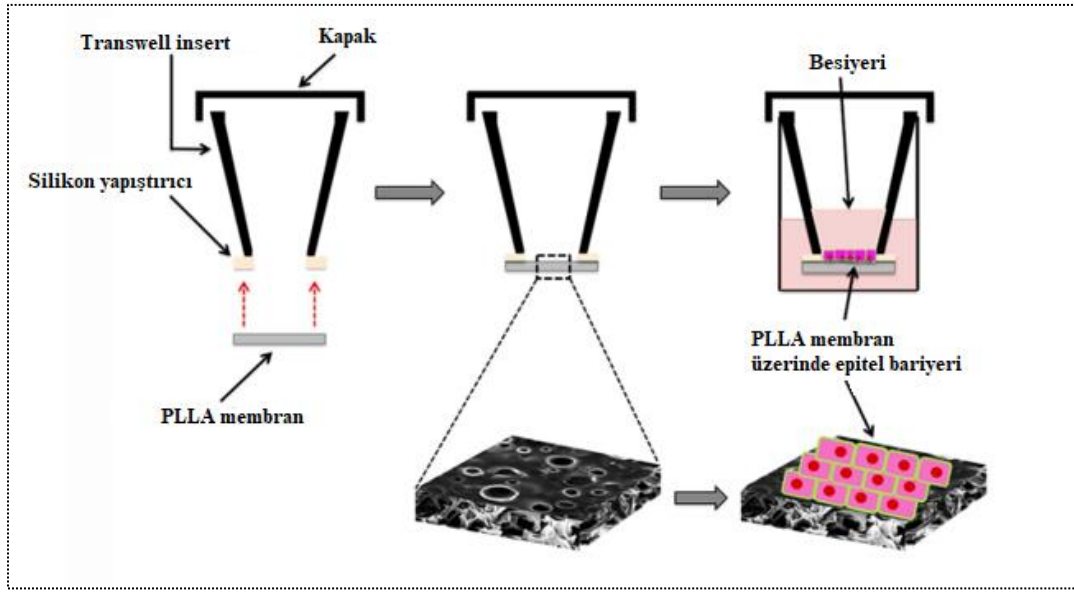
3.9.4.3.1. PLLA ve PCL membranlarda mono-kültür deneyi

PLLA ve PCL membranlar transwell üzerine yapıştırıldıktan sonra 24 kuyucuklu plaka içerisine yerleştirilmiş ve öncelikli olarak üzeri FBS ile kaplanarak serum proteinlerinin membran yüzeyine çökmesi ve membranların daha iyi yapışması için 37° C'de %95 nem, %5 CO₂ içeren inkübatörde gece boyunca tutulmuştur. Ertesi gün flaskı kaplayan epitel hücreler tripsinize edilerek kaldırılmış ve 1,0 x 10⁵ hücre/membran olacak şekilde hücreler membran yüzeylerine apikalden ekilerek inkübatöre alınmıştır. Daha sonra standart ALI kültürü prosedürü uygulanmıştır. 3 gün boyunca bazalden 500 µl; apikalden 100 µl'lik BEGM besiyeri ile beslenen hücreler 3.günün sonunda farklılaşmaya alınmıştır. Bu aşamada apikaldeki sıvı tamamen uzaklaştırılıp hava ortamına maruz kalacak şekilde açıkta bırakılmış ve hücreler sadece bazal kısımdan beslenmiştir. Yaklaşık 25 gün boyunca kültüre edilen hücreler, farklılaşmaya geçildikten sonra 21.güne kadar her hafta 1/7/14/21.günlerde TEER ölçümü yapılmıştır.

3.9.4.3.2. PLLA ve PCL membranlarda ko-kültür deneyi

PLLA ve PCL membranlar transwell üzerine yapıştırıldıktan sonra 24 kuyucuklu plaka içerisine ters bir şekilde yerleştirilmiş ve membranların arka kısımları FBS ile kaplanarak 37° C'de %95 nem, %5 CO₂ içeren inkübatörde gece boyunca tutulmuştur. Ertesi gün flaskı kaplayan fibroblast hücreleri (CCD 16-Lu) tripsinize edilerek kaldırılmış ve 1,0 x 10⁵ hücre/membran olacak şekilde fibroblast hücrelerinin ekimi sağlanmıştır (Şekil 3.12). Membranların ters yüzeylerine önce 20 µl olacak şekilde hücre ekimi yapılarak inkübatöre alınmış ve yarım saatte bir kontrol edilerek yaklaşık 2 saat sonra geri kalan 80 µl'lik hücre süspansiyonu ilave edilmiştir. 2-3 saat sonra plaka ters çevrilerek düz pozisyona getirilmiştir. Bu aşamadan sonra membranların apikal yüzeylerine epitel

hücrelerinin ekimi sağlanmıştır ($1,0 \times 10^5$ hücre/membran). Bu şekilde hem alttan hem de üstten hücre ekilerek ko-kültüre edilen PLLA ve PCL membranlar 3 gün boyunca bazaldan 500 μ l; apikalden 100 μ l'lik BEGM besiyeri ile beslenmiştir. Hücreler 3.günün sonunda farklılaşmaya alınmıştır. Bu aşamada apikaldeki sıvı tamamen uzaklaştırılıp hava ortamına maruz kalacak şekilde açıkta bırakılmış ve hücreler sadece bazal kısımdan EMEM: BEGM (1:1) farklılaşma besiyeri ile beslenmiştir. Yaklaşık 25 gün boyunca kültüre edilen hücreler, farklılaşmaya geçildikten sonra 21.güne kadar her hafta 1/7/14/21.günlerde TEER ölçümü yapılmıştır.



Şekil 3.12. Kwik-sil ile yapıştırıldıktan sonra transwell-membranlar üzerinde mono-kültür ve ko-kültür deneylerinin şematik gösterimi [185].

3.9.4.4. PLLA ve PCL Membranlarda TEER Ölçümleri

PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen Trans-Epityyal Elektriksel Rezistans (TEER) ölçümleri Bölüm 3.7.4. başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.9.4.5. PLLA ve PCL Membranların Hematoksilen&Eozin Boyama ile Görüntülenmesi

PLLA ve PCL membranlarda Hematoksilen&Eozin boyama çalışmaları Bölüm 3.7.5. başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.9.4.6. PLLA ve PCL Membranların İmmünohistokimyasal Analiz ile Görüntülenmesi

PLLA ve PCL membranlarda İmmünohistokimya analizleri Bölüm 3.7.6. başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

3.10. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 9 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Veriler tekrarlı ölçüm yapılan analizler için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile belirtilmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ikiden fazla grup karşılaştırması için iki yönlü ANOVA testi kullanılmış ve p-değerinin 0,05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasının ilk aşamasında ALI kültüründe kullanılmak üzere yeni adaptörler tasarlanmış, çizimleri gerçekleştirilmiş ve 3 boyutlu baskısı alındıktan sonra hücre kültüründe kullanılmak üzere denemeler yapılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak modeller üzerine besiyeri konulup sızıntının olup olmadığı test edilmiştir. Başarısız olan modeller için yeniden tasarımlar yapıp çizimler gerçekleştirilmiştir. Böylelikle 8 farklı modelin baskısı alınıp hem sızıntı denemeleri hem de modeller üzerinde sitotoksiste çalışmaları yapılmıştır. Başarılı bulunan model ile ko-kültür çalışmalarına geçilmiştir. 21 gün boyunca farklılaştırılan epitel hücrelerinde TEER analizleri, immünohistokimya, gerçek zamanlı PZR ve validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında elektroğirme yöntemi kullanılarak PLLA ve PCL membranlar üretilmiştir. Üretilen membranların karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; fiber çap ve dağılımlarının belirlenmesinde SEM analizi, membran kalınlıklarının ölçülmesinde dijital kumpas ölçüm aletinden yararlanılmıştır. Membranlara ait kimyasal yapılarının analizleri ve üretim metodundan kaynaklanan olası safsızlıklar ATR-FTIR yöntemi kullanılarak test edilmiştir. PLLA ve PCL membranların gözenek boyutunun belirlenmesi kapiler akış porometresi ile hesaplanmış mekanik dayanımları çekme testi ile değerlendirilmiştir. *In-vitro* bozunma deneyleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. PLLA ve PCL membranlarının karakterizasyonlarının yapılmasının ardından membranlarda sitotoksiste ölçümleri ve hücre kültürü deneylerine geçilmiştir. Membranlar üzerinde büyütülen ve farklılaştırmaya alınan hücrelerde TEER analizleri, immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilmiştir.

4.1. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültür Modeli için Gerekli Adaptörlerin Çizilmesi

Tez çalışmasının ilk kısmını oluşturan; transwellerin 3B kültür sistemlerine dönüşümünü sağlayan adaptörlerin çizim işlemleri Solid Works yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. İlk tasarlanan adaptör modelin çizimi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

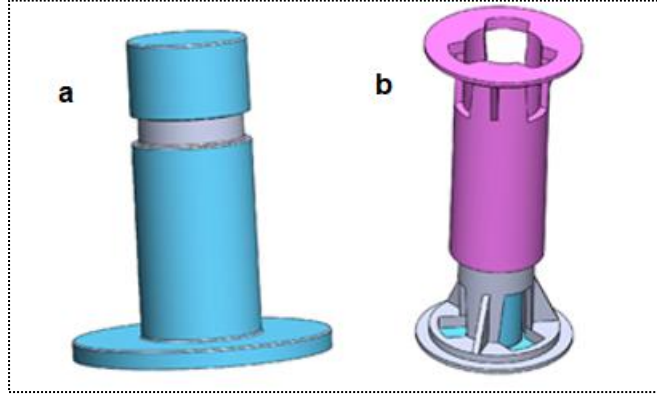


Şekil 4.1. Solid Works programı ile çizilen adaptör modelin bileşenleri. (Model-1) (1) Orijinal transwell, (2) Transwell’in ters çevrilmiş hali, (3) İki numarada gösterilen transwell’in içine geçecek; membranin ters yüzeyine ekim sırasında sızıntı yapmayan, zemine paralel oturan parça (alt adaptör), (4) Ters ekim sırasında transwell’e geçirilen ve transwell’deki üçgen alanlara kadar aşağıya ilerletilecek parça (üst adaptör), (5) Alt-üst adaptör ve transwell montajının dıştan görünümü (2, 3 ve 4 numaralı resimlerin montajı), (6) Alt-üst adaptör ve transwell montajının kesit görünümü.

İlk tasarlanan model, transwell insert’in ters yüzeyine ekim yapıldığında altından sıvı sızdırmayan bir alt adaptör (Şekil 4.1-3); ters ekim sırasında transwell üzerine geçirilen ve belli miktar sıvıyı tutabilecek hacimsel hazneye sahip üst adaptörden (Şekil 4.1-4) oluşmaktadır. Bu amaçla Şekil 4.1’deki gibi ilk model tasarımı gerçekleştirilip çizimler yapılmıştır.

İlk modelin baskı sonuçlarının başarılı olmaması sonucu (bu kısmın detaylarına Bölüm 4.2’de yer verilmiştir) yeni model çizimine gidilmiştir. Şekil 4.2’de Model Tasarımı-2’nin çizimleri görülmektedir. Bu modelde alt adaptör ile transwell arasında oluşabilecek

boşluğun giderilmesi için alt adaptör üzerinde halkasal bir girinti tasarlanmıştır (Şekil 4.2-a). Bu girintiye yerleştirilecek bir O-ring ile sızıntının engellenmesi planlanmıştır.



Şekil 4.2. Adaptör model çizimi-2. Alt adaptör (a), Modelin montajı (b).

Şekil 4.2.'de tasarlanan alt adaptör (a) üzerinde oluşturulan 1-4 mm ölçülerine sahip O-ring sızdırmazlık elemanının yerleştirilebileceği halkasal bir girinti oluşturularak çizimler gerçekleştirilmiştir. Şeklin b kısmında alt adaptör ve ters çevrilmiş transwell üzerine yerleştirilen üst adaptör üzerinde herhangi bir girinti bulunmamakta sisteme birebir uyum sağlayacak şekilde tasarlanıp çizimler yapılmıştır.

Adaptör model çizimi-2'nin baskıdan çıkartılması ve sonrasında denenen sızıntı çalışmaları neticesinde başarılı olamaması (bu kısmın detaylarına Bölüm 4.2'de yer verilmiştir) sonucu yeni model çizimine geçilmiştir.



Şekil 4.3. Adaptör model çizimi-3

Şekil 4.3.'te tasarlanan üst adaptör modelin çentikli yapısı görünmektedir. Soldaki resimde tasarlanan üst adaptör modelinin kesitsel görüntüsüne yer verilmiştir. Böylelikle transwell insert'in içerisine geçirilen üst adaptörün çentikli yapısı sayesinde transwell'i

daha iyi sıkıştırabileceği, böylelikle sızıntının önüne geçebileceği düşünülmüştür. Sağdaki resimde ise üst adaptörün bütün yapısı ve üstten görüntüsüne yer verilmiştir. Adaptör model çizimi-3'ün baskıdan çıkartılması ve sonrasında denenen sızıntı çalışmaları neticesinde başarılı olamaması (bu kısmın detaylarına Bölüm 4.2'de yer verilmiştir) sonucu yeni model çizimine geçilmiştir.



Şekil 4.4. Adaptör model çizimi-4

Şekil 4.4'te üst adaptör üzerinde bu kez tek çentik yerine çift çentik tasarlanıp çizimler gerçekleştirilmiştir. Bu tasarımla birlikte alttaki çentiğin transwell etrafını sararak daha iyi sıkışma sağlaması üstteki çentiğin ise tam transwell membranının bitiş noktasına gelecek şekilde tasarlanıp olası sızıntıyı önlemesi amaçlanmıştır.

Adaptör model çizimi-4'ün baskıdan çıkartılması ve sonrasında denenen sızıntı çalışmaları neticesinde başarılı olamaması (bu kısmın detaylarına Bölüm 4.2'de yer verilmiştir) sonucu yeni model çizimine geçilmiştir.

4.2. Çizilen Adaptör Modellerin 3B Yazıcıdan Çıkartılması

Adaptör modellerin 3 boyutlu yazıcıdan çıkartılması işlemleri Stereolitografi (SLA) 3B baskı teknolojisi kullanılarak sağlanmıştır. Yazıcıdan baskısı alınan ve test edilmek üzere denenen modeller Şekil 4.5; 4.6; 4.7; 4.8; 4.9; 4.10; 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Adaptör Model Çizimi-1'in 3B yazıcıdan çıkartılmış hali

Şekil 4.5'te adaptör model çizimi-1'in 3B yazıcıdan çıkartılmış hali verilmiştir. Ancak adaptör model çizimi-1'in baskısı yapıldıktan sonra üst adaptör ile transwell arasında ve ayrıca alt adaptör ve transwell arasında boşluk olduğu fark edilmiştir. Buradaki açıklığın giderilebilmesi amacıyla alt adaptör üzerine bir girinti verilerek O-ring halkasının yerleşebileceği şekilde ölçümler yapılmıştır. Üst adaptör ölçülerinin ise biraz daha daraltılarak çiziminin yapılmasına ve o şekilde baskısının alınmasına karar verilmiştir. Böylelikle Adaptör Model Çizimi-2 (Şekil 4.6) tasarlanıp baskısı alınmıştır. Model Çizimi-2'ye göre alt adaptör üzerine geçirilebilecek farklı boyutlarda O-ring sızdırmazlık halkaları denenmiş ve en uygun ölçünün O-ring duvar kalınlığı: 1mm halkanın çapı: 4 mm olduğu durumda sağlandığı anlaşılmıştır.

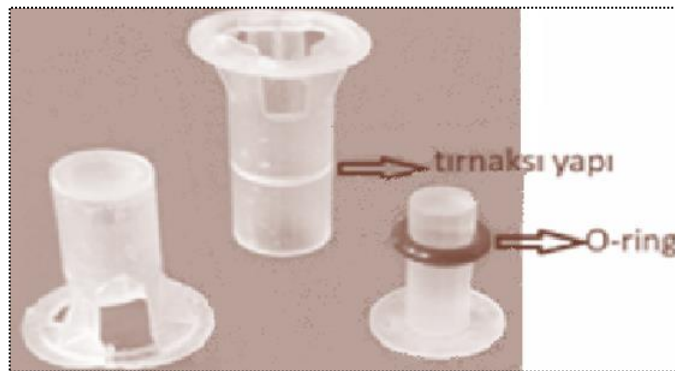


Şekil 4.6. Adaptör Model Çizimi-2'nin 3B yazıcıdan çıkartılmış hali

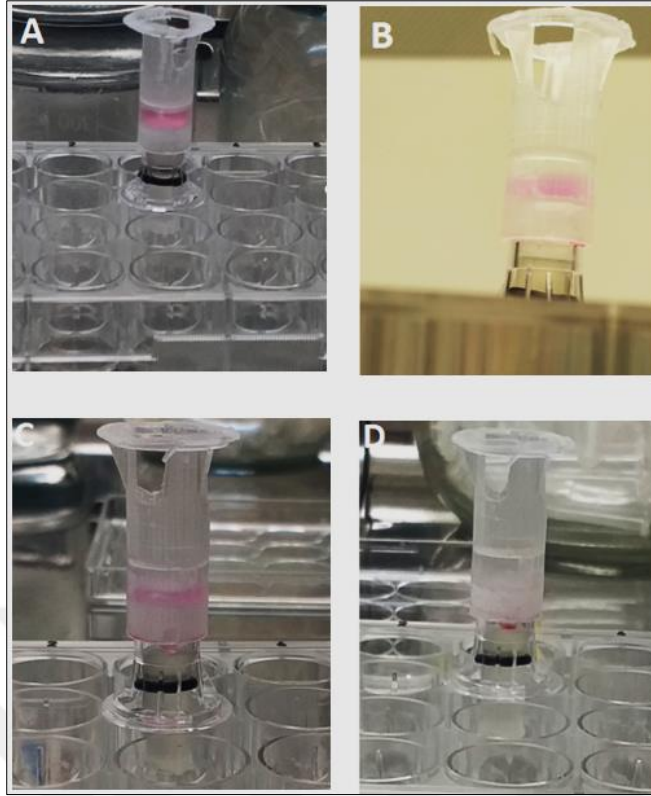
Baskısı alınan modelin sterilizasyon işlemleri ve kurulumu yapıldıktan sonra sızıntı-kontrol çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8'de gösterildiği gibi model 24 kuyucuklu

plaka üzerine yerleştirilmiş ve üstten belli miktarda besiyeri koyularak inkübatöre alınmıştır. Modellerin zamana bağlı sızıntı-kontrol çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8-A'da besiyeri koyulduktan 30 dakika sonrasını göstermekte ve herhangi bir sızıntı olmadığı görünmektedir. B'de modelin besiyeri koyulduktan 1,5 saat sonraki görüntüsü verilmiş olup üst adaptörün altından hafif sızıntı görünmeye başlanmıştır. C'de modelin 6 saat sonraki görüntüsü verilmiş ve alt adaptöre doğru sıvı aktığı gözlemlenmiştir. D'de modelin 14 saat sonraki görüntüsü verilmiştir ve sıvının tamamen aktığı gösterilmiştir. Bu durumda modelin tasarımının işlevsiz olduğu, besiyeri koyulduktan sonra üst adaptörden aşağıya doğru sızıntı yapması dolayısıyla başka bir tasarımın gerçekleştirilmesi gerektiği anlaşılmıştır. Alt adaptörde karşılaşılan sızıntı probleminin O-ring halkasıyla giderilmesinin ardından üst adaptör ve transwell arasında da sızıntı olduğu görülmüştür. Model-1 ve Model-2 denemelerinde karşılaşılan sorun nedeniyle alternatif model tasarımına geçilmiştir ve bu amaçla Model-3 (Şekil 4.3) tasarlanmıştır. Bu modele göre alt adaptöre halkasal bir girinti eklenmesinin yanısıra üst adaptör ile transwell arasındaki boşluğun giderilmesi için de buraya tırnak eklentisi yapılmıştır (Şekil 4.7). Model 1 ve 2'de olduğu gibi yeniden sızıntı-kontrol çalışmaları yapılmıştır.

Model-3 üzerinde gerçekleştirilen sızıntı çalışmaları neticesinde de besiyerinin üst adaptörden aşağıya sızdığı görülmüştür. Bunun üzerine bu modellerde kullanılan polimerden farklı bir polimer kullanılarak aynı tasarım çizimleri üzerinden yeniden 3B baskılar alınmıştır. Dolayısıyla bu iki model arasındaki fark Model-4'te tek tırnak (çentik), Model-5'te ise çift tırnak yapısının olmasıdır.

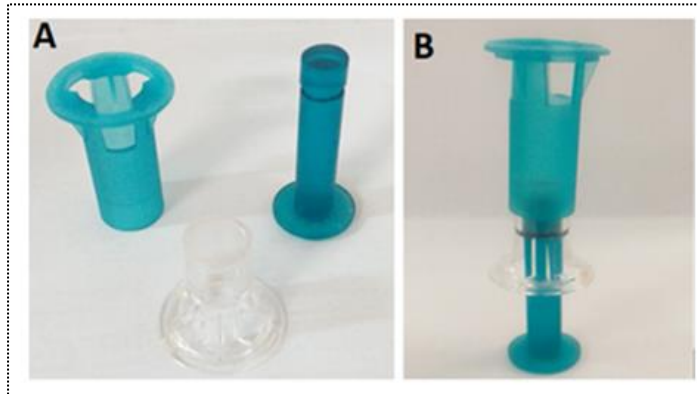


Şekil 4.7. Adaptör Model Çizimi-3'ün 3B yazıcıdan çıkartılmış hali

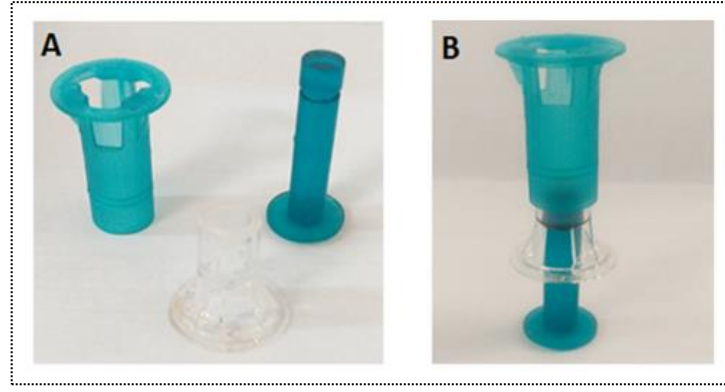


Şekil 4.8. Modellerin zamana bağlı sızıntı kontrolü. A: 30 dk sonra B: 1,5 saat sonra C: 6 saat sonra D: 14 saat sonra.

Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da gösterilen sırasıyla Adaptör Model-4 ve Model-5’in kurulumlarının gerçekleştirilmesinin ardından önceki denemelerde olduğu gibi modeller 24 kuyucuklu plaka üzerine yerleştirilmiş ve yeniden sızıntı-kontrol çalışmalarına tabi tutulmuştur. Ancak hem Model-4 hem de Model-5 üzerinde de başarı sağlanamamış ve üst adaptörden aşağıya sızıntı yaptığı görülmüştür.

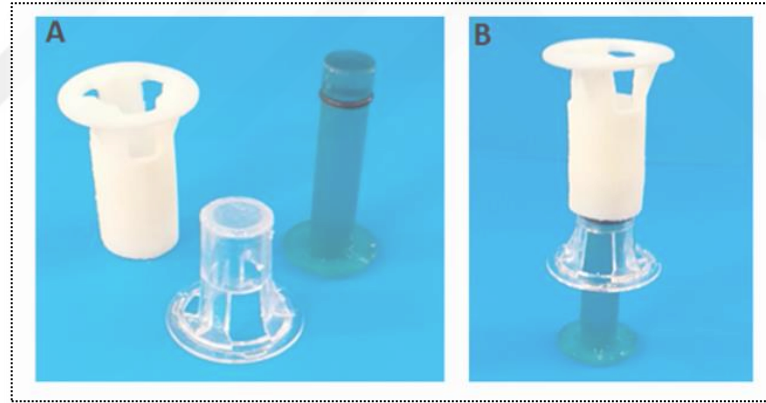


Şekil 4.9. Adaptör Model Çizimi-4’ün 3B yazıcıdan çıkartılmış hali (A). Model-4’ün montajı (B).



Şekil 4.10. Adaptör Model Çizimi-5'in 3B yazıcıdan çıkartılmış hali (A). Model-5'in montajı (B).

Adaptör Model-4 ve Model-5 üzerinde bir önceki modellerdekine benzer nitelikte üst adaptörden aşağıya besiyeri sızıntısının olduğu saptandıktan sonra bu problemin önüne geçmek için silikon türevli bir polimer kullanılarak modelin baskısı çıkartılmış (Şekil 4.11) ve sızıntı deneyleri yapılmıştır. Bu modeller üzerinde gerçekleştirilen sızıntı deneyleri de önceki adımlar (Şekil 4.8) tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.11. Adaptör Model-6'nın 3B yazıcıdan çıkartılmış hali (A) Model-6'nın montajı (B).

Adaptör Model-6 üzerinde yapılan sızıntı çalışmaları sonucunda ne üst adaptörden ne de alt adaptörden kaynaklı bir sızıntının olmadığı gözlemlenmiştir. Sistemin CO₂ inkübatörde 37°C'de 24 saat boyunca akıtmadığı gözlemlenmiştir.

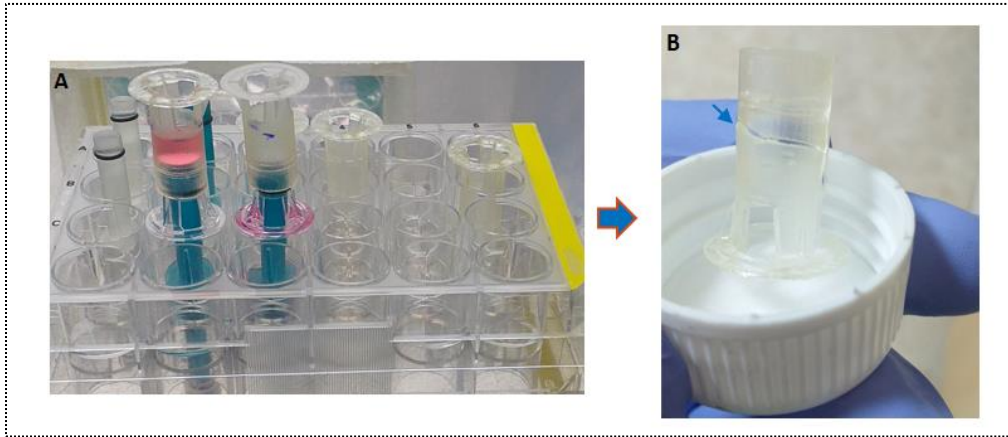
Bu aşamada Adaptör Model-6'nın kullanıldığı polimer yapısının bu sistem üzerinde etkili çalıştığı; ancak polimerin biyoyumlu olmaması sebebiyle biyoyumlu başka bir malzeme arayışına geçilmiştir. Bu amaçla 'dental reçine' (IBT Resin) olarak adlandırılan biyoyumlu malzeme seçilip alt adaptörün girintili, üst adaptörün ise çift çentikli olduğu

model tasarımına göre baskısı alınmıştır. Adaptör Model-7'nin 3B yazıcıdan çıkartılmış hali Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Adaptör Model-7'nin 3B yazıcıdan çıkartılmış hali

Adaptör Model-7 üzerinde uygulanan sterilizasyon ve sızıntı-kontrol çalışmaları neticesinde 24 saat boyunca inkübatör koşullarında tutulan model üzerinde sızıntı olmadığı gözlemlenmiştir. Malzeme, biyouyumlu olması ve sızıntı yapmaması gibi istenen koşulları sağlamış olsa da modelin yeniden sterilizasyona tabi tutulup kullanılması mümkün olmamıştır. Malzemenin 24 saat sonra mekanik dayanımının oldukça azaldığı ve tekrar kullanılması durumunda modelin sızdırdığı ve tamamen parçalandığı görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Adaptör Model-7 üzerinde gerçekleştirilen sızıntı-kontrol çalışmaları (A); Adaptör Model-7'nin 24 saat sonra parçalanma durumu okla belirtilmiştir (B).

Adaptör Model-7'de istenmeyen durumların oluşması neticesinde mekanik dayanımı güçlü ve biyouyumlu başka bir malzeme arayışına geçilmiştir. Bu amaçla 'medikal

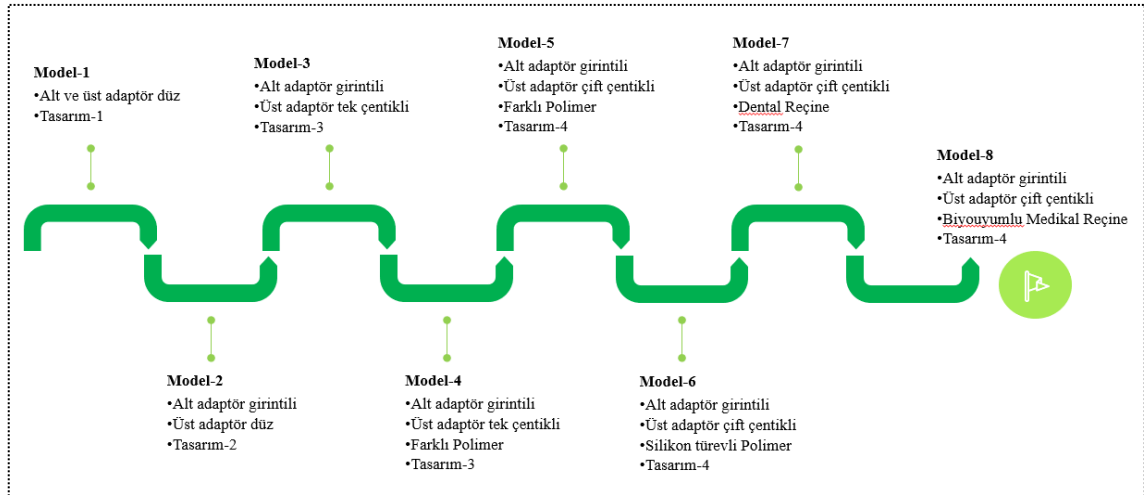
reçine' (BioMed Clear) olarak adlandırılan malzeme seçilerek 3B baskısı yine SLA teknolojisi kullanılarak çıkartılmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Adaptör Model-8'in 3B yazıcıdan çıkartılmış hali

Adaptör Model-8'in 3B yazıcıdan çıkartılmasından sonra sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu malzeme diğerlerinden farklı olarak otoklavlanabilir özellikte olup etilen oksit, e-ışın ve gama sterilizasyonuna uygunluğu kanıtlanmış tıbbi sınıf bir malzemedir [182].

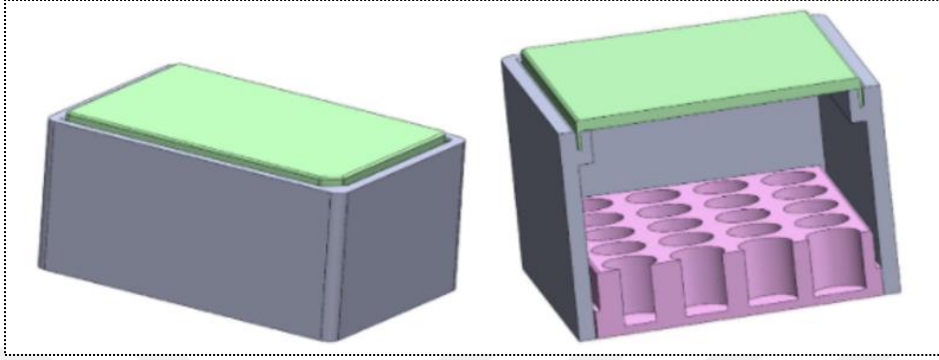
Tasarımı yapılan ve baskısı alınan tüm modellerin olduğu akış şeması Şekil 4.15'te özetlenmiştir. Tüm baskı ve sızıntı çalışmalarının neticesinde başarılı olarak kabul edilen Adaptör Model-8 seçilmiş ve hücre kültürü çalışmalarına bu model ile devam edilmiştir.



Şekil 4.15. Tasarımı gerçekleştirilen tüm modellerin akış şeması ile gösterimi

4.3. 24 Kuyucuklu Plaka Kapağının Yeniden Yapılandırılması

Yeni 3B adaptör modellere uyacak şekilde ölçüleri belirlenen 24 kuyucuklu plakaya getirilen ek parçalar Solid Works programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.16) ve plakanın dış çerçevesi SLA teknolojisi kullanılarak baskısı alınmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. 24 kuyucuklu plakaya getirilen ek parçanın Solid Works ile çizimi

24 kuyucuklu plakaya uyacak şekilde modifiye edilen ve çizimi gerçekleştirilen plakanın ek parçaları 3B yazıcıdan çıkartılmıştır. 24 kuyucuklu plaka kapağının yapılandırılmasında ‘fotopolimer reçine’ (Formlabs standart resin) kullanılmış olup bu malzemenin içeriğini metakrilik asit esterleri ve bazı foto-başlatıcı karışımlar oluşturmaktadır. Sterilizasyon işlemi etil alkol (%70) muamelesi ve UV altında birkaç dakika tutularak gerçekleştirilmiştir.

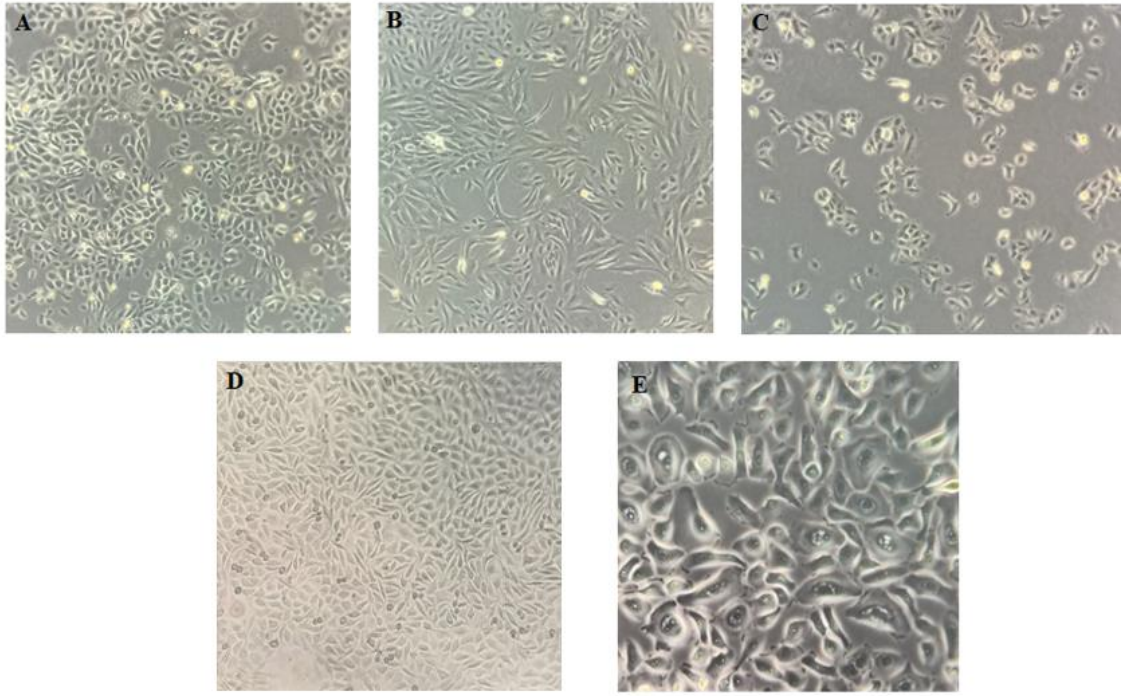
Yeni 3B transwell adaptör sistemleriyle gerçekleştirilen tüm ko-kültür çalışmalarında modifiye edilmiş bu 24 kuyucuklu plakaya uyumlu ek parça kullanılmıştır. Bu parça, deneyler sırasında herhangi bir kontaminasyona sebep olmamıştır.



Şekil 4.17. 24 kuyucuklu plakaya getirilen ek parçanın 3 boyutlu yazıcıdan çıkartılması

4.4. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hücre Hatlarının Pasajlanması

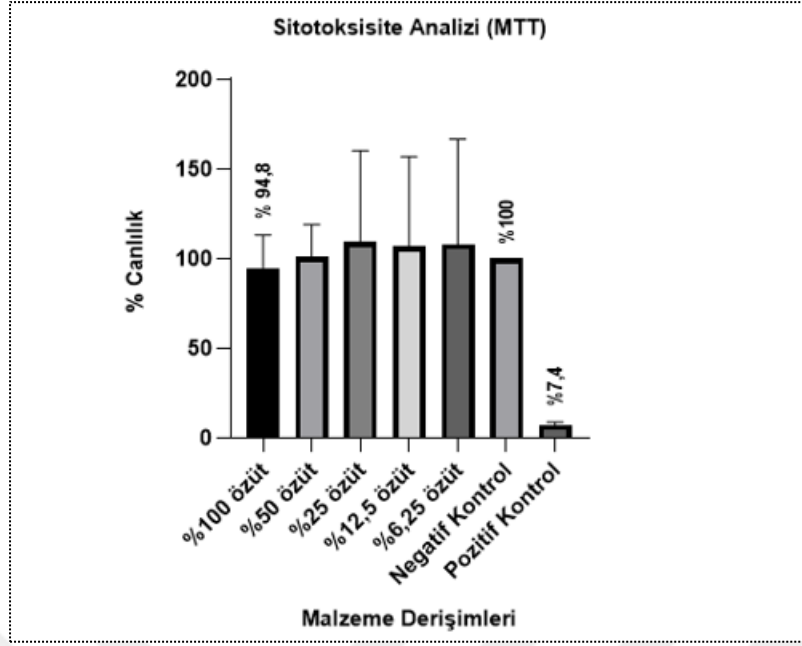
Deneysel çalışmalarda insan akciğer yapısal hücresi olan bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B), insan fibroblast hücre hattı (CCD-16-Lu), insan akciğer alveolar bazal epitel hücre hattı (A549), standart hücre hattı olan fare fibroblast hücresi (L-929) ve astımlı bireyden izole edilmiş primer bronş epitel hücreleri kullanılmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Deneylerde kullanılan hücre hatları ve primer hücreler A: bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B), B: fibroblast hücre hattı (CCD-16Lu), C: akciğer epitel hücre hattı (A549), D: fibroblast hücre hattı (L-929), E: astımlı primer bronş epitel hücre (A, B, C, D: 10X; E: 20X büyütme). E: 20X büyütme.

4.5. 3B Modellerde Gerçekleştirilen Sitotoksikite (Özüt) Analizleri

3B baskısı alınan modellerin hücre kültür sistemlerinde değerlendirilmesinden önce malzemelerde sitotoksikite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler TS EN ISO 10993-12 *Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi- Numune Hazırlanması ve Referans Malzemeler* ve ayrıca TS EN ISO 10993-5 *Vücut Dışı Sitotoksikite Deneyleri* standartları referans alınarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.19. Yeni adaptör modelde (Medikal Reçine) özüt (sitotoksosite) analizi

Yeni biyoyumlu adaptör model üzerinde gerçekleştirilen sitotoksosite analizi sonuçları ISO 10993-5 standardında belirtilen;

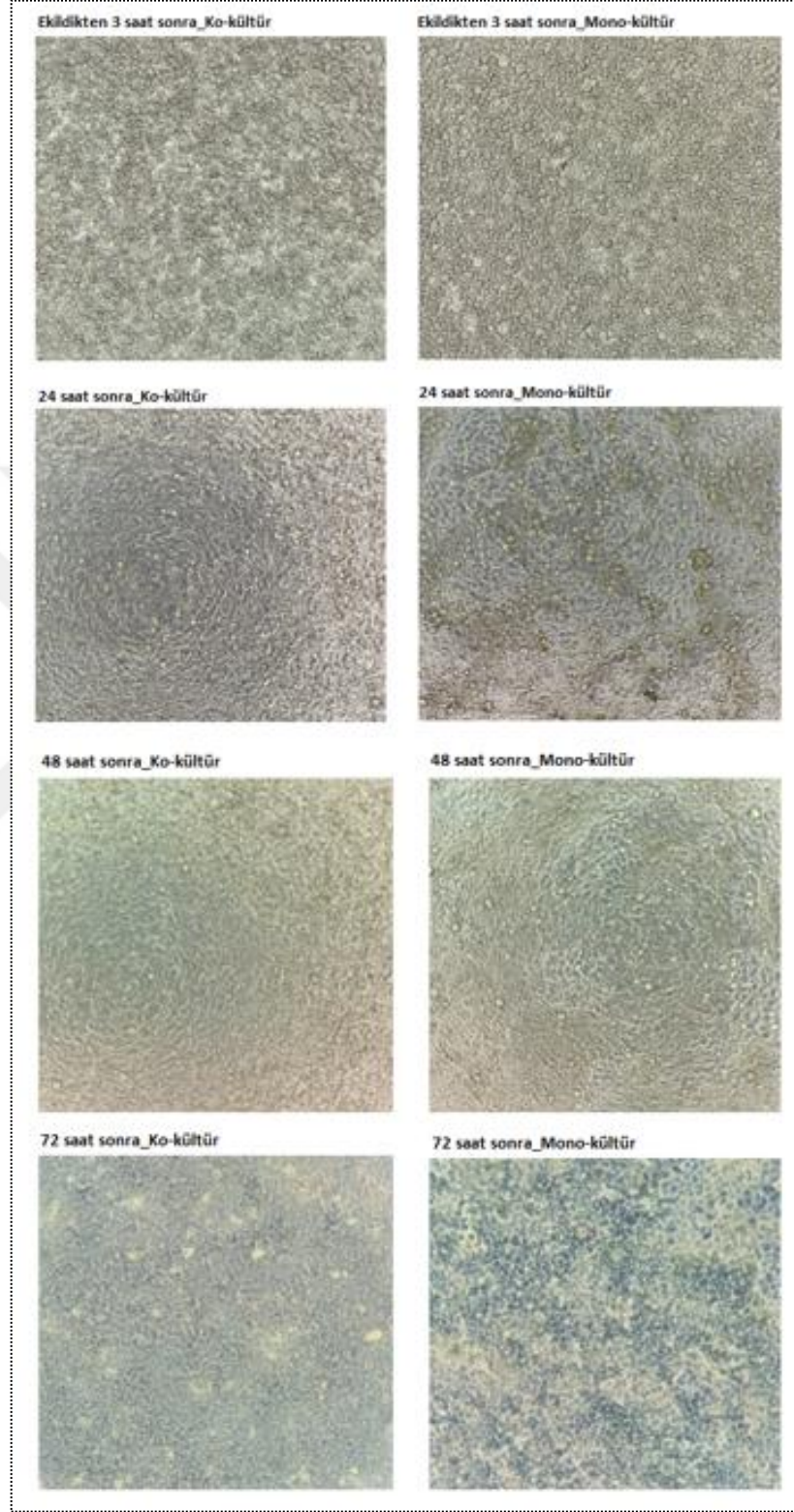
- % canlılık değeri azaldıkça deney numunesinin sitotoksosite potansiyeli artar.
- Canlılık, kör numuneden elde edilen değer %70'inin altındaysa, deney numunesinin sitotoksik potansiyeli vardır. Deney numunesinin %50 özütü, %100 özütü en azından aynı veya daha yüksek bir canlılık göstermelidir. Aksi takdirde deney tekrarlanmalıdır.

Kıstasları baz alındığında, test ettiğimiz numunenin %100 özütünün canlılığı %94,8 olarak hesaplanmış olup sitotoksosite potansiyeli olmadığı yorumu yapılmıştır. %50, %25, %12,5 ve %6,25 özüt değerlerinde ise bu canlılık oranı %94,8'in üzerinde olduğu için malzememizin biyoyumlu ve sitotoksik özellikte olmadığı anlaşılmaktadır (Şekil 4.19).

4.5.1. Ko-kültür Deneyleri

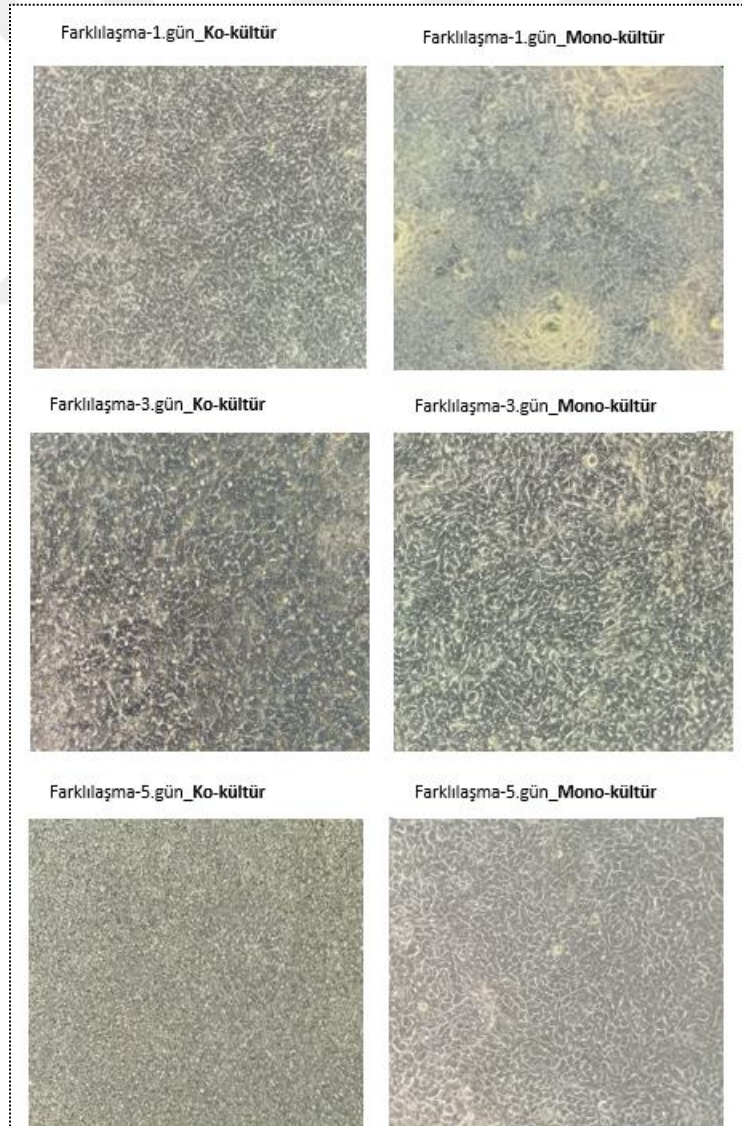
Geleneksel hava-sıvı arayüzü kültür çalışmaları hem Corning firmasının önerdiği hem de yeni 3B adaptör model sistemler ile yapılarak karşılaştırılmıştır. Ko-kültür deneyleri, BEAS-2B sağlıklı bronş epitel ve A549 kanserli alveolar epitel hücre hatlarının kullanılmasının yanı sıra astımlı bireylerin bronşlarından izole edilen primer hücrelerle de gerçekleştirilmiştir. Primer hücreleriyle gerçekleştirilen ko-kültür çalışmaları kontrol

grubu olarak mono-kültürün yapıldığı gruplarla karşılaştırılarak verilmiş ve Şekil 4.20’de paylaşılmıştır.

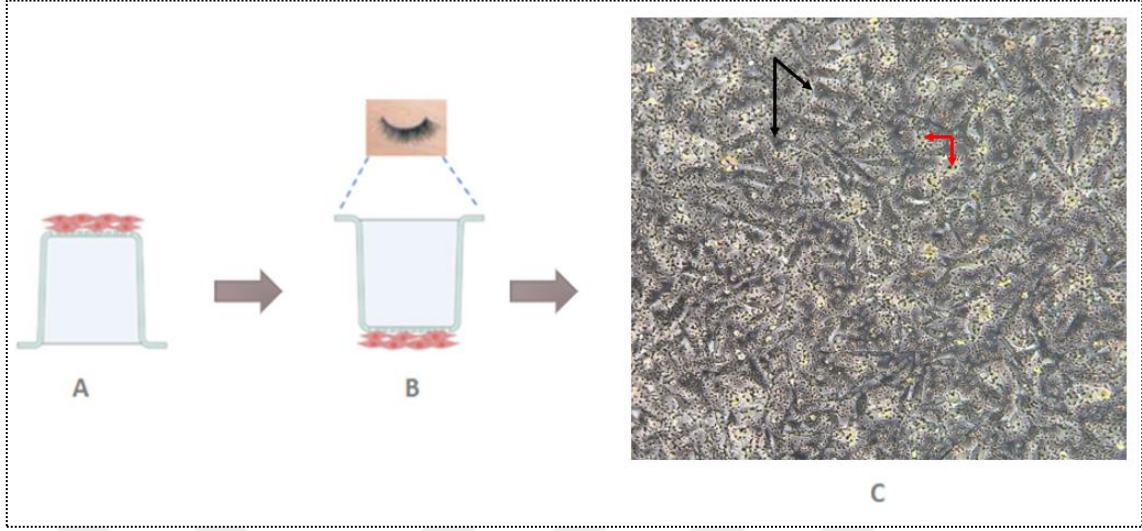


Şekil 4.20 Astımlı primer bronş epitel hücrelerinin ko-kültür ve mono-kültür koşullarında transwell membranda çoğaltılması

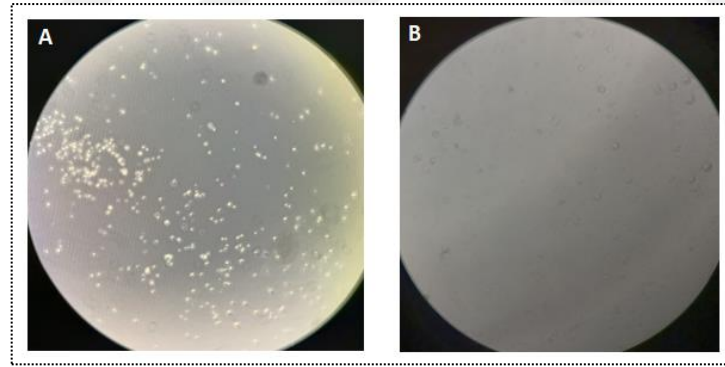
Fibroblast hücreleri transwell membranının alt kısmına (ko-kültür) ve fibroblast hücreleri olmadan (mono-kültür) ekilerek çoğaltılmış ve membran yüzeyini kapladıktan sonra ALI kültür koşullarına alınmıştır. 72 saatin sonunda hücrelerin transwell membranını tamamen kapladığı görülmüştür. Hücreler bu saatten sonra transwell'in sadece altından beslenerek apikal kısmı havaya maruz bırakılarak kültüre edilmiştir [186]. Epitel hücrelerin farklılaştırma işlemi 21 gün boyunca sürdürülmüştür. Kültür süresince hücrelerin gelişimi takip edilmiş ve mikroskopta incelenerek fotoğraf kayıtları alınmıştır (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Farklılaşmaya alındıktan sonra transwell membranının apikal yüzeyinde hiçbir sızıntı meydana gelmemiştir. Bu durum hücrelerin birbirleriyle bağlantıda olduklarını ve sıkı bağlantı yapılarının düzgün şekilde oluşturduklarını göstermektedir Ko-kültür gruplarda membranın altında fibroblast hücre olduğundan dolayı mono-kültürlerin hücre sınırları ko-kültürlere göre daha net görüntülenmiştir.



Şekil 4.21 Astımlı primer bronş epitel hücrelerinin ko-kültür ve mono-kültür koşullarında transwell membranda farklılaştırılması



Şekil 4.22. Transwell membranın altına ekilen (A) ve 4 saat sonra ters çevrilen (B) fibroblast hücrelerinin membran üstünden faz kontrast mikroskop ile görüntülenmesi (C) (siyah oklar: fibroblast hücrelerini, kırmızı oklar membran porlarını göstermektedir).



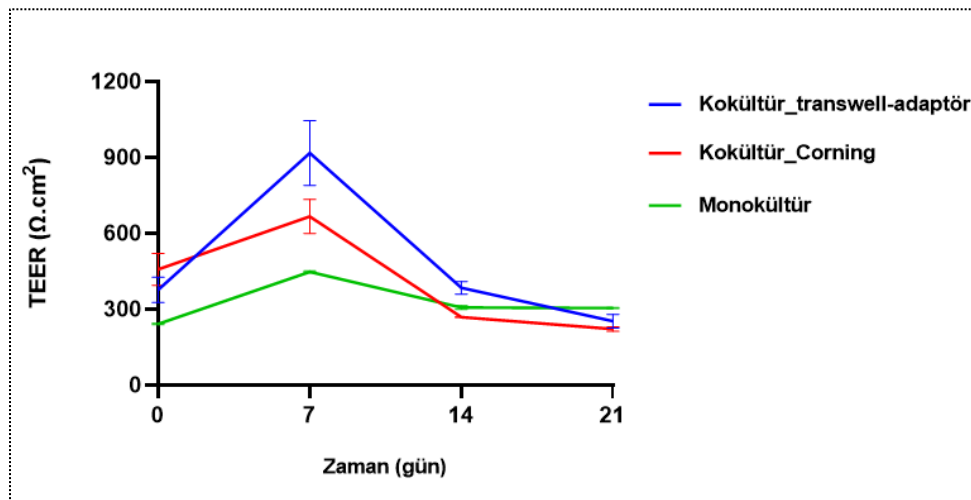
Şekil 4.23. Corning (A) ve transwell adaptör (B) model sistemlerine göre ekilen fibroblast hücrelerinin 4 saat sonra ters çevrildikten sonra membrana tutunmayan hücrelerin görüntülenmesi

Şekil 4.23-A'da Corning firmasının önerdiği şekilde ters çevrilerek fibroblast hücrelerinin ekilmesi sağlanmış ve 4 saat sonra plaka düz haline getirilip transwell membran yüzeyine tutunmayan hücreler kontrol edilmiştir. Şekil 4.23 B'de ise transwell adaptör kullanılarak gerçekleştirilen fibroblastların ekim işlemi sonrası membrana tutunmayıp yüzen hücrelerin olup olmadığı kontrol edilmiştir. Kaydedilen fotoğraflardan anlaşıldığı üzere Corning model ile ekilen hücrelerin yeni transwell adaptör ile ekilen

hücrelere kıyasla daha fazla hücre kaybına neden olduğu, transwell adaptör sistemle gerçekleştirilen ekim yönteminde ise neredeyse hiç yüzen hücrenin olmadığı anlaşılmıştır.

4.5.2. Hava-Sıvı Arayüzü (ALI) Kültür Sistemine göre Farklılaştırılan Hücrelerde TEER Ölçümleri

Ko-kültür çalışmalarına öncelikli olarak sağlıklı bronş epitel hücre hattı BEAS-2B ve sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri olan CCD-16Lu kullanılarak başlanmıştır. Transwell membranının alt kısmına fibroblast hücreleri ekilerek 3-4 saat sonra ters çevrilmiştir. Bu süre sonunda membranın apikal kısmına epitel hücreleri ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Mono-kültür olarak sadece epitel hücrelerin olduğu grup ise kontrol olarak kabul edilmiş ve membranın apikal kısmına sadece BEAS-2B hücreleri ekilmiştir. Ko-kültür grupları hem Corning model ekim yöntemine göre hem de yeni 3B transwell-adaptör model ekim yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Hücreler öncelikli olarak alttan ve üstten beslenmiş, farklılaşma adımına geçildiğinde ise sadece alttan beslenerek üst kısım hava ortamına maruz bırakılmıştır. Farklılaşma adımına geçildikten sonra hücreler 21 gün boyunca kültüre edilmişlerdir. Bu süre içerisinde 0, 7, 14 ve 21.günlerde TEER ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.24'te Corning model, transwell-adaptör model ve mono-kültür ekim yöntemine göre gerçekleştirilen hücrelerin TEER değerlerinin sonuçları paylaşılmıştır.



Şekil 4.24. Epitel (BEAS-2B) ve fibroblast (CCD-16Lu) hücreleri ile gerçekleştirilen 3B kültür modellerinde TEER sonuçları

Şekil 4.24'teki TEER grafiği incelendiğinde Transwell-adaptör modelin Corning model ile gerçekleştirilen gruptakine yakın bir profil izlediği görülmüştür. Transwell adaptör

modelde başlangıç TEER değeri (0.gün) 376 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, Corning modelde 457 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, monokültürde ise 241 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ olarak ölçülmüştür. Devam eden haftalar incelendiğinde 7.gün TEER değerleri transwell adaptör modelde 917 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, Corning modelde 666 ve mono-kültürde ise 447 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ olarak ölçülmüştür. 14.gün TEER değerleri transwell adaptör modelde 384 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, Corning modelde 268 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, mono-kültürde ise 306 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ve 21.gün TEER değerleri transwell adaptör modelde 252 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, Corning modelde 221 ve mono-kültürde ise 304 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ olduğu görülmüştür.

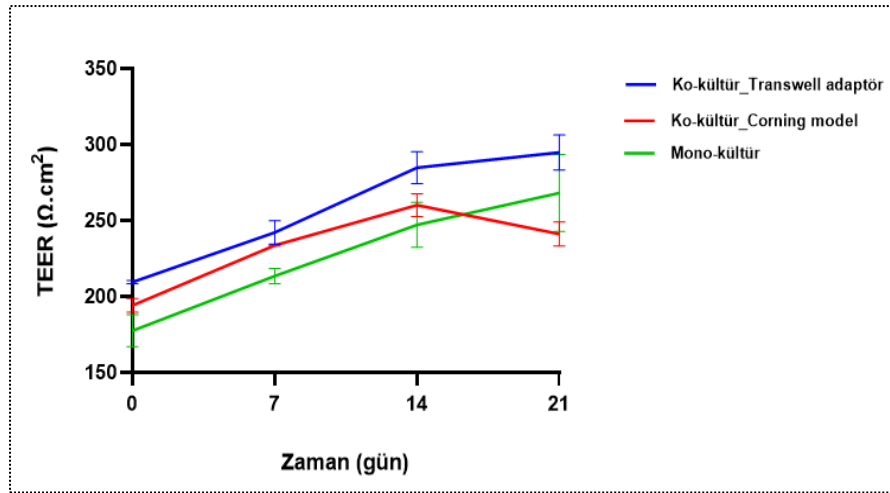
Literatürde BEAS-2B ile yapılan TEER çalışmalarının en fazla 10 güne kadar sürdürüldüğü ve bu hücrelerin transwell'de farklılaşmalarının mümkün olmadığını belirten çalışmalar yer almaktadır [187]. Bu hücre hattının bronş epitel yapısını çalışmak ve ilaç metabolize edici enzimlerin ekspresyonu ve aktivitesini incelemek için çalışıldığı yayınlar mevcuttur [188, 189]. Stewart ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda BEAS-2B hücre hattının polarize olup TJ'ler oluşturmadığı açıkça gösterilmiştir ve *in vitro*'da sadece 100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 'nin altında TEER değerleri elde etmişlerdir [190]. Bu hücre hattının polarize olmayı başaramasa da tütün dumanı, dizel partikülleri veya endotoksin ile muamele sonrası eşlik eden farklı bağışıklık hücreleri üzerindeki epitel etkisini değerlendirmek için bazı ortak kültür çalışmalarında hala kullanılmakta olduğu belirtilmiştir [182, 191, 192].

Akciğer alveolar epitel modeli olarak daha sonra çalışmalara sıklıkla tercih edilen A549 hücre hattı ile devam edilmiştir. A549 hücreleri, tipik olarak insan akciğeri ATII hücrelerinde görülen çok katmanlı sitoplazmik inklüzyon cisimcikleri içermektedir, ancak inklüzyon cisimciklerinin artan kültür süresi ile kaybolduğu görülmüştür [193]. Bunun dışında A549 hücrelerinin sıkı bağlantı yapılarının işlevsel olarak eksik olduğu ve çoğu araştırma grubu, A549 hücre hattının polarize olamayıp fonksiyonel TJ'ler oluşturamadığı sonucuna varmıştır [194-196].

Şekil 4.25'teki TEER grafiği incelendiğinde Transwell-adaptör modelin 21 gün boyunca TEER değerlerinde artış olduğu görülmüştür. Bu süre boyunca ortalama TEER değerlerinin 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 'yi geçmediği görülmüştür. Corning model ekim yönteminde 14.güne kadar TEER değerlerinde artış olmuş 14.günden sonra hafif bir düşüş olmuştur. Mono-kültürlerde ise transwell-adaptör modelinkine benzer şekilde 21 gün boyunca artış gözlenmiş ancak değerler ko-kültür gruplarına göre daha düşük TEER eğilimi göstermiştir (Şekil 4.25). Literatüre bakıldığında A549 hücre hattının en büyük eleştirilerinden biri, bu hücrelerin geçirgen destekler üzerinde oluşturduğu tek

tabakaların, yalnızca transepitelyal elektrik direnci (TEER) temelinde değerlendirildiğinde diğer geleneksel hücre hatlarından çok daha sızdıran bir yapı sergilemesidir. Tip II pulmoner epitel hücrelerinin primer kültürleri için rapor edilen TEER değerleri, $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ kadar yüksek olarak belirtilmiş iken diğer çalışmalar A549 hücreleri için $300\text{--}700 \Omega \cdot \text{cm}^2$ TEER değerleri bildirilmiştir [197]. Bununla birlikte, A549 hücrelerinin, dezmozomlar ve zonula okludens gibi belirli TJ ve yapışma proteinlerini, yüksek TEER değerleri elde eden 16HBE14o hücrelerinden bile daha fazla eksprese ettiği görülmüştür [196]. A549 hücrelerinin polarize olamaması, diğer hücre hatları ile karşılaştırıldığında 2 kat daha yüksek olduğu bildirilen protein ve dekstran geçirgenliğini de etkilediği görülmüştür [198]. Papazian ve arkadaşlarının yayınladığı bir raporda A549 hücre hattının polarize olabileceğini düşündüren tek rapor olduğundan ve bildirilen TEER ölçümlerinin yanıltıcı olabileceğinden söz etmişlerdir [187]. Bu gruptaki araştırmacılar hem okludin hem de E-kaderinin A549 hücreleri tarafından eksprese edildiğini göstermişlerdir; ancak bu ifadenin nispeten düşük olduğunu Calu-3 ve 16HBE14o– hücre hatlarında görüldüğü kadar lokalize olmadığını da belirtmişlerdir [194, 199].

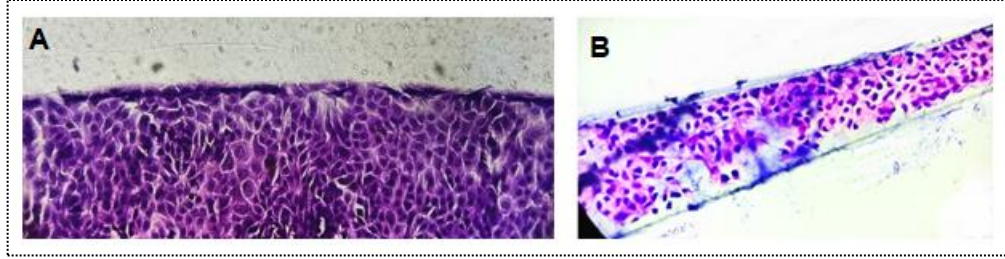
Sınırlamalarına rağmen, A549 hücre hattının hücre polarizasyonunu kolaylaştırdığı ve sıklıkla diğer epitel hücre tiplerinin eklenmesiyle birlikte ko-kültür çalışmalarında hala kullanılmakta olduğunu ifade etmişlerdir [200].



Şekil 4.25. Epitel (A549) ve fibroblast (CCD-16Lu) hücreleri ile gerçekleştirilen 3B kültür modellerinde TEER sonuçları

4.5.3 Transwell Membranların Hematoksilen & Eozin Boyama ile Görüntülenmesi

ALI kültür yöntemi ile Transwell-adaptör modeli kullanılarak çoğaltılan hücrelerin membran yüzeyine etkin bir şekilde tutunup çoğaldığını göstermek için Hematoksilen & Eozin boyama yapılmıştır. Deney sonuçları Şekil 4.26’da paylaşılmıştır.

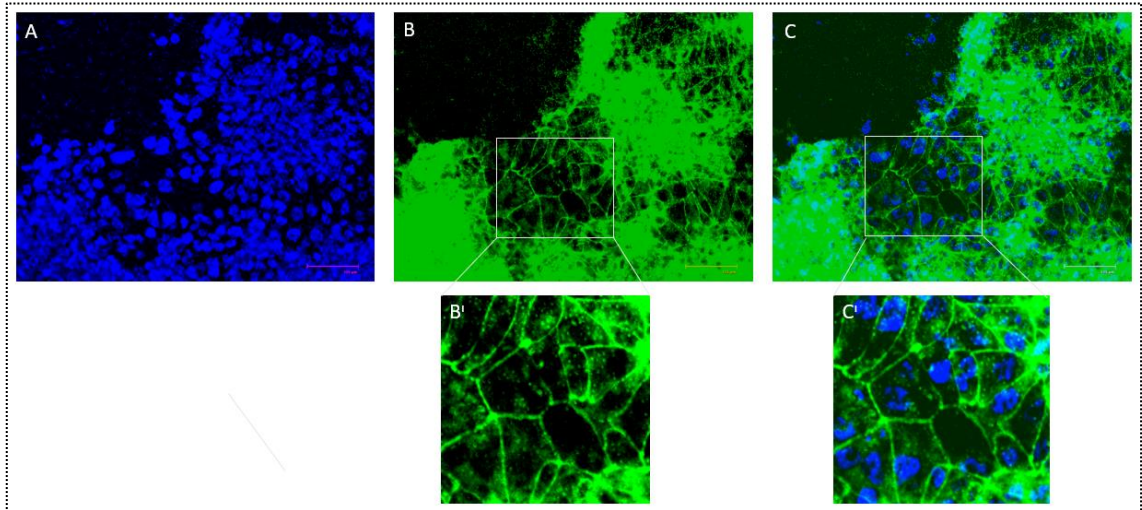


Şekil 4.26. Transwell-adaptör modeli kullanılarak farklılaştırılan epitel hücrelerinde H&E boyama (A) yatay kesit, (B) dikey kesit

Yatay ve dikey kesit alınarak boyama sonrası elde edilen görüntülerde hücrelerin canlılıklarını koruyarak etkin bir şekilde çoğaldığı ve epitel tabakalaşmanın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26).

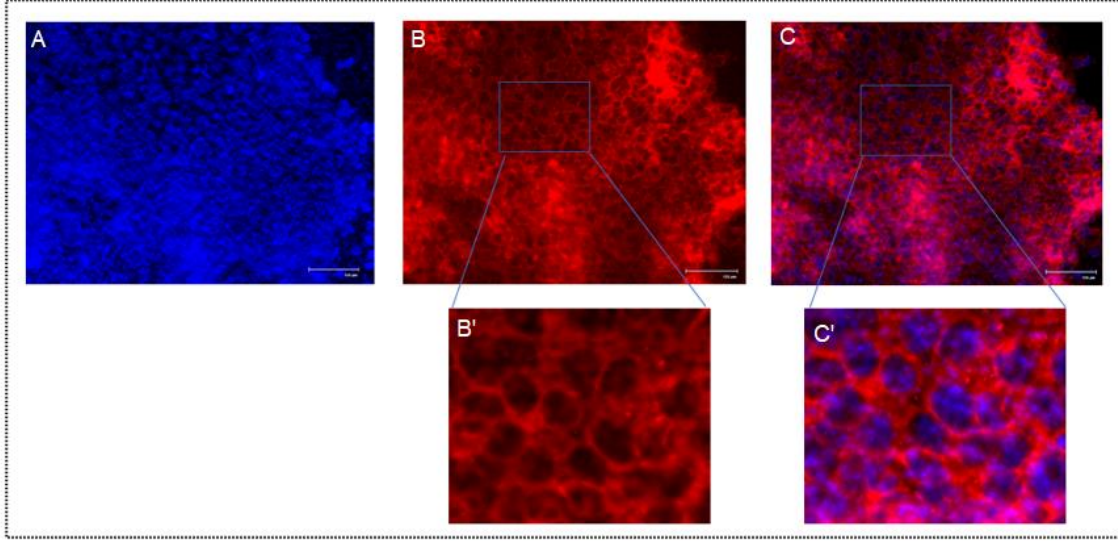
4.5.4. Transwell Membranların İmmünositokimya Analizi ile Görüntülenmesi

ALI kültür yöntemi ile Transwell-adaptör modeli kullanılarak çoğaltılan hücrelerde ZO-1, E-kaderin, β -Tubulin ve Muc5ac immünositokimya boyamaları yapılmıştır. Deney sonuçları Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.27. Farklılaştırılan BEAS-2B epitel hücrelerinin 21.gün ZO-1 görüntüleri. (A, B ve C: ko-kültür ekim yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. B' ve C': B ve C'nin yüksek büyütme görüntüleridir).

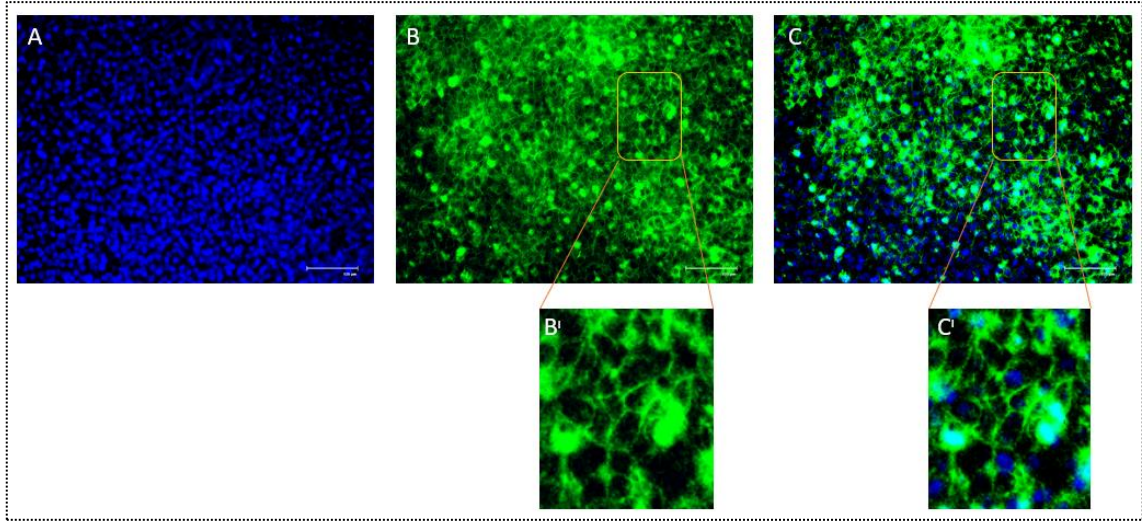
Şekil 4.27’de gösterilen ko-kültür ekimde, epitel tabakanın altında uzanan ekstraselüler matriks içerisine gömülü mezenşimal hücrelerin (fibroblastların) *in-vivo*’daki düzenlenişini daha iyi taklit ettiği ve biyolojide ‘çapraz konuşma’ (cross-talk) olarak bilinen duruma sebep olarak epitel-fibroblast etkileşimini kolaylaştırdığı ve daha sağlam bir bariyer oluşumuna neden olduğu bilinmektedir [201]. Sonuçlarımız literatür ile uyumlu bulunmuştur [190]. Çalışmalar sonucunda BEAS-2B epitel hücrelerinin ZO-1 proteinini ifade ettiği doğrulanmış ve immünohistokimya boyama ile gösterilmiştir.



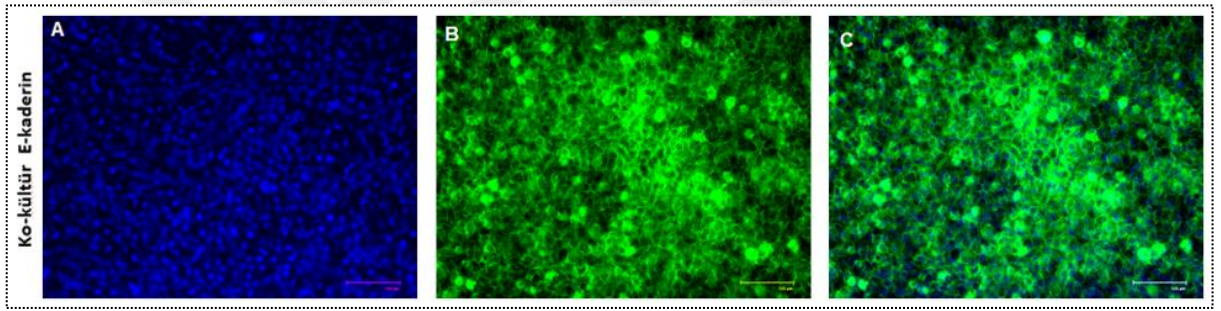
Şekil 4.28. Farklılaştırılan BEAS-2B epitel hücrelerinin 21.gün β -Tubulin görüntüleri. (A, B ve C: ko-kültür ekim yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. B' ve C': B ve C'nin yüksek büyütme görüntüleridir).

21 gün boyunca ALI kültür yöntemi ile farklılaştırılan BEAS-2B hücrelerinin Transwell-adaptör modeli kullanılarak fibroblast ekimi sonrası ko-kültür deneyleri sonucunda epitel hücrelerin β -Tubulin proteinini ifade ettiği gösterilmiştir.

Aynı deneyler A549 hücre hattı ile tekrar edilerek modelin etkinliği alveolar epitel hücreler ile de tespit edilmiştir (Şekil 4.29, Şekil 4.30).

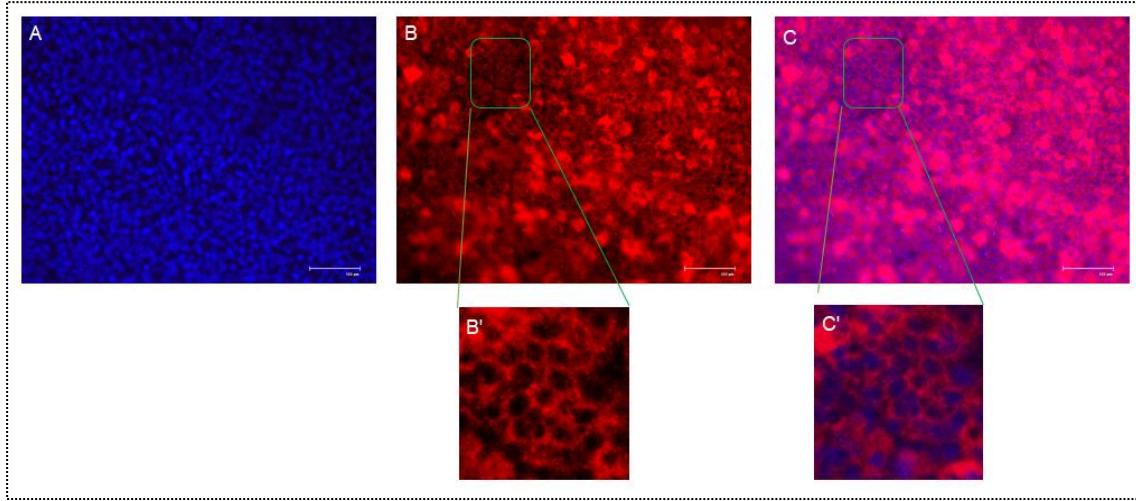


Şekil 4.29. ALI kültür yöntemi ile Transwell-adaptör modeli kullanılarak A549-fibroblast ko-kültür'ün 21.gün ZO-1 görüntüleri. (A: DAPI, B: ZO-1 ve C: Merge. B' ve C': B ve C'nin yüksek büyütme görüntüleridir).



Şekil 4.30. ALI kültür yöntemi ile Transwell-adaptör modeli kullanılarak A549-fibroblast ko-kültür'ün 21.gün E-kaderin görüntüleri. (A: DAPI (mavi), B: E-kaderin (yeşil), C: Merge).

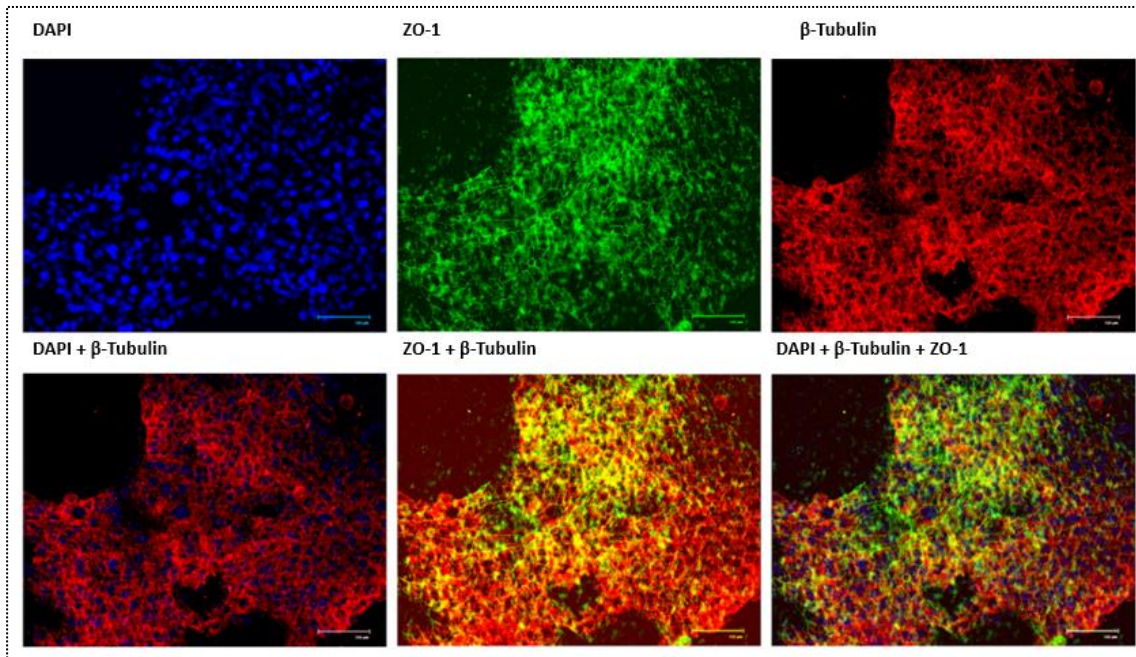
Transwell-adaptör modeli kullanılarak fibroblast hücreleri ile ko-kültür deneyleri gerçekleştirilen A549 hücrelerinin de BEAS-2B hücrelerinde tespit edildiği gibi ZO-1 ve E-kaderin proteinlerini ifade ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.29 ve 4.30).



Şekil 4.31. ALI kültür yöntemi ile Transwell-adaptör modeli kullanılarak A549-fibroblast ko-kültür'ün 21.gün β -Tubulin görüntüleri. (A: DAPI, B: β -Tubulin ve C: Merge. B' ve C': B ve C'nin yüksek büyütmeli görüntüleridir).

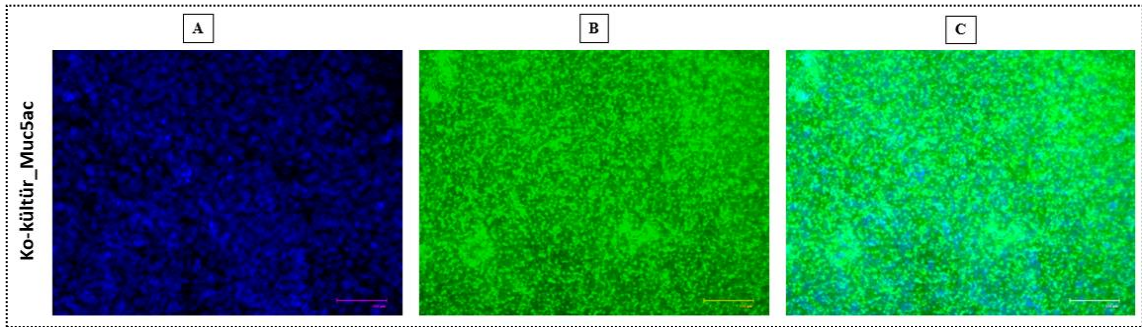
21 gün boyunca farklılaştırma sonunda A549 hücrelerinde β -Tubulin ifadesi tespit edilmiştir (Şekil 4.30). BEAS-2B ve A549 hücreleri ile gerçekleştirilen bu deneyler sonucunda Transwell-adaptör modelin ko-kültür deneyleri için uygun bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

İnsan alveolar adenokarsinom hücre hattı (A549) ve insan bronşiyal epitel hücre hattı (BEAS-2B) hücre hatlarına ek olarak, aynı deneyler primer insan bronş epitel hücreleri ile de tekrar edilmiştir.



Şekil 4.32. Farklılaştırılmış astımlı primer epitel hücrelerinin 21.gün ZO-1 ve β -Tubulin proteinlerinin floresan boyama görüntüleri. (Çekirdek boyaması (mavi), ZO-1 (yeşil), β -Tubulin (kırmızı)).

Transwell-adaptör modeli kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda astımlı primer epitel hücrelerinin ZO-1 ve β -Tubulin proteinlerini ifade ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.31). Bununla birlikte Muc5ac ifadesi de incelenip protein varlığı immünohistokimyasal analiz ile gösterilmiştir (Şekil 4.33).

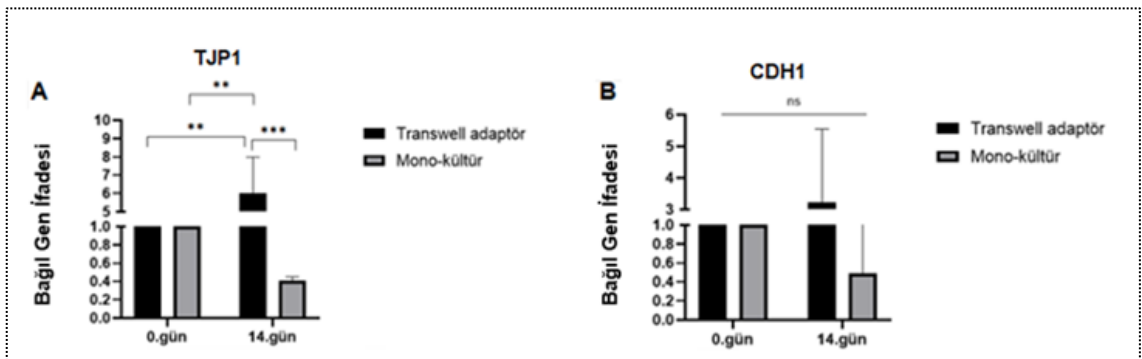


Şekil 4.33. Farklılaştırılmış astımlı primer epitel hücrelerinin 21.gün Muc5ac proteini görüntüleri. (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: Muc5ac boyaması (yeşil), C: Çakıştırılmış görüntü (Merge).

Ayrıca ALI kültür yöntemi ile farklılaştırılan A549 hücrelerde ZO-1 (TJP1) ve E-kaderin (CDH1) genlerinin ifadesi belirlenmiştir.

4.5.5. Farklılaştırılan Hücre Gruplarında Yer Alan Genlerin İfadesinin Belirlenmesi

Transwell insert'lerde büyütülen ve ALI kültür yöntemiyle farklılaştırılan A549 hücrelerinin 14.günde ifade olan ZO-1(TJP1) ve E-Kaderin (CDH1) genlerinin ifadelerine Gerçek Zamanlı PZR ile bakılmıştır. Kontrol olarak Peptidilprolil İzomeraz-A (PPIA) geni kullanılmıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.34. Transwell adaptör kullanılarak ko-kültüre edilen A549 epitel hücrelerde A: ZO-1(TJP1) ve B: E-kaderin (CDH1) genlerinin mono-kültür gruplarla karşılaştırılarak ifadelerinin belirlenmesi

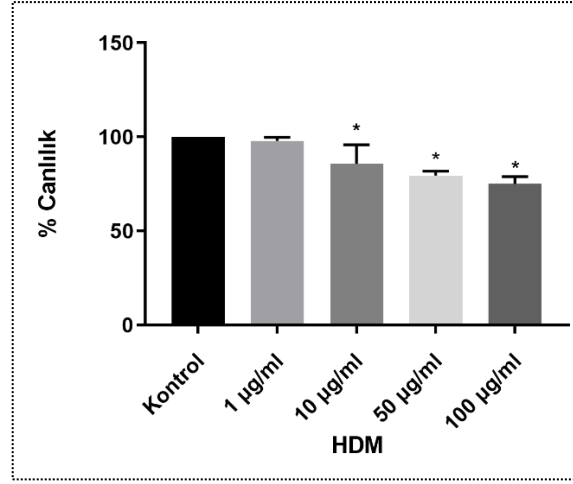
Literatürdeki bilgiler doğrultusunda A549 hücrelerinde 14 gün farklılaştırma sonrasında da sıkı bağlantı proteinlerinin oluştuğu tespit edilmiştir [202]. Bu nedenle A549 hücreleri için 14. günde gen ifade analizine bakılmasına karar verilmiştir. Transwell adaptör modeli ve mono-kültür ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda TJP1 ve CDH1 gen ifadelerinin Transwell adaptör modeli kullanılan grupta 14. günde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.34 A, B). TJP1 gen ifadesi 0. güne kıyasla 14.günde 5 katlık bir artış göstermiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. CDH1 gen ifadesi ise 3 katlık artış göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Mono-kültür yönteminde ise hem TJP1 hem de CDH1 gen ifadelerinde 14.günde azalma tespit edilmiştir.

4.6. Oluşturulan Ko-kültür Modellerinin Stimülasyonu ve Validasyonu

ALI kültür’de oluşturulmuş modellerin hastalık modelini taklit edebilmesi amacıyla, epitel hücre sıkı bağlantılarını yıktığı literatürde gösterilmiş farklı alerjen denemeleri ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu amaçla ev tozu akarı olarak bilinen ve solunum yolu alerjik hastalığının patogenezinde güçlü rol oynayan HDM [203] alerjeni kullanılarak doz denemeleri gerçekleştirilmiştir.

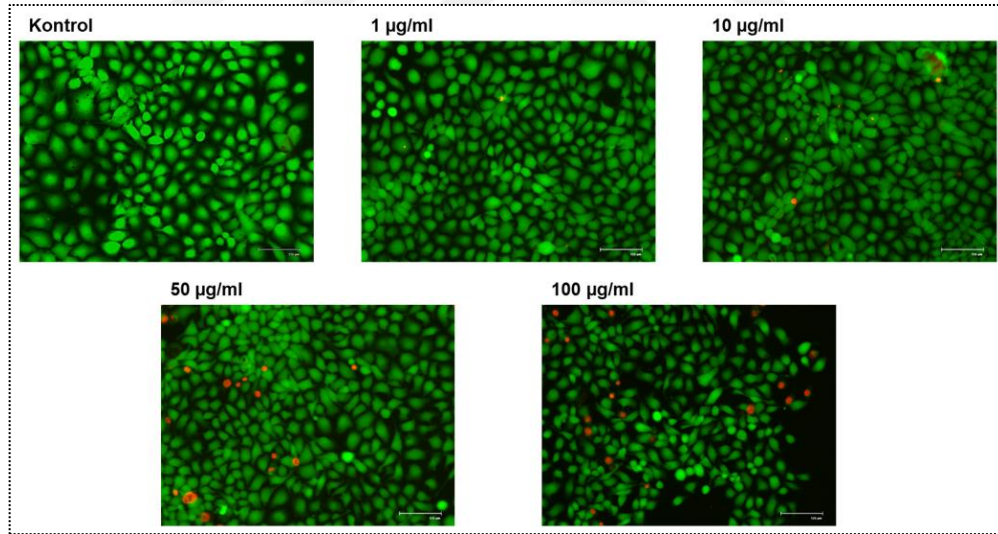
4.6.1. Ev Tozu Akarı (HDM) ile Uyarılan Hücrelerde Mitokondriyel Aktivite ve Canlı/Ölü Hücre Tespiti

Bronş epitel hücreleri 1, 10, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında 24 saat boyunca artan konsantrasyonda HDM ile uyarılmış ve bu süre sonunda hücrelerde mitokondriyel aktivite ve canlı/ölü hücre analizi gerçekleştirilmiştir. Mitokondriyel aktivite sonuçları Şekil 4.35.’te; canlı/ölü hücre analizi deneylerinin sonuçları ise Şekil 4.36’da verilmiştir.



Şekil 4.35. HDM alerjeni ile 24 saat uyarılan bronş epitel hücrelerinde MTT testi

Artan konsantrasyonda HDM ile uyarılan epitel hücrelerde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. 100 µg/ml HDM ile uyarılan hücrelerde canlılık %75'e düşmüştür. MTT deneyi sonucu Etbr/Kalsein deneyleri ile doğrulanmıştır.



Şekil 4.36. Bronş epitel hücrelerinin artan konsantrasyonda HDM ile 24 saat uyarımı sonrası canlı (yeşil)/ ölü (kırmızı) hücre boyama görüntüleri (20X, bar 125 µm).

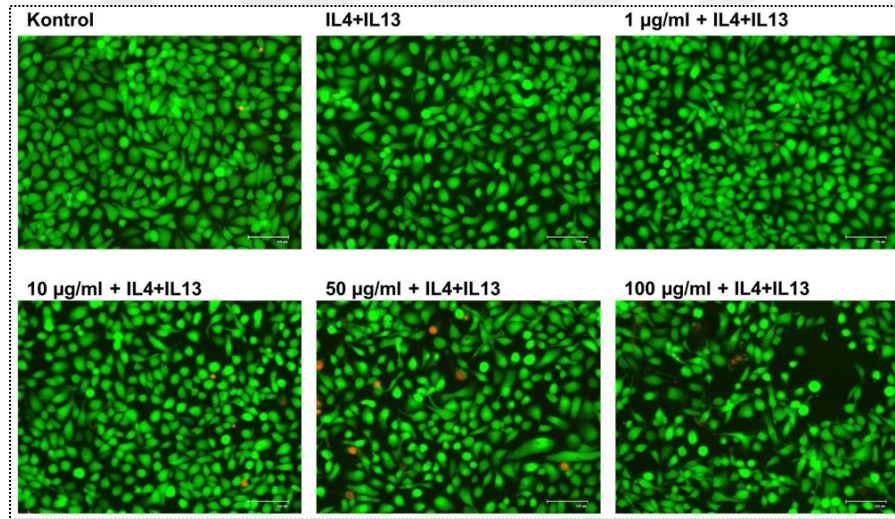
HDM ile 24 saatlik uyarım sonrası 10 µg/mL konsantrasyondan itibaren hücre ölümünün başladığı ve hücre canlılığının doz artışına bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.36). 24 saat uyarım için yapılan mitokondriyel aktivite testinin floresan hücre görüntüleriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.35).

Astımın alt tiplerinden biri olan Th2 tip astım fenotipinde IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokin üretiminde artış söz konusudur [204]. Literatürde Th2 tip sitokinlerden olan IL-4 ve IL-13'ün, havayolu epitel hücrelerinde bağlantı kompleksi üzerinde yıkıcı etkiye sahip olduğu ve bu etkinin JAK yollarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. [205].

Bu nedenle tez çalışması kapsamında etkin bir hastalık modeli oluşturmak amacıyla besiyeri ortamına IL-4 ve IL-13 sitokinleri eklenerek deneyler gerçekleştirilmiştir.

4.6.2. HDM ve Sitokinlerle (IL-4 ve IL-13) Uyarılan Hücrelerde Canlı/Ölü Hücre Tespiti

Epitel hücreleri IL-4 ve IL-13 varlığında HDM alerjeni ile 24 saat uyarıldıktan sonra EtBr/Kalsein AM floresan boyama ile hücre canlılıkları test edilmiştir (Şekil 4.37).

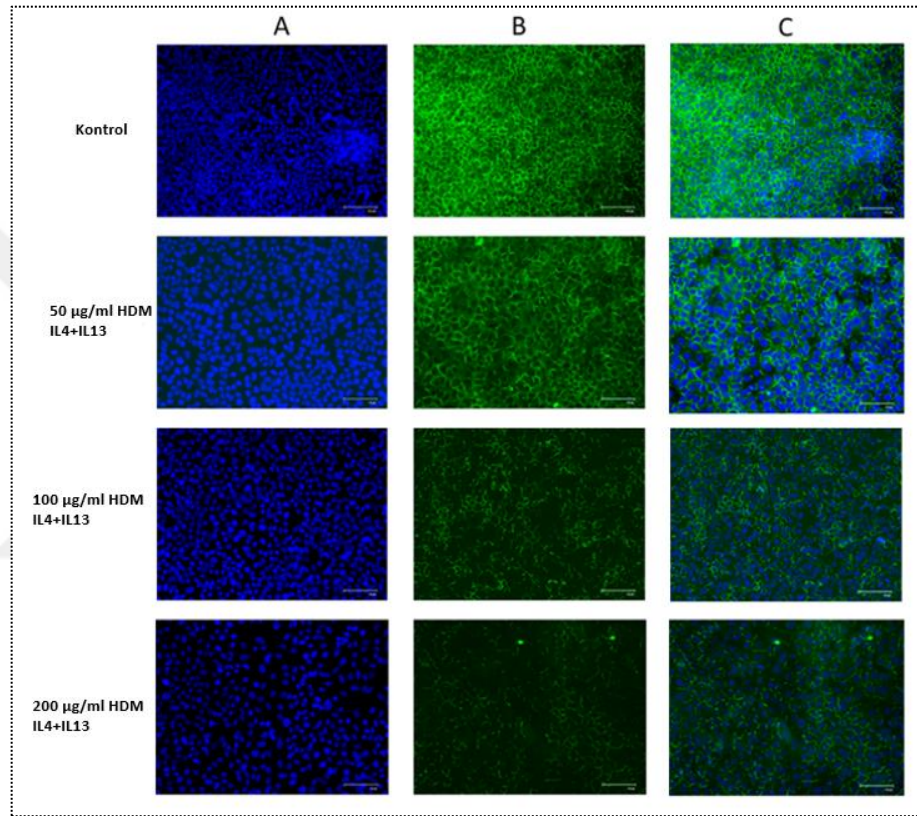


Şekil 4.37. Bronş epitel hücrelerinin artan konsantrasyonlarda HDM+IL-4+IL-13 ile 24 saat uyarımı sonrası canlı (yeşil)/ ölü (kırmızı) hücre boyama görüntüleri (20X, bar 125 µm).

Artan konsantrasyonda HDM ile IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile birlikte uyarılan bronş epitel hücrelerinde konsantrasyon artışıyla birlikte hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. En yüksek doz olan 100 µg/ml HDM ile uyarılan hücrelerde IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin varlığı ile hücrelerde büzüşme, yüzeyden kopup ayrılma ve morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir (Şekil 4.37).

4.6.3. HDM+IL-4+IL-13 ile Uyarılan Hücrelerde Sıkı Bağlantıların İmmünohistokimya Analizi ile Tespit Edilmesi

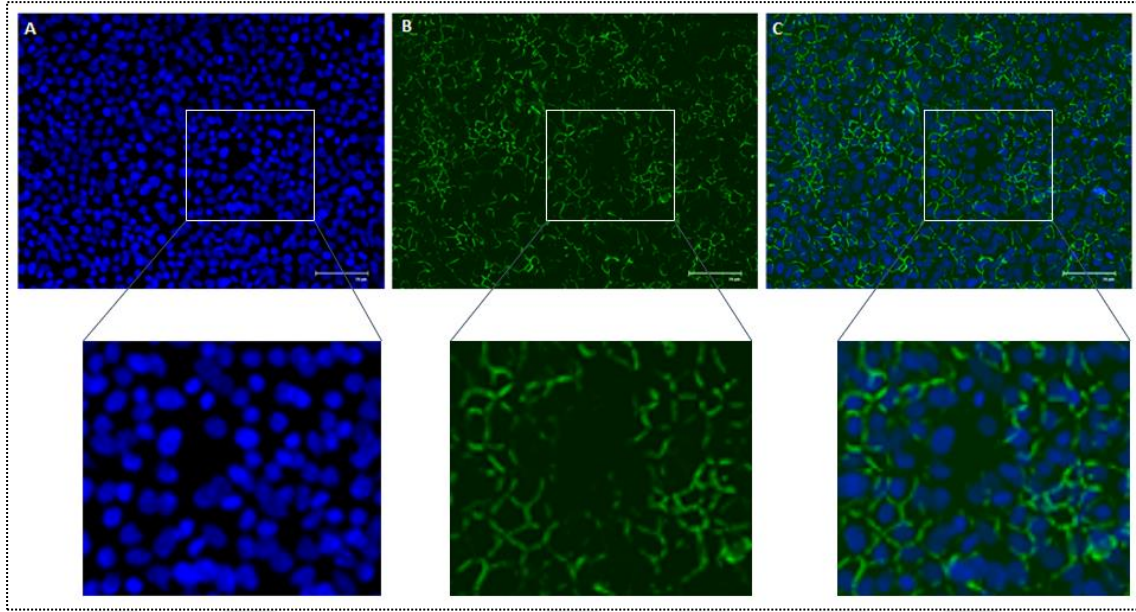
Epitel hücreleri sıkı bağlantıların bozulduğu uygun dozu belirleyebilmek amacıyla (1) **50** µg/ml HDM + IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml); (2) **100** µg/ml HDM + IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml); (3) **200** µg/ml HDM + IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml) olacak şekilde uyarılarak sıkı bağlantıların (ZO-1, E-kaderin) varlığı floresan mikroskobu ile analiz edilmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlarda HDM+IL-4+IL-13 ile uyarılan epitel hücrelerde sıkı bağlantıların floresan mikroskobu ile görüntülenmesi (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: ZO-1 proteini (yeşil), C: A ve B resimlerinin çakıştırılmış görüntüsü (Merge), bar 79 µm).

HDM konsantrasyonu artışıyla birlikte hücrelerde ZO-1 sıkı bağlantı proteinlerinin kırılmaya başladığı tespit edilmiştir. ALI kültür deneylerine IL-4 ve IL-13 varlığında 100 µg/ml HDM ile devam edilmesine karar verilmiştir.

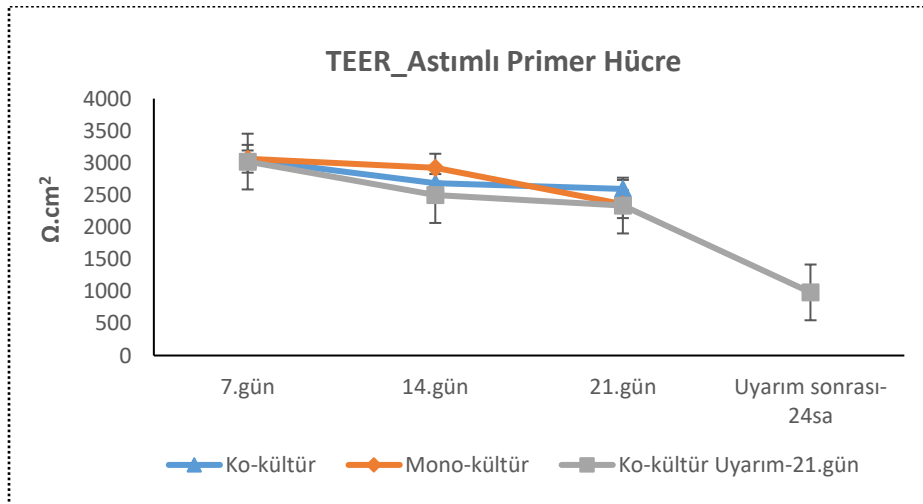
IL-4 ve IL-13 varlığında 100 µg/ml HDM ile uyarılan epitel hücrelerin yakınlaştırılmış ZO-1 boyama görüntüsü Şekil 4.39’da gösterilmiştir.



Şekil 4.39. Seçilen 100 µg/ml HDM+IL-4+IL-13 konsantrasyonunun epitel hücrelerde sıkı bağlantı yapılarını bozduğunun yakından gösterilmesi (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: ZO-1 boyaması (yeşil), C: Çakıştırılmış görüntü (Merge)).

4.6.4. HDM ve Sitokinlerle (IL-4+IL-13) Uyarılan Primer Hücrelerin Validasyonu ve TEER Analizi

ALI kültürde büyütülen ve 21 gün boyunca farklılaştırılan primer epitel hücreler IL-4 ve IL-13 varlığında HDM ile uyarılmıştır 21.günde transwell insert'lerin apikal kısmına 100 µg/ml HDM ve bazal kısmına da IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml) olacak şekilde uyarımları yapıldıktan sonra TEER analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.40'ta verilmiştir.

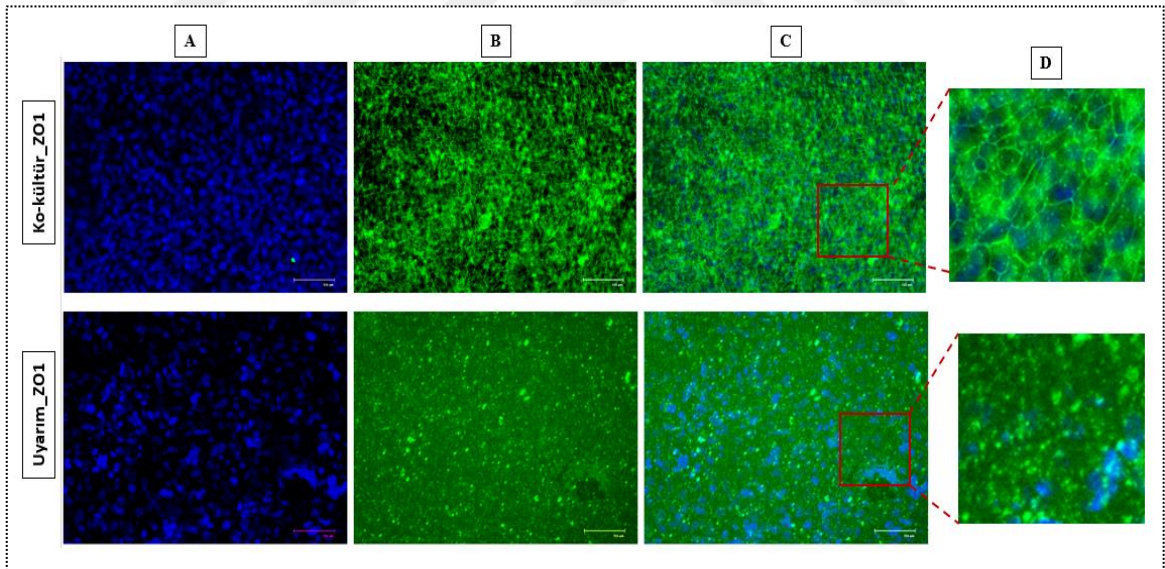


Şekil 4.40. 100 µg/ml HDM+IL-4+IL-13 konsantrasyonunun epitel hücrelerde TEER ölçümüne etkisi

Transwell kültürlerde farklılaştırılan mono-kültür ve ko-kültür gruplarında 7, 14 ve 21.günlerdeki TEER sonuçları değerlendirilmiştir. 21.günde uyarımları gerçekleştirilen ko-kültürlerde 2500-3000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ aralığında iken 21.günde uyarıldıktan sonra bu değer 980 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ seviyesine düşmüştür. Bu durum bize literatürde hastalık modelini taklit edebilmek için sıklıkla kullanılan alerjen ve/veya sitokinlerin bu modelle de çalışıyor olduğunu göstermektedir [205].

4.6.5. HDM+IL-4+IL-13 ile Uyarılan Primer Hücrelerde Sıkı Bağlantıların İmmünohistokimya Analizi ile Tespit Edilmesi

ALI kültürde büyütülen ve 21 gün boyunca farklılaştırılan primer epitel hücreler IL-4 ve IL-13 varlığında HDM ile uyarılmıştır. Hastalık modelinin oluşup oluşmadığının anlaşılması için sıkı bağlantı yapıları (ZO-1) immünohistokimya yöntemiyle analiz edilmiştir. Hem uyarılan hem de uyarılmayan hücre grupları karşılaştırılarak verilmiş olup Şekil 4.41’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.41. Farklılaştırılarak uyarılmış (alt), uyarılmamış (üst) astımlı primer epitel hücrelerinin 21.gün ZO-1 görüntüleri. (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: ZO-1 boyaması (yeşil), C: Çakıştırılmış görüntü (Merge) D: Yüksek büyütme görüntülerdir).

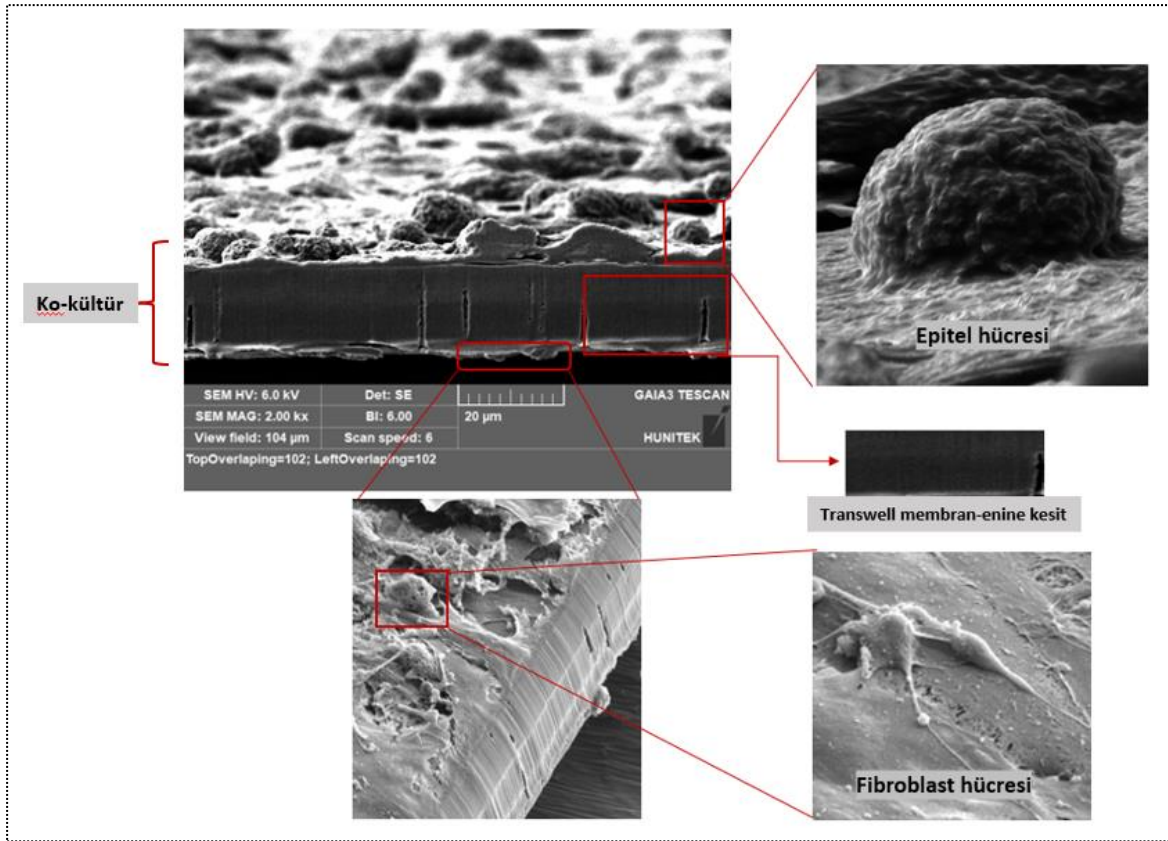
Transwell-adaptör modeli kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda astımlı primer epitel hücrelerinin IL-4 ve IL-13 varlığında HDM ile uyarımı sonucu TEER

değerinde düşüş tespit edilmiştir (Şekil 4.40). Ayrıca ZO-1 bağlantı proteininin yapısının HDM ile uyum sonucu bozulduğu gösterilmiştir (Şekil 4.41).

Elde edilen tüm bu sonuçlar Transwell-adaptör modeli kullanılarak gerçekleştirilen ko-kültür deneylerinde havayolu epitel hücrelerinin başarılı bir şekilde farklılaştırılarak hastalık modelini oluşturduğunu göstermiştir [206].

4.7. Transwell Membranlar Üzerinde Ko-kültüre Edilen Epitel Hücrelerinde SEM Analizi

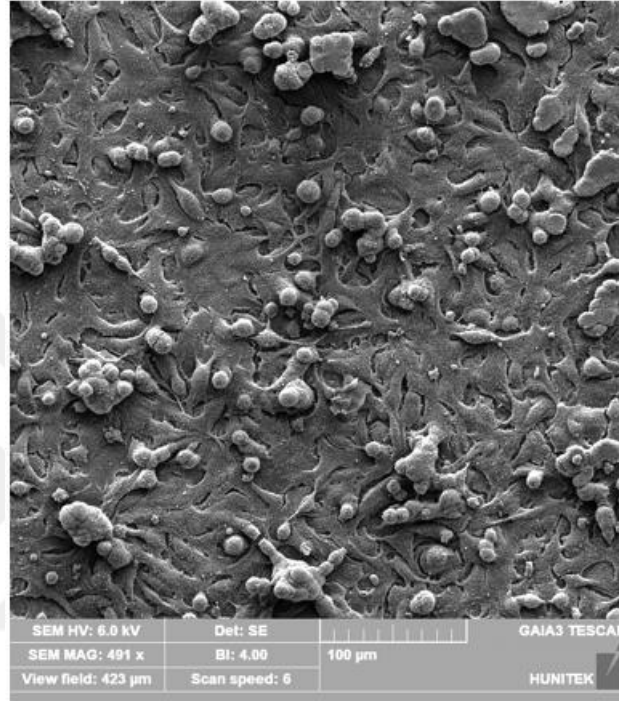
Transwell-adaptör model kullanılarak ko-kültür koşullarında geliştirilen epitel-fibroblast hücrelerinin varlığı SEM kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. Transwell-adaptör kullanılarak ko-kültüre edilen epitel-fibroblast hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmesi

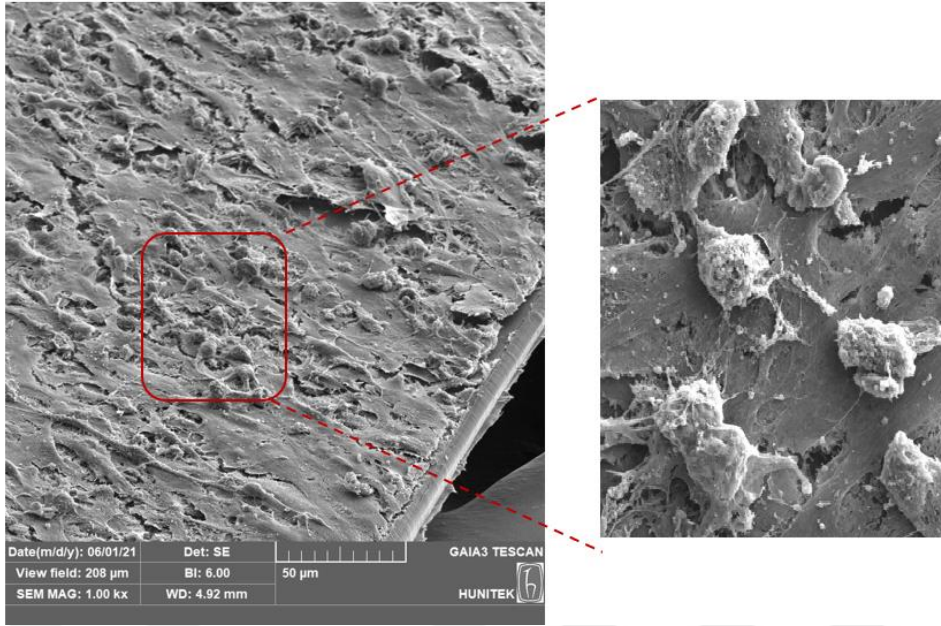
Transwell membran üzerine ekili epitel hücre morfolojisini değerlendirmek ve membran altına ekilen fibroblast hücrelerinin varlığını göstermek amacıyla SEM analizinden yararlanılmıştır. Bu amaçla membranlar enine kesit alınarak 90 derecelik stub'lar üzerinde incelenmiştir. Fibroblast hücreleri stub'un duvarına temas edecek şekilde yerleştirildiğinden bu yöntemde net şekilde gösterilememiştir. Ancak bunun yerine

membran enine kesilip başka bir karbon bandı üzerine dik yerleştirilerek görüntüler alınmaya çalışılmıştır. Şekil 4.44'te membran üzerine tutulan fibroblast hücreleri net bir şekilde görüntülenebilmiştir. Epitel ve fibroblast hücre morfolojilerini net şekilde gösterebilmek adına membranlar yatay olarak ayrı ayrı karbon bantların üzerine yapıştırılmış ve görüntüler alınmıştır. Şekil 4.43'te ko-kültüre edilen epitel hücrelerinin yatay kesiti gösterilmiştir.



Şekil 4.43. Transwell membran üzerinde ko-kültüre edilen epitel hücrelerinin 7.günde taramalı elektron mikroskobunda görüntülenmesi

Şekil 4.43 ve Şekil 4.44'te transwell membran üzerine ekili epitel hücreler ve membran altına ekilen fibroblast hücrelerinin varlığı SEM mikroskobu ile doğrulanmış olup etkili bir şekilde membran yüzeyine tutunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.44. Transwell membranlara ekilen epitel-fibroblast ko-kültür çalışmasında membranın alt kısmının kesitsel görüntüsü. Fibroblast hücrelerinin 7.günde taramalı elektron mikroskobunda görüntülenmesi.

4.8. Biyobozunur Nanofiber Membranların Hazırlanması ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Elektroeğirme tekniği kullanılarak üretilen PLLA ve PCL nanofiber membranların hazırlanmasında sistemsel parametrelerin değişimi üzerinden optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elektroeğirme işlemine etki eden voltaj değeri, uçuş mesafesi, akış hızı ve iğne uç çapı gibi parametreler değiştirilerek en ideal fiberler üretilmeye çalışılmıştır.

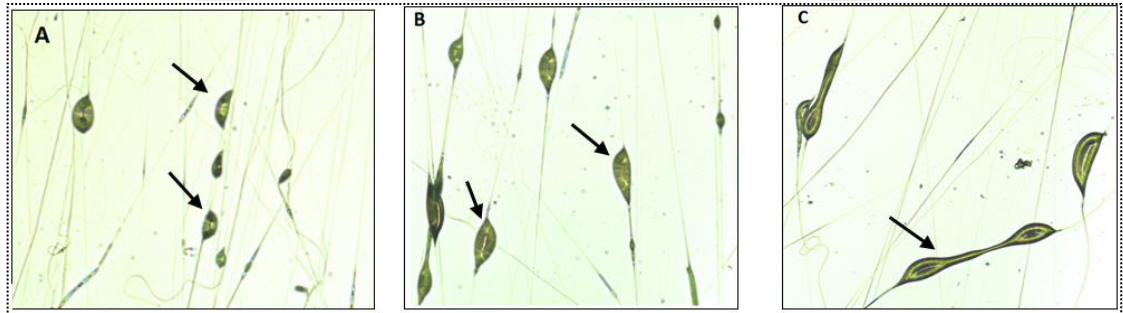
PLLA polimerinin çözünmesinde kullanılan kloroform, tetrahidrofur, dimetilformamid, diklorometan/dimetilformamid ve kloroform/dimetilformamid çözücülerinden Çizelge 4.1’de (-) ile gösterilenlerde polimerin çözünmediği; (+) ile gösterilenlerde ise polimerin çözündüğü görülmüştür. Bu durumda sonraki parametrelerin değerlendirilmesi için çalışmalara kloroform ve DCM/DMF çözücülerini kullanarak devam edilmiştir.

Çizelge 4.1. PLLA membranlarının hazırlanmasında çözücü parametrelerinin belirlenmesi

Çözücü	%4 PLLA
THF	-
Kloroform	+
DMF	-
DCM/DMF (70:30)	+
Kloroform/DMF (70:30)	-

4.8.1. Poli (L-Laktik Asit) (PLLA) Membranların Üretilmesi ve SEM Analizi ile Morfolojilerinin Belirlenmesi

Şekil 4.45'te verilen %4 (a/a) PLLA-Kloroform çözeltisi için belirlenen sistem parametrelerinden akış hızı ve uçuş mesafesi değerlerindeki değişimler üzerinden elde edilen fiberler öncelikli olarak ışık mikroskobunda incelenmiştir. Şekil 4.45'te A, B ve C'de sırasıyla 4 mL/sa akış hızı-10 cm uçuş mesafesi; 1 mL/sa akış hızı-10 cm uçuş mesafesi; 1mL/sa akış hızı-15 cm uçuş mesafesi parametrelerine ait görüntüler paylaşılmıştır.

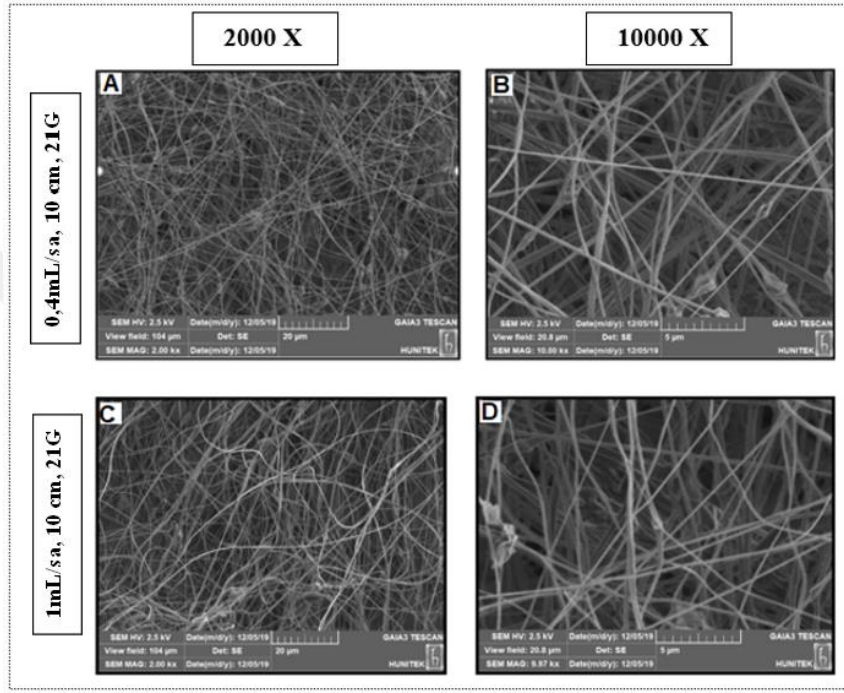


Şekil 4.45. %4 PLLA-Kloroform çözeltisiyle elde edilen fiberlerin ışık mikroskobu görüntüleri (20X). **A:** 0,4 mL/sa akış hızı ve 10 cm'lik toplama mesafesi **B:** 1 mL/sa akış hızı ve 10 cm'lik toplama mesafesi **C:** 1mL/sa akış hızı ve 15 cm'lik toplama mesafesi parametrelerine ait görüntülerdir. Oklar, boncuk yapılarını göstermektedir.

%4 PLLA-Kloroform çözeltisi kullanılarak elde edilen fiberlerin ışık mikroskobunda incelenmesi sonucu fiberlerde çok sayıda boncuk (bead) yapılarının oluştuğu gözlenmiştir. Bu parametrelerle üretilen fiberlere ait görüntüler Şekil 4.45'te ışık mikroskobu kullanılarak (Leica, Almanya) verilmiştir. Bu görüntüler incelendiğinde fiberlerin oluşumunda istenmeyen boncuk yapılarının giderilmesi gerektiği; bunun için

de farklı çözücü/çözücü grupları kullanılarak yeniden fiber optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

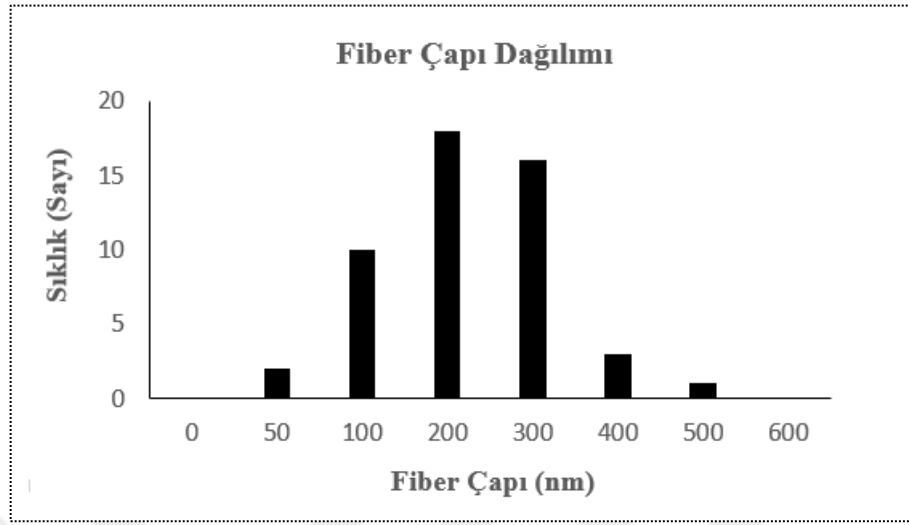
Şekil 4.46'da verilen %4 (a/a) PLLA-(DCM/DMF) çözeltisi için belirlenen sistem parametrelerinden yine akış hızı değişimi üzerinden elde edilen fiberler ışık mikroskopunda incelendikten sonra daha detaylı analiz için elektron mikroskopunda incelenmiştir.



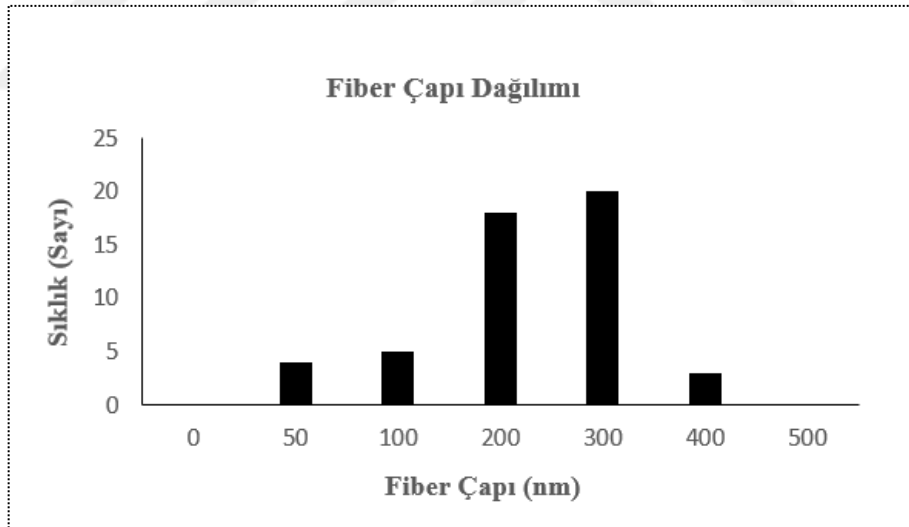
Şekil 4.46. PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı parametresinin fiber oluşumuna etkisi

Şekil 4.46'da verilen %4 (a/a) PLLA-Kloroform ve PLLA-(DCM/DMF) çözeltileri ile elde edilen fiberler incelendiğinde kloroform çözeltisi kullanılarak hazırlanan parametrelerden DCM/DMF çözeltisi kullanılarak hazırlanan parametrelere geçildiğinde boncuk içerikli fiber oluşumunun kısmen önüne geçildiği görülmüştür. Bu durum iletkenliği artırmak adına dimetilformamid çözücüsünün diklorometan çözücüsü ile birlikte kullanımıyla sağlanmış olabileceği yorumu yapılmıştır [207]. Ramakrishna ve ekibinin elektrospun fiberlerin çaplarını incelemek için solüsyonların elektriksel iletkenliği ile karşılaştırıldığı bir çalışmada; çözeltinin elektriksel iletkenliği arttırıldığında elektrospun polimer fiberlerin çapında önemli bir düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda fiberler üzerinde oluşan boncuk yapılarının çözeltinin düşük iletkenliğinden kaynaklanıyor olabileceği ile ilgili görüş bildirmişlerdir. Çalışmada en küçük fiber çapına sahip elektrospun polimer

nanofiberlerin, en yüksek elektriksel iletkenliğe sahip solüsyonun kullanıldığı gruptan çıktığını doğrulamışlardır [207].



Şekil 4.47. PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı (0,4 mL/sa) parametresinin fiber çapı dağılımına etkisi



Şekil 4.48. PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı (1 mL/sa) parametresinin fiber çapı dağılımına etkisi

Şekil 4.47’de verilen 0,4 mL/sa akış hızında ve 10 cm’lik toplama mesafesinde gerçekleştirilen PLLA fiber çaplarının 50 nm ile 500 nm arasında dağılım gösterdiği kaydedilmiştir ve ortalama fiber çapı $264,18 \pm 86$ nm olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.48’de verilen 1 mL/sa akış hızında ve 10 cm’lik toplama mesafesinde gerçekleştirilen PLLA fiber çaplarının 50 nm ile 400 nm arasında dağılım gösterdiği kaydedilmiştir ve ortalama

fiber çapı $255,62 \pm 76$ nm olarak hesaplanmıştır. Buna göre SEM görüntüleri incelenen PLLA membranlarında fiber içerikli boncuk yapılarının tamamen giderilemediği ve fiber çaplarının biraz daha küçültülmesi gerektiği öngörülmüştür. PLLA membranların karakterizasyonunda gözlemlenen fiber içerikli boncuk yapılarının giderilmesi ve fiber çaplarının 200 nm'den daha küçük sentezlenip homojen dağılım sergileyebilmesi için elektroegirme sırasında kullanılan iğne uç çaplarında değişikliğe gidilmiştir. 0,51 mm (21 G) iğne iç çapa sahip şırınga, 0,26 mm (26 G) iç çapa sahip şırıngayla değiştirilerek deneyler tekrarlanmıştır. Bu amaçla üç farklı koşulda membranlar hazırlanmıştır.

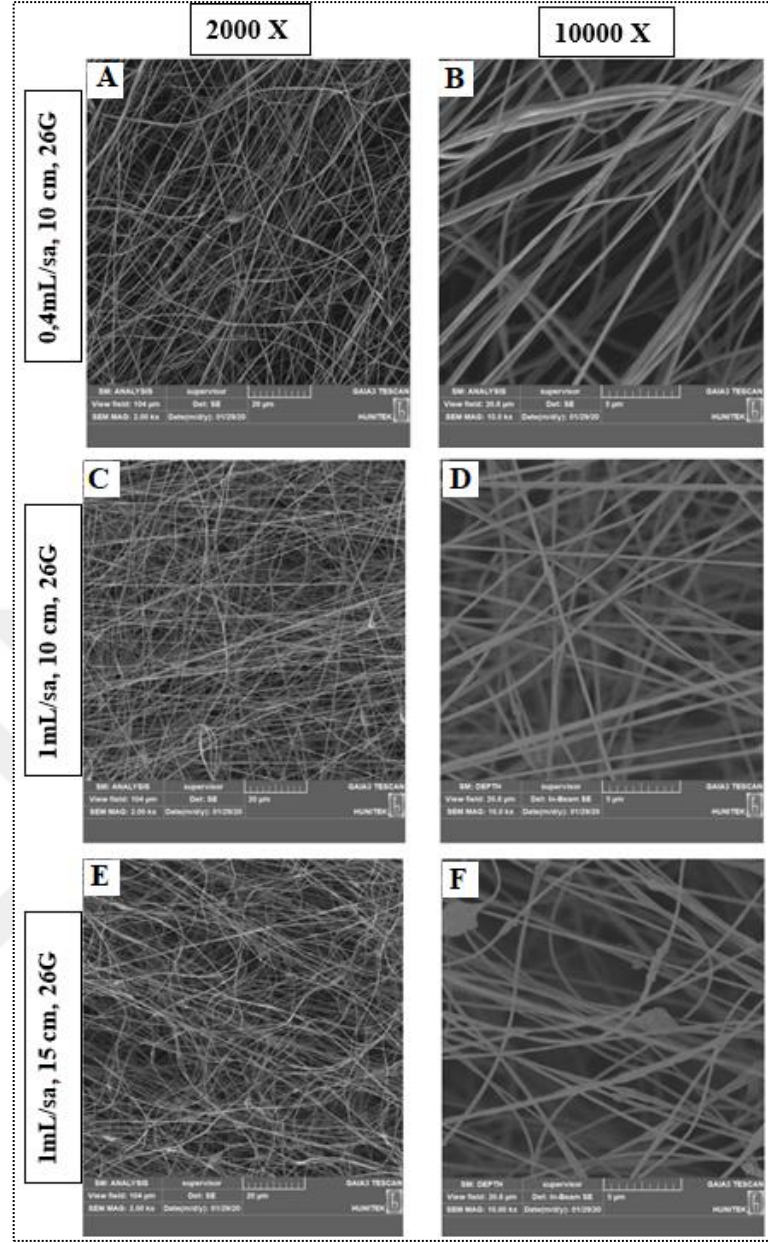
Birinci membran: 10 cm uçuş mesafesi, 26 G iğne uç çapına sahip şırınga ve 0,4 mL/sa'lık akış hızı ile üretilen %4'lük PLLA fiberler.

İkinci membran: 10 cm uçuş mesafesi, 26 G iğne uç çapına sahip şırınga ve 1 mL/sa'lık akış hızı ile üretilen %4'lük PLLA fiberler.

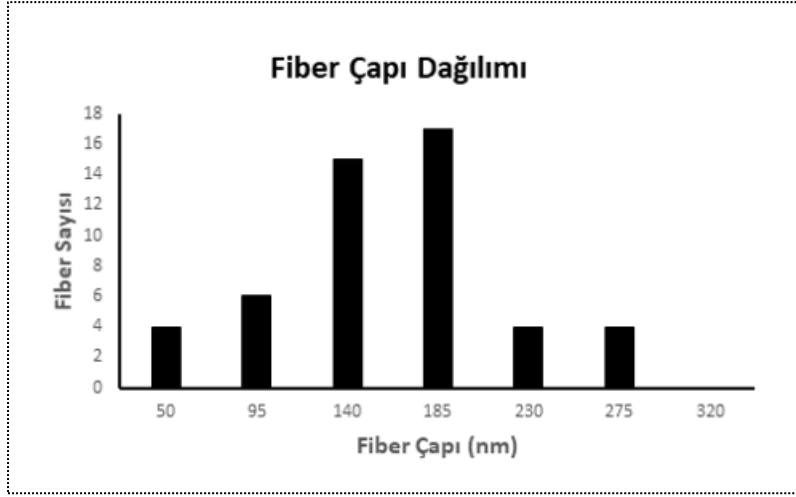
Üçüncü membran: 15 cm uçuş mesafesi, 26 G iğne uç çapına sahip şırınga ve 1 mL/sa'lık akış hızı ile üretilen %4'lük PLLA fiberler.

Hazırlanan üç membranın morfolojik karakterizasyonunun yapılabilmesi amacıyla SEM analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.49).

Şekil 4.49'da PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı ve uçuş mesafesi parametreleri birbiri içinde ayrı ayrı değerlendirilerek fiber çapı dağılımına etkileri incelenmiştir. Literatürdeki çalışmalar referans alınarak 0,4 mL/sa'lık akış hızından başlanarak 2 mL/sa'lık akış hızına kadar farklı denemeler gerçekleştirilmiş ve en ideal akış hızı belirlenmeye çalışılmıştır. Zargham ve ekibinin akış hızının elektrospun fiber dağılımına olan etkilerini araştırdıkları çalışmada, fiber çapı dağılımının akış hızı değişimlerinden etkilendiğinin açıkça görüldüğünü, akış hızı arttırıldığında fiber çap dağılımının daha geniş aralıkta olduğunu belirtmişlerdir [208]. Bununla birlikte başka bir çalışmada nanofiberlerin çapındaki artışın, iğne ucundan toplayıcıya kadar olan mesafenin artışı ile ilişkili olduklarını vurgulamışlardır [209]. Optimizasyon çalışmalarımız kapsamında literatürle benzer bulgular elde edilmiştir (Şekil 4.50).



Şekil 4.49. PLLA membranlarının üretilmesinde akış hızı ve uçuş mesafesi parametrelerinin fiber çapı dağılımına etkisi



Şekil 4.50. Optimize edilen PLLA membranlarına ait fiber çapı dağılımı

Birinci membran: 10 cm toplama mesafesinde 26 G iğne uç çapına sahip şırınga kullanılarak ve 0,4 mL/sa'lık akış hızı ile üretilen %4'lük PLLA membranlarının ortalama fiber çapı **281±113 nm** olarak hesaplanmıştır

İkinci membran: 10 cm toplama mesafesinde 26 G iğne uç çapına sahip şırınga kullanılarak ve 1 mL/sa'lık akış hızı ile üretilen %4'lük PLLA membranlarının ortalama fiber çapı **192±49 nm** olarak hesaplanmıştır.

Üçüncü membran: 15 cm toplama mesafesinde 26 G iğne uç çapına sahip şırınga kullanılarak ve 1 mL/sa'lık akış hızı ile üretilen %4'lük PLLA membranlarının ortalama fiber çapı **251±79 nm** olarak hesaplanmıştır.

Yapılan SEM değerlendirmesinde ikinci membranın hedeflenen fiber çap boyutu ve dağılımına uygun olduğu; ayrıca bu membran üzerindeki istenmeyen boncuk yapılarının giderildiği görülmüştür.

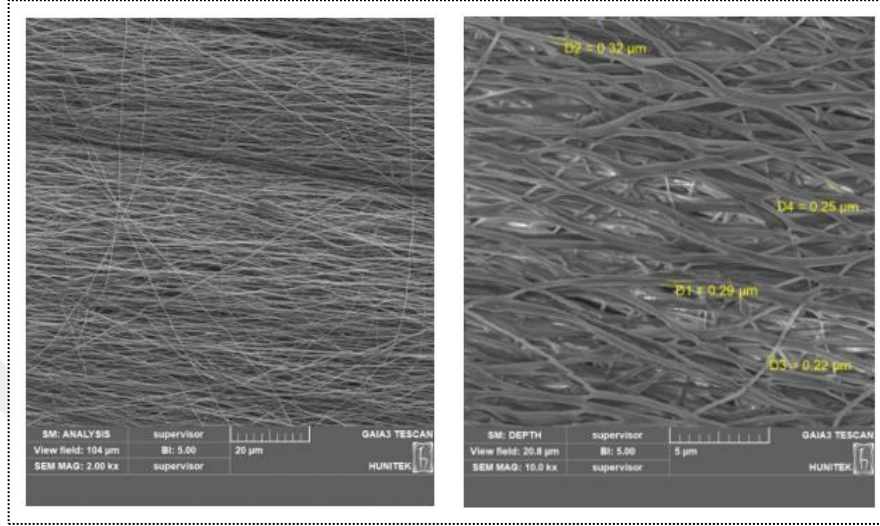
4.8.2. Poli (e-Kaprolakton) (PCL) Membranların Üretilmesi ve SEM Analizi ile Morfolojilerinin Belirlenmesi

PCL membranların optimizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar neticesinde iki koşul belirlenmiştir.

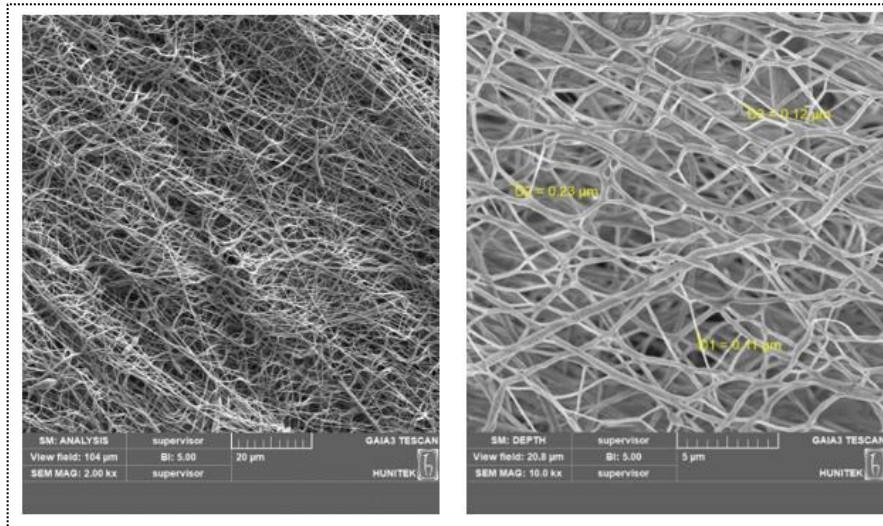
Koşul 1- %17,5 PCL; 17 kV'lık potansiyel fark, 7,5 cm toplama mesafesi, 0,07 mL/sa'lık akış hızı uygulanmıştır (**21 G**'lik iğne uç çapı ile).

Koşul 2- %17,5 PCL; 17 kV'lık potansiyel fark, 7,5 cm toplama mesafesi, 1,5 mL/sa'lik akış hızı uygulanmıştır (26 G'lik iğne uç çapı ile).

Belirlenen koşullarda sentezlenen PCL membranlarının morfolojik değerlendirilmesi SEM analizi ile gerçekleştirilmiştir. Koşul-1 ve Koşul-2'ye ait görüntüler sırasıyla Şekil 4.51 ve 4.52'de sunulmuştur.



Şekil 4.51. Elektroeğirilmiş PCL membranlarına ait SEM görüntüleri (Koşul-1)
2000X büyütmeye (sol); 10000X büyütmeye (sağ)

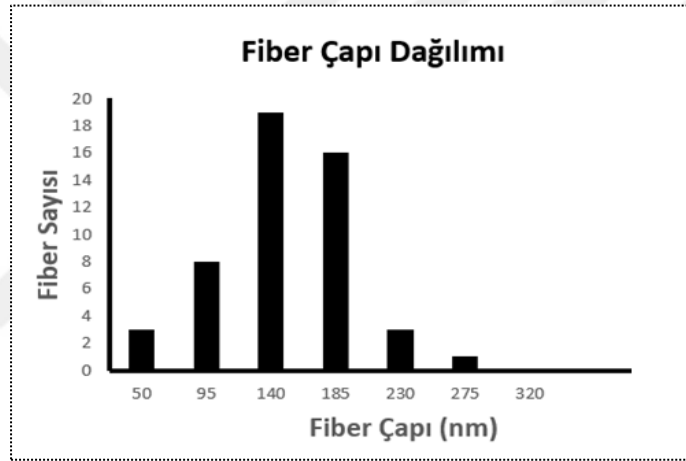


Şekil 4.52. Elektroeğirilmiş PCL membranlarına ait SEM görüntüleri (Koşul-2)
2000X büyütmeye (sol); 10000X büyütmeye (sağ)

Yapılan SEM değerlendirmesinde Koşul-1'e ait fiber organizasyonunun yönlü/hizalı (aligned); Koşul-2'ye ait fiber organizasyonunun ise yönsüz/rastgele (random) dağılım gösterdiği anlaşılmıştır. Akciğer bazal membrana ait ekstraselüler matriks fiberlerinin rastgele dağılım gösterdiği [210] dikkate alınarak daha sonraki çalışmalarda Koşul-2'den devam edilmiştir.

Koşul-2'ye ait PCL fiber çaplarının 50 nm ile 275 nm arasında dağılım gösterdiği kaydedilmiştir (Şekil 4.53). PCL membranlarına ait ortalama fiber çapı $153,33 \pm 27 \text{ nm}$ olarak hesaplanmıştır.

Bu değerlendirmeler neticesinde PCL membranlarının hedeflenen fiber çap boyutu ve dağılımına uygun olduğu; ayrıca bu membran üzerinde istenmeyen boncuk (bead) yapılarının hemen hemen oluşmadığı görülmüştür.



Şekil 4.53. Optimize edilen PCL membranlarına ait fiber çapı dağılımı

SEM analizi ile PLLA ve PCL membranların fiber çapları hesaplanmış ve istenen özellikte boncuksuz ve yönsüz (random) fiberler oluşturularak hücre kültür çalışmalarına hazır hale getirilmiştir. 50 nm ile 275 nm arasında dağılım gösteren PCL fiber çaplarının akciğer matrikslerinde yer alan kollajen ve elastin fiberlerinin çapları dikkate alındığında benzer ebatlarda olduğu anlaşılmıştır [211].

Çizelge 4.2'de PLLA ve PCL membranlarının karakterize edildikten sonra belirlenen nihai voltaj, derişim, toplama mesafesi, akış hızı, iğne uç çapı ve hesaplanan ortalama fiber çaplarına ait değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. Optimize edilen PLLA ve PCL membranlarının karakterize edilmiş değerleri

POLİMER	PLLA	PCL
Voltaj (kV)	17	17
Derişim (a/h)	% 4	%17,5
Toplama mesafesi (cm)	10	7,5
Akış hızı (mL/sa)	1	1,5
İğne uç çapı (G)	26	26
Ortalama fiber çapı (nm)	192 ±49	153 ±27

4.8.3. PLLA ve PCL Membranların Kalınlıklarının Tayini

Optimize edilmiş PLLA ve PCL membranlar toplayıcı yüzeyinden kaldırıldıktan sonra dijital kumpas yardımıyla kalınlık ölçümü yapılmıştır.

2 saatlik elektroegirme işlemine tabi tutulan PLLA membranlarda kalınlık $77 \pm 12 \mu\text{m}$;

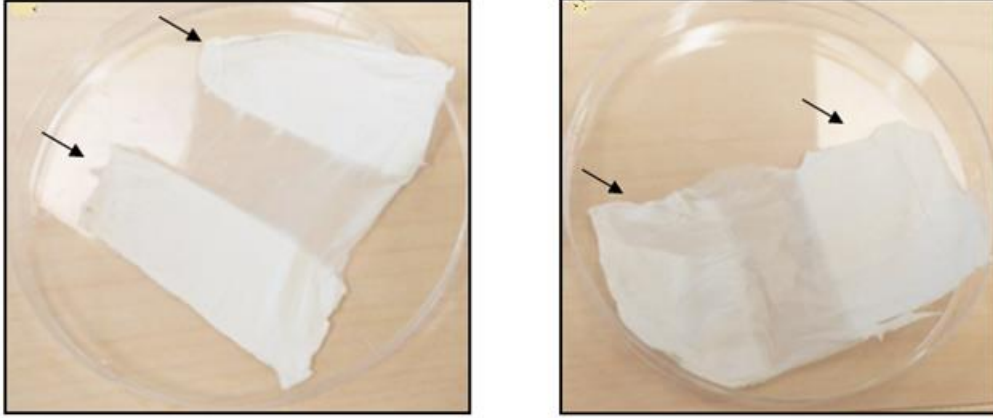
4 saatlik elektroegirme işlemine tabi tutulan PLLA membranlarda kalınlık $131 \pm 10 \mu\text{m}$;

6 saatlik elektroegirme işlemine tabi tutulan PLLA membranlarda kalınlık $242 \pm 14 \mu\text{m}$ olarak ölçülürken;

2 saatlik elektroegirme işlemine tabi tutulan PCL membranlarda kalınlık $144 \pm 16 \mu\text{m}$;

4 saatlik elektroegirme işlemine tabi tutulan PCL membranlarda kalınlık $398 \pm 11 \mu\text{m}$;

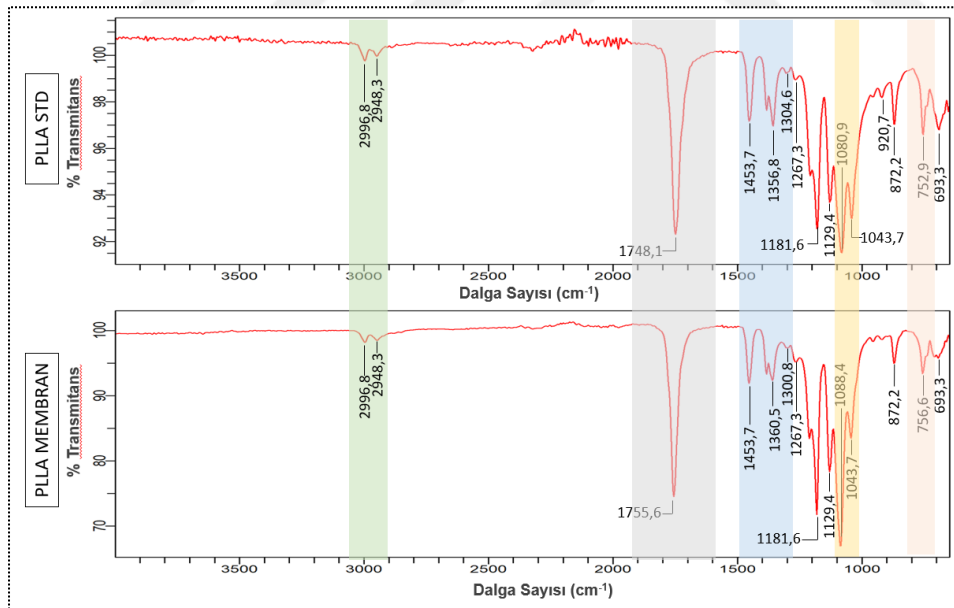
6 saatlik elektroegirme işlemine tabi tutulan PCL membranlarda kalınlık $405 \pm 9 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür.



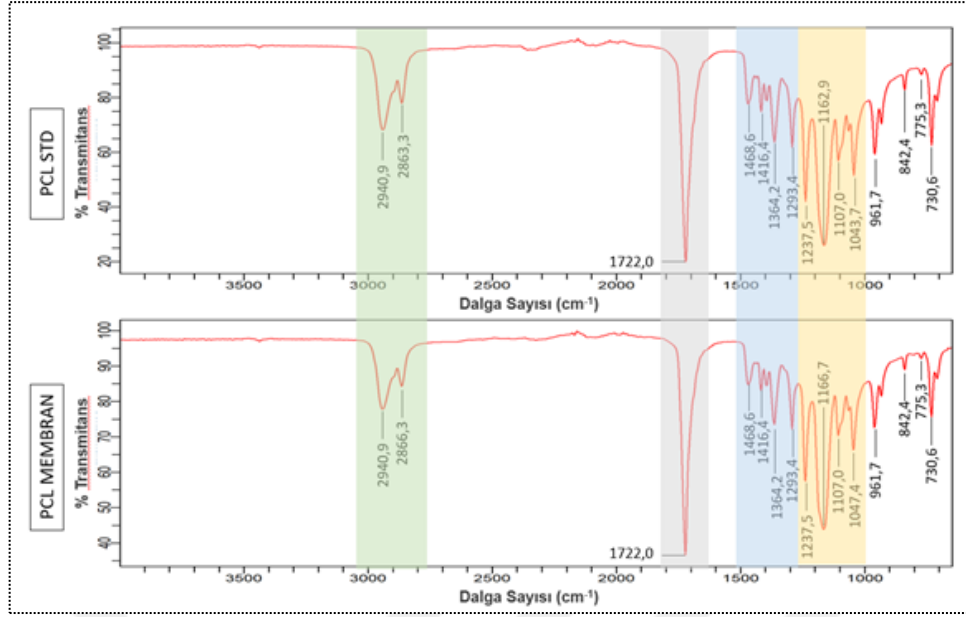
Şekil 4.54. Elektroğirme sistemiyle üretilen PLLA (sol) ve PCL (sağ) nanofiber membranların toplanması

4.8.4. Toplam Reflektansı Azaltılmış Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometresi (ATR-FTIR) Analizi

PLLA ve PCL membranlara ait kimyasal yapı analizi ve üretim metodundan kaynaklı herhangi bir safsızlık olup olmadığının belirlenmesi amacıyla ATR-FTIR Analizi gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.55'te sunulmuştur.



Şekil 4.55. Elektroğirilmiş PLLA membranlara ait FTIR spektrumu. PLLA polimer (üst); PLLA membran (alt)



Şekil 4.56. Elektroeğirilmiş PCL membranlara ait FTIR spektrumu. PCL polimer (üst); PCL membran (alt)

PLLA FTIR analiz sonuçları literatürle karşılaştırılarak pik karakteristiği değerlendirilmiştir.

Grafikte görülen 2996 cm^{-1} asimetrik, 2944 cm^{-1} ise simetrik CH_3 geriliminden kaynaklanan piklerdir. 1755 cm^{-1} C=O gerilimi; 1457 cm^{-1} CH_3 asimetrik gerilimi; 1360 cm^{-1} C-H bandı; 1304 cm^{-1} C-H gerilimi; 1088 cm^{-1} C-O-C simetrik gerilimi; 755 cm^{-1} C=O bantlarına ait piklerdir. Bu pikler referanslarıyla birlikte Çizelge 4.3'te açıkça gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. FTIR spektrumunda PLLA polimerine ilişkin dalga boyu ve bağ yapıları

PLLA		
Dalga Sayısı (cm^{-1})	Bağ Yapısı	Kaynak
2996,8	Asimetrik CH_3 gerilimi	[212, 213]
2948,3	Simetrik CH_3 gerilimi	[212]
1755,6	C=O gerilimi	[214]
1453,7	CH_3 asimetrik gerilimi	[214, 215]

1360,5	C-H bandı	[213, 214]
1300,8	C-H gerilimi	[212]
1088,4	C-O-C simetrik gerilimi	[216]
756,6	C=O bandı	[217]

PCL FTIR analiz sonuçları literatürle karşılaştırılarak pik karakteristiği değerlendirilmiştir. Grafikte görülen 2940 cm^{-1} asimetrik ve 2860 cm^{-1} simetrik CH_2 gerilimi; 1722 cm^{-1} ester karbonil grubunun C=O gerilimi; 1468 cm^{-1} C-C bandı; 1237 cm^{-1} asimetrik C-O-C gerilimi ve 1166 cm^{-1} ve 1047 cm^{-1} simetrik C-O-C gerilimi; 1364 cm^{-1} CH_2 bükülmesi; 1293 cm^{-1} C-C gerilimine ait piklerdir.

Çizelge 4.4. FTIR spektrumunda PCL polimerine ilişkin dalga boyu ve bağ yapıları

PCL		
Dalga Sayısı (cm^{-1})	Bağ Yapısı	Kaynak
2940,9	Asimetrik CH_2 gerilimi	[218]
2863,3	Simetrik CH_2 gerilimi	[219, 220]
1722,0	Ester karbonil grubunun C=O gerilimi	[221-223]
1468,6	C-C bandı	[224, 225]
1364,2	CH_2 bükülmesi	[219]
1293,4	C-C gerilimi	[219, 226]
1237,5	Asimetrik C-O-C gerilimi	[226]
1166,7	Simetrik C-O-C gerilimi	[226, 227]
1047,4	Simetrik C-O-C gerilimi	[218, 222]

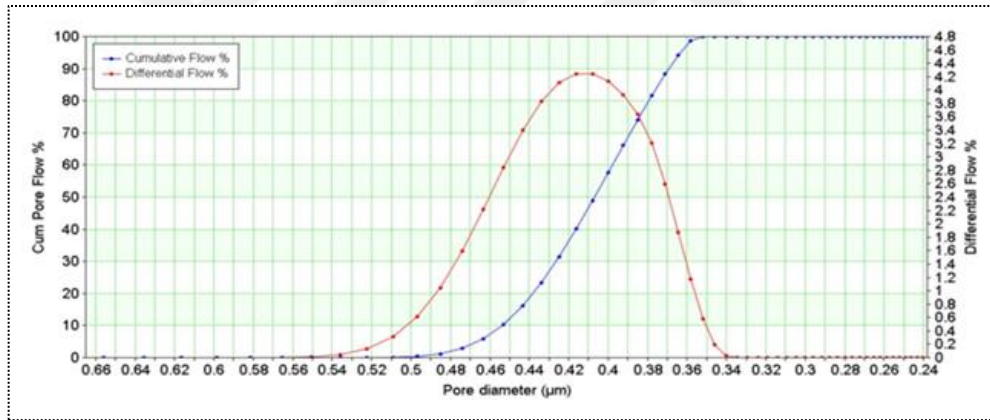
Elde edilen pikler ayrıntılı incelenerek daha önceki literatür bulguları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre hem PLLA hem de PCL fiber moleküllerinin yapısındaki bağlar tanımlanmış ve literatürde gösterilen karakteristik pikler ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.3, 4.4).

4.8.5. Kapiler Akış Porometresi ile Gözenek Boyutunun Belirlenmesi

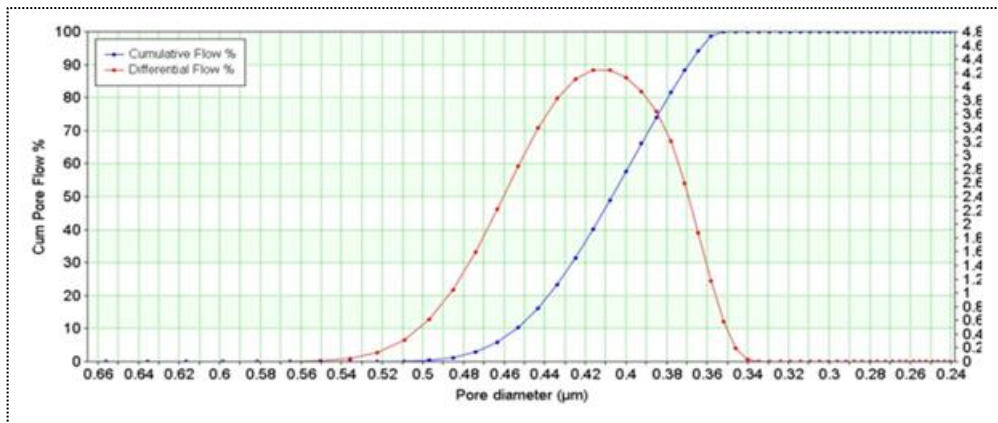
Fiber çap boyutları uygun bulunan PLLA ve PCL membranlarının ortalama gözenek çapı ve dağılımının hesaplanabilmesi amacıyla Porometre cihazından (Capillary Flow Porometry/Quantachrome 3G) yararlanılmıştır (İTÜ/MEMTEK).

Elektroçğirme tekniği ile üretilen membranlar örnek haznesinin içini kaplayacak boyutlarda (18 mm) kesilerek porometre cihazına yerleştirilmiştir. Ve belirlenen basınç altında porometre analizi gerçekleştirilmiştir.

Buna göre PLLA membranlarının gözenek boyutlarının dağılımı Şekil 4.57’de; PCL membranlarının gözenek boyut dağılımları ise Şekil 4.58’de gösterilmiştir.



Şekil 4.57. PLLA membranına ait gözenek boyut dağılımı sonuçları



Şekil 4.58. PCL membranına ait gözenek boyut dağılımı sonuçları

2 saat spinlenen PLLA ve PCL membranlarına ait ortalama gözenek çapı ve dağılımları baz alınarak yapılan değerlendirmede;

PLLA membranlarına ait maksimum gözenek boyutu 0,5310 μm ile minimum gözenek boyutu 0,3546 μm boyut aralığında kaydedilmiş olup **ortalama gözenek çapı 0,3988 μm** olarak ölçülmüştür (Şekil 4.57).

PCL membranlarına ait maksimum gözenek boyutu ise 0,5359 μm ile minimum gözenek boyutu 0,3580 μm boyut aralığında kaydedilmiş ve **ortalama gözenek çapı 0,4000 μm** olarak ölçülmüştür (Şekil 4.58).

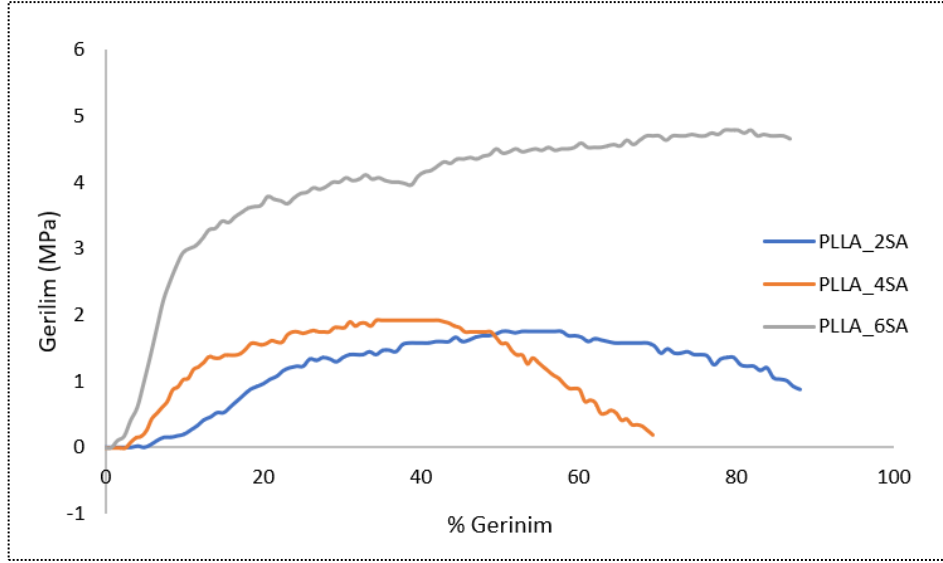
Bu sonuçlara göre analizi gerçekleştirilen hem PLLA hem de PCL membranlarının ortalama gözenek çaplarının 0,4 μm olduğu ve ticari olarak kullanılan biyobozunur olmayan Corning transwell membranlarıyla benzer gözenek çaplarına sahip oldukları tespit edilmiştir [228].

4.8.6. Çekme Testi ile Mekanik Dayanım Tayini

Mekanik özellikler maddelerin çekme, sıkıştırma, kopma gibi kuvvetlere gösterdikleri tepkilerin tamamıdır ve malzemelerin kullanım alanlarını, performanslarını belirleyen ana kriterlerden biridir.

Malzemelerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan ‘Çekme Deneyi’ membranlar üzerine uygulanan 50 N’luk yük altında evrensel test cihazında (Zwick / Roell Z250, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Şerit formunda 2, 4 ve 6 saatlik spinlenmiş membranlar 1x1 cm olacak şekilde kesilerek hazırlanmış ve cihazın kulpları arasına yerleştirilmiştir (Şekil 4.61 ve 4.62). Germe hızı 10 mm dk⁻¹ ayarlanarak uzayıp kopmaları sağlanmıştır (n=3). PLLA ve PCL elektroeğirilmiş membranların mekanik özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla Çekme Deneyleri gerçekleştirilmiştir.

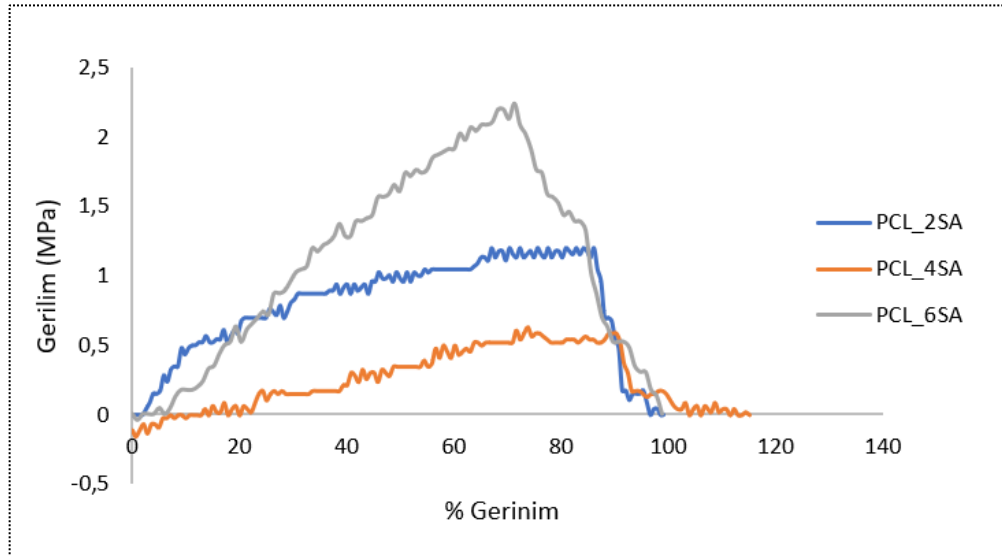
PLLA ve PCL membranlarına uygulanan 50 N’luk yük altında malzemelerin maksimum taşıyabileceği yük ve Çekme Testi sonucu elde edilen gerilim-gerinim grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.59 ve 4.60).



Şekil 4.59. Elektroeğirilmiş PLLA membranların çekme testi ile mekanik dayanımlarının belirlenmesi

Gerilim-gerinim grafiği üzerinden **PLLA** membranlarının ortalama elastik modülleri her bir örnek için aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

- 2 saatlik örnek için Elastik Modülü= $6,82 \pm 0,57$ MPa
- 4 saatlik örnek için Elastik Modülü= $10,57 \pm 1,95$ MPa
- 6 saatlik örnek için Elastik Modülü= $42,95 \pm 1,95$ MPa



Şekil 4.60. Elektroeğirilmiş PCL membranların çekme testi ile mekanik dayanımlarının belirlenmesi

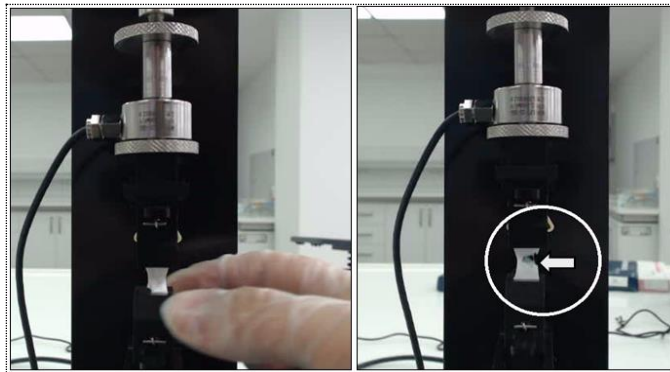
Gerilim-gerinim grafiği üzerinden PCL membranlarının ortalama elastik modülleri her bir örnek için aŗađıdaki gibi hesaplanmıŗtır:

- 2 saatlik örnek için Elastik Mod l = $5,60 \pm 1,54$ MPa
- 4 saatlik örnek için Elastik Mod l = $1,17 \pm 0,70$ MPa
- 6 saatlik örnek için Elastik Mod l = $4,32 \pm 0,11$ MPa

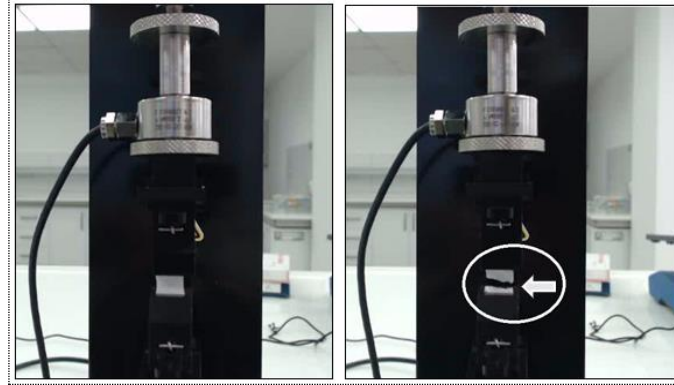
Akciğer dokusu, kiŗinin yaŗamı boyunca milyonlarca solunum döngüsü boyunca oldukça elastik ve mekanik olarak sağlam olan; soluk alıp vermeler sırasında akciğer geniŗlemelerine izin vermek için g   ve elastikiyet arasında ince bir denge gerektiren bir dokudur [132]. Akciğerlerin uyunç (kompliyans) gibi mekanik özellikleri bu organın biyolojik iŗlevlerinin ayrılmaz bir parçasıdır. Bununla birlikte, akciğer, kapsamlı bir Şekilde yakalanması zor olan yüksek ve d ŗ k sertlik ve gözenekli bölgelere sahip, yapısal ve mekanik olarak heterojen bir dokudur. Bu karmaŗıklıđı tam olarak kavramak ve akciğer yapısı ile organ, doku ve hücre ölçeğindeki davranıŗlarla uyumu iliŗkilendirmek amacıyla akciğer mekaniğini anlamak için önemli araŗtırmalar yapılmıŗtır [229].

Akciğer parankiminin hücre dıŗı matrisi baŗlıca kolajen, elastin ve laminadan oluŗmakta; bu yapısal proteinlerin akciğerlerin mekanik özellikleri üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. İskele ve/veya membranların mekanik özellikleri, farklı organlar ve uygulamalar için deđiŗtirilebilen iŗleme parametrelerine bağlıdır. Elastik modül, fiber çapı ve oryantasyonu tarafından düzenlenmekte ve bu nedenle, iskele mimarisi, iskelenin genel performansında bütünleyici bir rol oynamaktadır. [132].

Normal akciğer dokusu için elastik modülün ölçülen bölgeye bağlı olarak 0,44 ile 7,5 kPa arasında deđiŗmekte olduğunu gösteren *in-vitro* ve *in-vivo* karŗılaŗtırmalı  alıŗmalar yapılmıŗtır [73, 81, 230].



Şekil 4.61. PLLA membranlarına uygulanan Çekme Testi ve tam kopma anının gösterilmesi



Şekil 4.62. PCL membranlarına uygulanan Çekme Testi ve tam kopma anının gösterilmesi

Malzemenin kırılmadan dayanabileceği maksimum yük ‘Çekme Mukavemeti’ olarak adlandırılır. Gerçekleştirilen Çekme Testi neticesinde oluşturulan PLLA ve PCL membranlarına ait çekme mukavemetlerinin ortalaması sırasıyla $1,18 \pm 0,57$ MPa ve $1,46 \pm 0,58$ MPa olarak belirlenmiştir.

Literatürde elektroğirilmiş membranların mekanik özellikleri incelendiğinde, fiber yapılarının (çap boyutu, amorf veya kristal fazların dağılımı, fiber yönlenmesi gibi) malzemenin mekanik özellikleri üzerine etkilerinin daha önce rapor edildiği görülmektedir [231]. Polimerik nanofiberlerin fiziksel özelliklerinin çalışıldığı bir yayında 350 nm’den daha küçük çaplı PLLA nanofiberlerin elastik modül değerinin 1.0 ± 0.2 GPa olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada nanofiberlerin çapları arttıkça da elastik modül değerlerinin anlamlı şekilde düştüğünü göstermişlerdir [232].

Literatürde transwell membran olarak yapıştırılıp denenene ve mekanik özelliği test edilen sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Polikaprolakton polimerinin elektroğirme tekniği ile üretilmesine dayalı bu çalışmada membranların Young Modülü değeri $9 \pm 1,3$ MPa olarak bulunmuştur [233]. Ancak bu değer de normal akciğer dokusunun yaklaşık 1 kPa olduğu düşünüldüğünde oldukça sert bir malzeme olarak kalmaktadır [71, 73, 233].

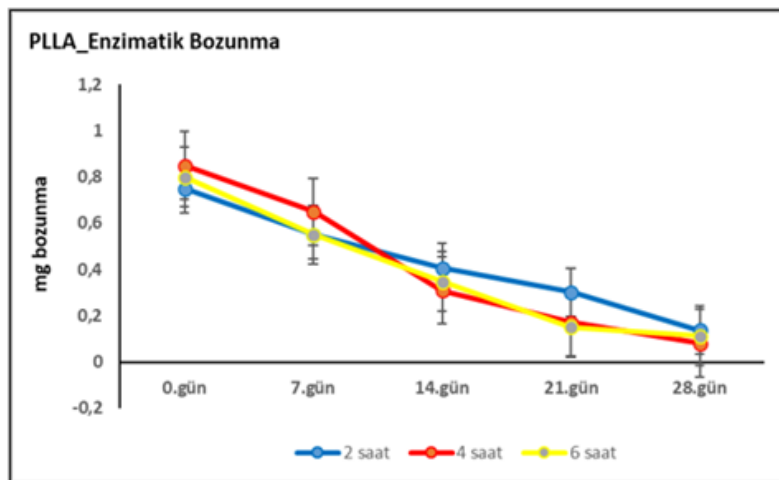
Yapılan çalışmalar elektroğirme işleminde kullanılan polimerlerin moleküler ağırlığının ve tercih edilen çözücüler arasındaki farklılıkların malzemelerin mekanik özelliklerini etkilediğine ilişkin raporlar mevcuttur ve bu durumun literatür bulgularındaki farklı sonuçların sebebi olduğu düşünülmüştür [234, 235].

Şu ana kadar geliştirilmeye çalışılan akciğer doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan çok çeşitli sentetik veya doğal matrisler, modifiye edilebilen 2 boyutlu veya 3 boyutlu modeller *in-vitro* ESM model sistemler olarak yaygın şekilde kullanılsa da bunlar pulmoner dokunun benzersiz uzamsal geometrisini tam olarak taklit etmekte yetersiz kalmaktadır [49].

4.8.7. Elektroeğirilmiş PLLA ve PCL Membranların Bozunma Davranışlarının Belirlenmesi

Doku mühendisliği amaçları için kullanılacak malzeme özelliklerinden biri de biyobozunurluktur. Biyobozunur yapı iskeleleri, doğal hücre dışı matrise benzer belirli mekanik ve biyolojik özelliklere sahip geçici yapılar olarak kullanıldıklarından, genellikle canlı doku mühendisliği için vazgeçilmez unsurlar olarak kabul edilmektedirler [236, 237]. Kabul edilen bu eşlenik dokular zamanla bozulabilmeli ve yeni rejenere dokularla yer değiştirilebilir özellikte olmalıdırlar. Biyolojik olarak işlevsel doku veya doğal ESM'nin rejenerasyonundan önce hücre yapışmasını, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekler nitelikte olmalıdırlar [237].

Biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerler ailesinde PLLA ve PCL, kolay bulunabilirlikleri, değişen oranda biyolojik bozunabilirlikleri ve iyi mekanik özellikleri nedeniyle sıklıkla tercih edilen FDA onaylı biyomedikal polimerlerdendir. PLLA membranlarının *in vitro* bozunma testleri, membranlar 1x1 cm² lik kare parçacıklar şeklinde kesilerek, 1 mL Proteinaz-K (2 mg/ml) enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.63). Çalkalamalı inkübatör içerisinde 37°C sıcaklıkta 28 gün boyunca tutularak kuru membran ağırlıkları 7, 14, 21 ve 28. günlerde ölçülmüştür



Şekil 4.63. PLLA membranlarında enzimatik bozunmanın mg kütle kaybı cinsinden ifadesi

Hidrolitik bozunmanın yanı sıra literatürde PLLA membranlarının enzimatik degradasyonuna sıklıkla atıfta bulunulan Proteinaz-K ile ilgili çalışmalar da yer almaktadır [238]. Proteinaz K'nın, PLLA polimerindeki L-laktil birimlerini bağlayan ester bağlarını hidrolize ettiği pek çok raporla bildirilmiştir [239-241]. Enzimatik bozunma deneylerine ilaveten hücre kültür koşullarını birebir yansıtacak şekilde PLLA ve PCL membranları besiyeri ortamında bekletilerek ve aynı zamanda PBS'e göre daha fizyolojik koşulları yansıtan bir çözelti olan Ringer çözeltisi içerisinde tutularak ek bozunma testleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.64).

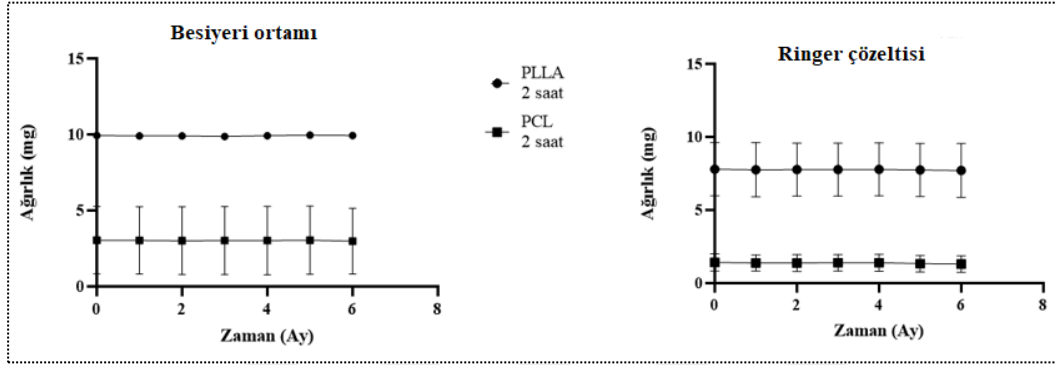
PLLA membranlarında gerçekleştirilen enzimatik bozunma deneylerinde 28. günün sonunda 2 ve 4 saatlik parametrelerdeki membranların %90'ın üzerinde enzimatik bozunmaya uğradığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.63). Bulgular literatürle uyumlu bulunmuştur [240].

PLLA ve PCL membranlarının besiyeri ve Ringer çözeltisi ortamlarında 28 gün süren bozunma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Literatürde bu biyobozunur membranların *in vitro* koşullarda 37°C'de gerçekleştirilen degradasyon profilleri incelendiğinde, membranların optimal yapısal bütünlüğünü ne kadar zaman koruduğu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda *in vitro* degradasyon koşullarının minimum 4 ile 6 ay arasında gerçekleştiği bilinmektedir [242, 243]. 28 günlük degradasyon çalışmalarına ek olarak membranlar ayrıca besiyeri ve Ringer çözeltisi içerisinde 6 aya kadar devam ettirilmiştir (Şekil 4.64).

Doku mühendisliği çalışmalarında bir membran ya da doku iskelesinin optimal degradasyon oranının yeni dokunun oluşum oranına bağlı olduğu bilinmektedir (havayolu re-epitelizasyon veya kondrojenenezis gibi) [243, 244]. Yapılan çalışmalarda *in vivo* degradasyon hızının *in vitro* ile karşılaştırıldığında çok daha hızlı olduğu gösterilmiştir [245].

Şekil 4.64'te PLLA ve PCL membranların besiyeri ve sentetik vücut sıvısı (Ringer çözeltisi) ortamında 6 ay süreyle tutularak gerçekleştirilen degradasyon deneylerinin sonuçları paylaşılmıştır. Deney sonuçlarına göre ne PLLA ne de PCL membranlarda 6 ay boyunca anlamlı bir bozulmanın henüz başlamadığı anlaşılmıştır. PLLA membranlar besiyeri ortamında %0,5; PCL membranlar %1,02 bozunma gösterirken; Ringer çözeltisi

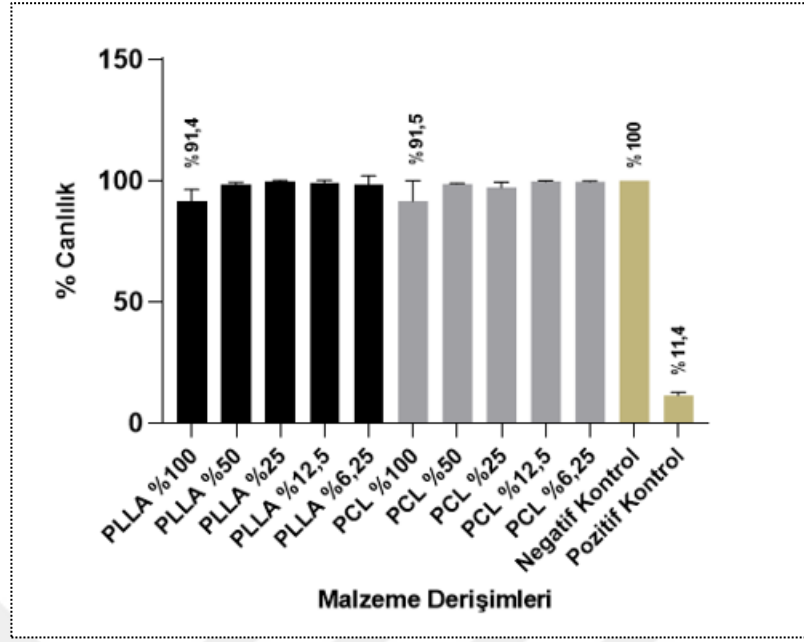
ortamında PLLA membranlar %0,8; PCL membranlar ise %1,5 bozunmaya uğramışlardır (Şekil 4.64). PLLA ve PCL membranların 6 aya kadar anlamlı bir bozunma davranışı sergilemeyip stabil kalmaları havayolu *in-vitro* modellemesi deneyleri açısından bir avantaj teşkil etmektedir. Membranların bu anlamda *in-vitro* bozunma direnci sergilemeleri trake, bronş gibi yapıların onarılmasını uzun süre destekleyebilir olması bakımından önem taşımaktadır ve doku mühendisliği çalışmalarında iyi birer araç olarak değerlendirilebilir olduklarını düşündürmektedir [246].



Şekil 4.64. PLLA ve PCL membranlarının besiyeri ve Ringer çözeltisi ortamında bozunma profillerinin mg kütle kaybı cinsinden ifadesi (deney statik koşullarda 6 ay boyunca sürdürülmüştür).

4.8.8. PLLA ve PCL Membranlarının Sitotoksosite Analizi

PLLA ve PCL membranlarının hücre kültür sistemlerinde değerlendirilmesi ve *in vitro* sitotoksosite etkilerinin araştırılması için TS EN ISO 10993-5 ve TS EN ISO 10993-12 standartları esas alınarak gerçekleştirilen sitotoksosite deneylerinin sonuçları Şekil 4.65'te paylaşılmıştır.



Şekil 4.65. PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen sitotoksosite analizi

PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen özüt analizi verilerine göre; en yüksek derişime sahip %100 PLLA ve %100 PCL membranlarında canlılık değeri %91 olarak kaydedilmiş ve derişim oranları azalırken de yine kontrole yakın canlılık göstermişlerdir (Şekil 4.65). Buna göre ISO 10993-5 standardı referans alınarak yapılan değerlendirmeye göre deney numunelerinin hem PLLA hem de PCL membranlarının sitotoksik olmadığı anlaşılmıştır.

4.9. PLLA ve PCL Membranlarda Hücre Kültürü Deneyleri

PLLA ve PCL biyobozunur membranlar üzerinde hücre kültürü çalışmaları öncelikli olarak proliferasyon analizi ile başlamıştır. Proliferasyon deneyinin ardından mono-kültür ve ko-kültür deneyleri gerçekleştirilmiş ve TEER ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra membranlar üzerinde epitel hücrelerin varlığını ve tabakalaşmış bariyer oluşumunu göstermek adına hematoksilen&eoizin boyamaları ve hücrelerde yer alan proteinleri boyamak için de immünotokimya çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.9.1. Biyobozunur Transwell İnsert'lerin Hazırlanması

PLLA ve PCL nanofiber membranlar yeniden yapılandırılmış transwell insert'lerin altına tutturulması amacıyla biyoyumlu, yarı-saydam ve silikon elastomeri olan 'Kwik-Sil' adlı cerrahi yapıştırıcı kullanılarak yapıştırılmıştır. PLLA ve PCL membranlar, gözenekli yapıyı oluşturan fiberli kısmının hücre bağlanması ve infiltrasyonuna uygun olması için,

yalnızca insert parçanın kesik olan kenarına yapıştırılmıştır. Numuneler, en az 2 saat boyunca %70 etanol içinde inkübe edilmiş ve 24 kuyucuklu plakalarda sterilize edildikten sonra 1X steril PBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarına hazır hale getirilmesi için membranlar Dulbecco Modifiye Eagle's Medium (DMEM) besiyeri ile yıkanmış ve ardından aspire edilmiştir. Son aşamada modifiye edilen membranlı insert'ler, etkili bir hücre tutunmasının gerçekleştirilmesi adına 12 saat boyunca Fetal Bovin Serum (FBS) içeren ortamda inkübe edilmiştir.

Ertesi gün membranların üzerlerindeki FBS uzaklaştırılmıştır. Kurumaya bırakıldıktan sonra kontrol edilen membranların arasından yapışmamış olanlar varsa deneye dahil edilmemiştir. Düzgün bir şekilde %100 membran-insert birleşiminin sağlandığı membranlarla çalışmalara devam edilmiştir.

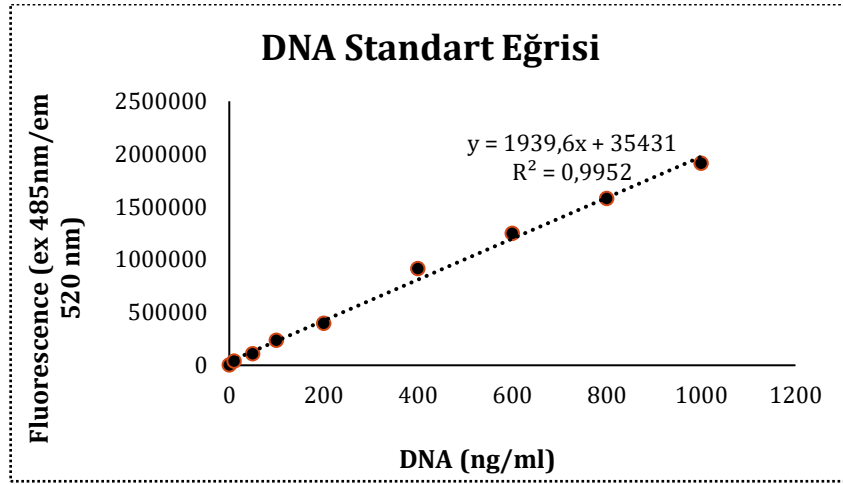
Membranların yapıştırılması aşamasında dikkat edilmesi gereken noktalardan biri de yapıştırıcının mümkün olduğunca insert'in sadece kesik kısmının kenarına taşırılmadan konulmasıdır. Yapıştırıcının fazla dökülmesi membranlar tarafından emilerek gözeneklerinin tıkanmasına sebebiyet vermektedir. Bu durumda membranlar ıslak görünümlü bir hale geçmiştir. Böyle bir durumla karşılaşıldığında yine membranlar kullanılmayarak ayrılmış ve düzgün yapıştığından emin olduğumuz membranlarla devam edilmiştir.

4.9.2 PLLA ve PCL Membranlarda Hücre Proliferasyonu Analizi

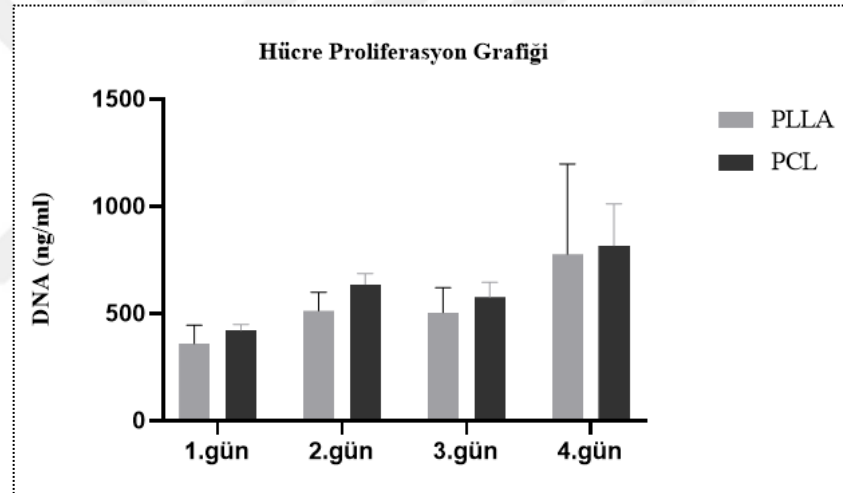
PLLA ve PCL membranlar üzerinde epitel hücrelerinin proliferasyon olup olmadığı ilk 4 güne kadar test edilmiştir. 4 günden sonra havayolu epitel hücreleri havaya maruz bırakılıp farklılaşmaya alındığından hücrelerin proliferasyonu durdurup farklılaşma proteinlerini aktive ettiği bilinmektedir [247].

PLLA ve PCL membranlarda proliferasyon deneyleri, hücre proliferasyonunu DNA miktar artışı (ng/ml) üzerinden tayin edebilen “CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit” (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Deney 1., 2., 3. ve 4. günlerdeki hücre proliferasyonunu test edecek şekilde tasarlanmış ve CyQuant Cell Proliferation Assay kitine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.66. CyQuant Hücre Proliferasyon kit protokolüne göre gerçekleştirilen DNA standart eğrisi



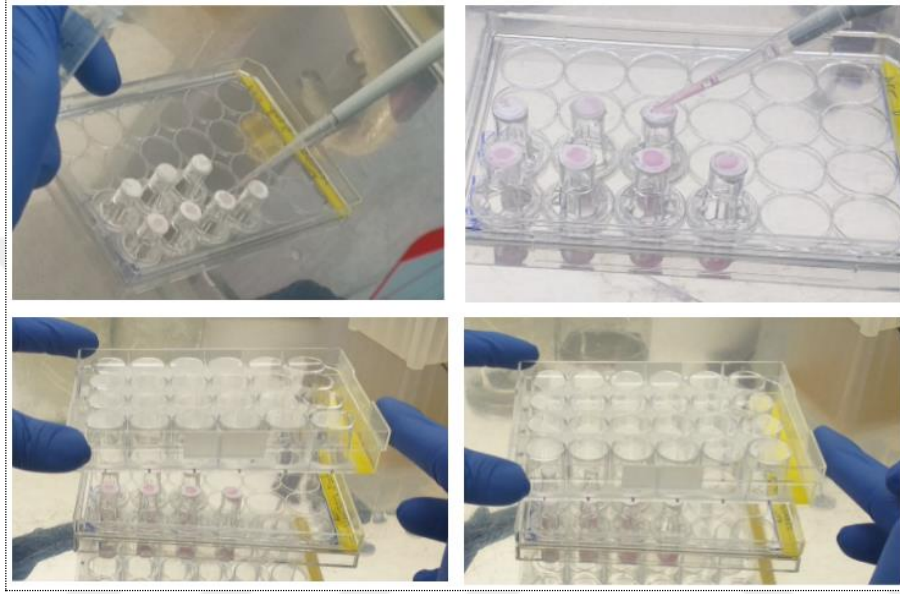
Şekil 4.67. PLLA ve PCL membranlara ait hücre proliferasyon grafiği

CyQuant hücre proliferasyon kitinde yer alan protokol ölçütlerine göre DNA standart eğrisi oluşturulmuştur. Grafik üzerinde $y=mx+n$ denklemi belirtilmiştir; burada X ng/ml olarak DNA konsantrasyonunu, y ise ex:480 nm ve em:520 nm'deki absorbans değerini göstermektedir (Şekil 4.66).

Şekil 4.67'de yer alan PLLA ve PCL membranlara ait hücre proliferasyon grafiği Şekil 4.66'daki DNA standart grafiği baz alınarak ng/ml olarak hesaplanmıştır. PLLA ve PCL membranlar üzerinde yetiştirilen hücrelerin farklılaşma öncesi 4 günlük proliferasyonları değerlendirilmiş ve birinci günden son güne %51 oranında bir proliferasyon artışı kaydedilmiştir.

4.9.3. PLLA ve PCL membranlarda mono-kültür ve ko-kültür deneyleri

PLLA ve PCL membranların karakterizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra hücre kültürü deneylerine geçilmiştir. Transwell'ler üzerine yapıştırılan membranlar 24 kuyucuklu plakalara aktarılmış ve mono-kültür ve ko-kültür deneyleri ayrı setler halinde gerçekleştirilmiştir. PLLA ve PCL membranlarda ko-kültür deneyinin yapılışı Şekil 4.68'te gösterilmiştir.



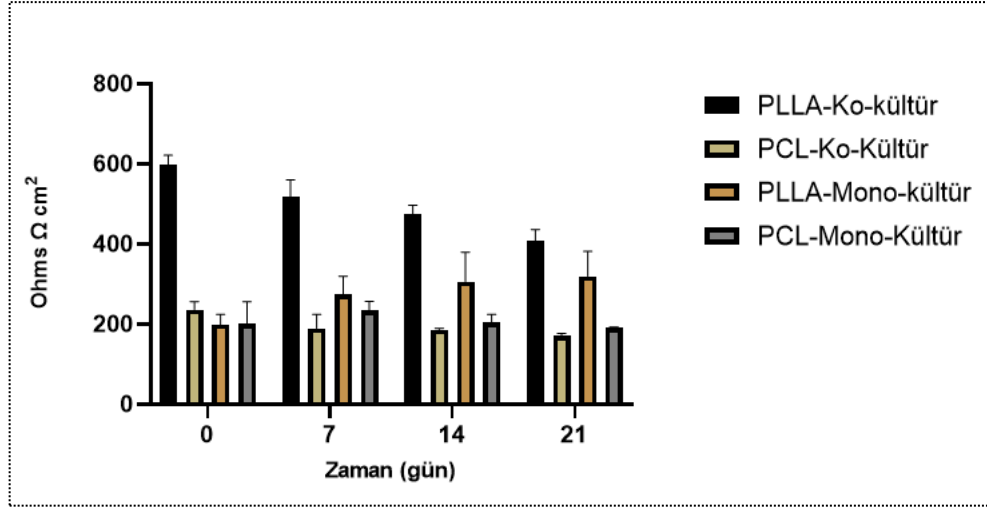
Şekil 4.68. PLLA ve PCL membranlarda ko-kültür deneyinin yapılışı (ters ekim).

Membranlarda mono-kültür ve ko-kültür çalışmaları Bölüm 3.7'1 de transwell-membranlarda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.9.4. PLLA ve PCL Membranlarına Ekilen Bronş Epitel Hücrelerin TEER Ölçümleri

PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen mono-kültür ve ko-kültür çalışmaları boyunca membranlar üzerinde 0, 7, 14 ve 21. günlerde bronş epitel hücrelerde TEER ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

PLLA ve PCL membranlara ait TEER değerlerinin sonuçları Şekil 4.69'da paylaşılmıştır.

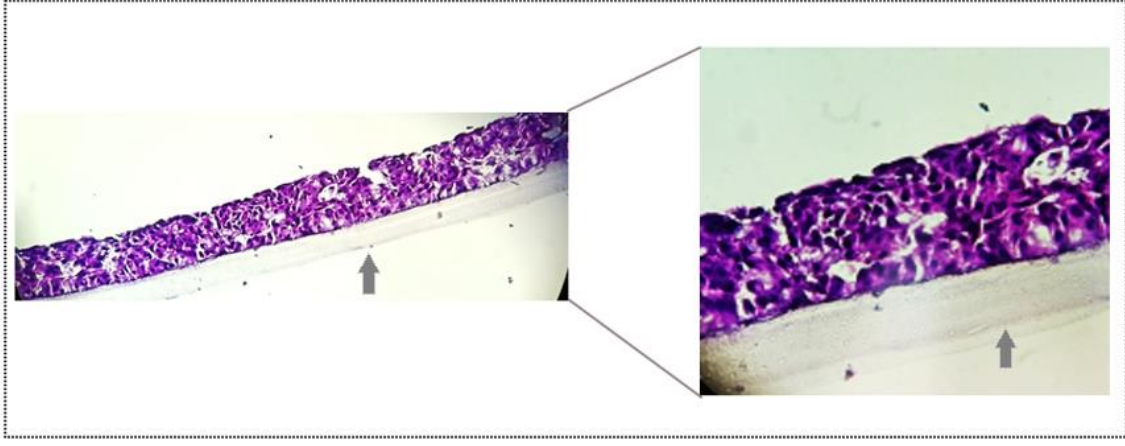


Şekil 4.69. PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen TEER analizi sonuçları

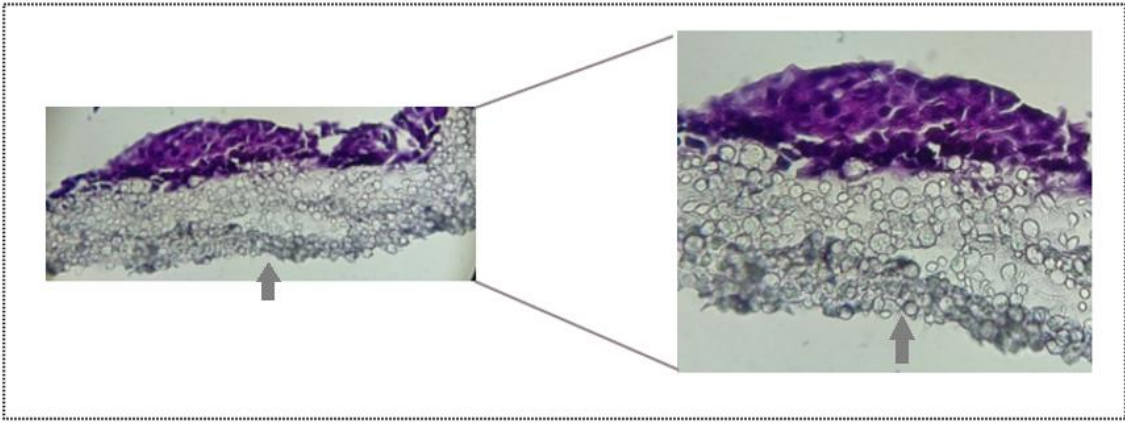
Şekil 4.69'daki grafik incelendiğinde PLLA mono-kültürde gerçekleştirilen deneyde TEER değerleri sıfırdan itibaren 21.güne kadar artış göstermiştir. PLLA ko-kültürlerin olduğu grup ise zaman içerisinde azalma eğilimi göstermiştir. 600 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ olarak başlayan TEER değeri 21.günün sonunda yaklaşık 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ 'ye kadar düşmüştür. PCL mono-kültür gruplarında TEER değeri 0.günde 201 $\Omega \cdot \text{cm}^2$; 7.günde 235 $\Omega \cdot \text{cm}^2$; 14.günde 201 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ve 21. günde 191 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ olarak ölçülmüştür. PCL ko-kültür grupları incelendiğinde 0.günde 236 $\Omega \cdot \text{cm}^2$; 7.günde 189 $\Omega \cdot \text{cm}^2$; 14.günde 186 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ve 21. günde 170 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ olarak ölçülmüştür. TEER değerleri sonucuna göre sadece PLLA membranların mono-kültür gruplarında düzenli şekilde TEER değerlerinin artışı gözlenmiştir. Bu da bize PLLA membranlarının düzgün şekilde hücrel bariyer oluşturduğunu ve 21 gün boyunca sürdürülebilir olduğunu göstermiştir.

4.9.5. PLLA ve PCL Membranlarına Ekilen Bronş Epitel Hücrelerin Hematoksilen&Eozin Boyama ile Görüntülenmesi

PLLA ve PCL membranlarına ekilerek ALI kültür yöntemi ile çoğaltılan bronş epitel hücrelerin membran yüzeyine etkin bir şekilde tutunup çoğaldığını göstermek için Hematoksilen & Eozin boyama yapılmıştır. Boyama sonuçları Şekil 4.70 ve Şekil 4.71'de paylaşılmıştır.



Şekil 4.70. PLLA membranlarına ekilen epitel hücrelerinin hematoksilin&eozin boyama ile görüntülenmesi. Hücre çekirdeği: mor; sitoplazma: pembe. (Oklar PLLA membranını göstermektedir).



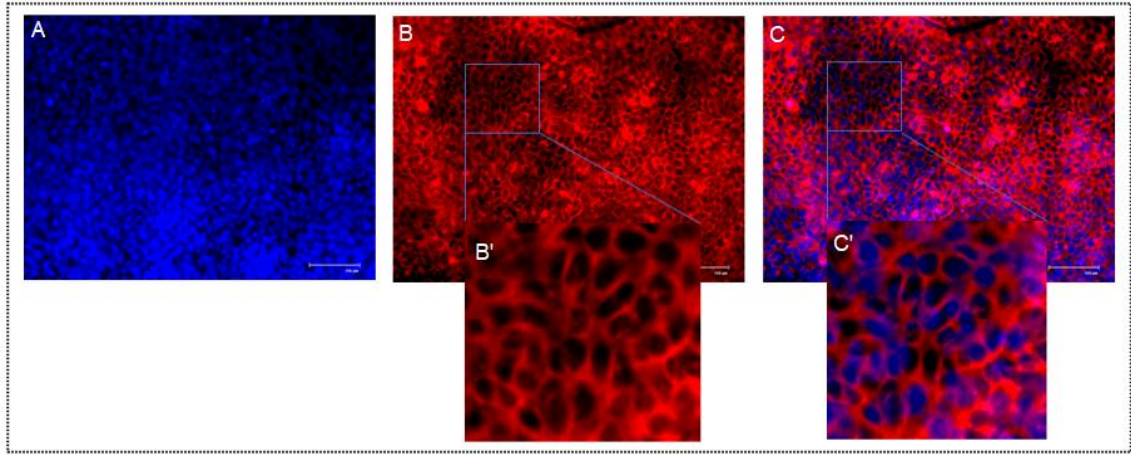
Şekil 4.71. PCL membranlarına ekilen epitel hücrelerinin hematoksilin&eozin boyama ile görüntülenmesi. Hücre çekirdeği: mor; sitoplazma: pembe. (Oklar PCL membranını göstermektedir).

Kriyostat kullanarak dikey kesit alınan PLLA ve PCL membranların boyama sonrası elde edilen görüntülerde hücrelerin canlılıklarını koruyarak etkin bir şekilde membranlar üzerinde çoğaldığı ve epitel tabakalaşmanın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.70 ve 4.71).

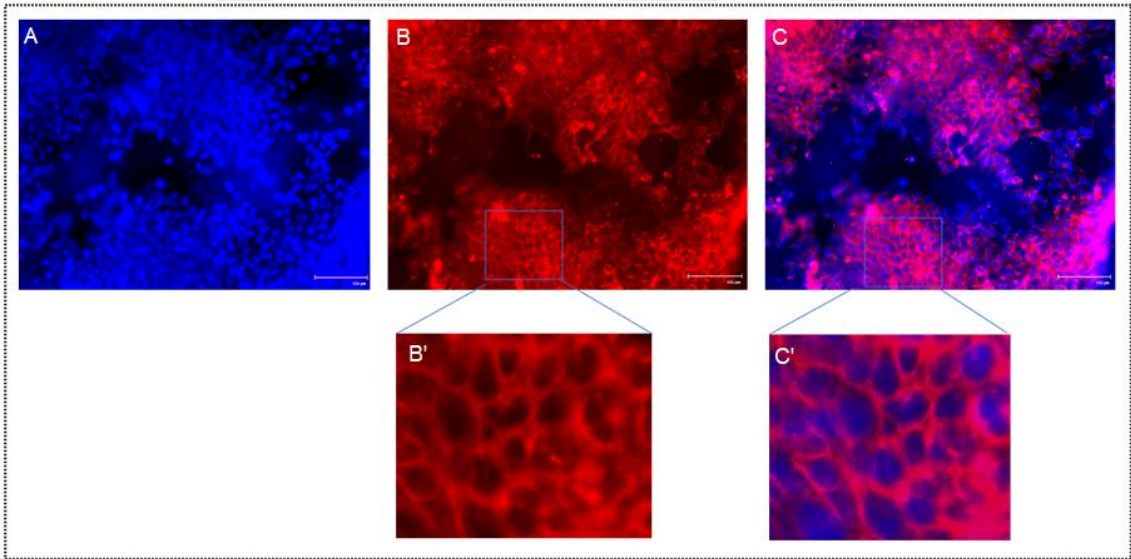
4.9.6. PLLA ve PCL Membranlarına Ekilen Bronş Epitel Hücrelerin İmmünohistokimyasal Analiz ile Görüntülenmesi

PLLA ve PCL membranlarına ekilerek ALI kültür yöntemi ile çoğaltılan hücrelerin membran yüzeyine etkin bir şekilde tutunduğu gösterildikten sonra membranlarda ifade

olan proteinlerin gösterilebilmesi için immünositokimya analizleri gerçekleştirilmiştir. İmmünositokimya boyama sonuçları Şekil 4.72 ve Şekil 4.73'te paylaşılmıştır.



Şekil 4.72. PLLA membranlarına ekilen epitel hücrelerde β -Tubulin proteininin immünositokimya analizi ile görüntülenmesi. (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: β -Tubulin boyama (kırmızı), C: A ve B'nin çakıştırılmış görüntüsü). (B' ve C': B ve C'nin yüksek büyütmeli görüntüleridir).

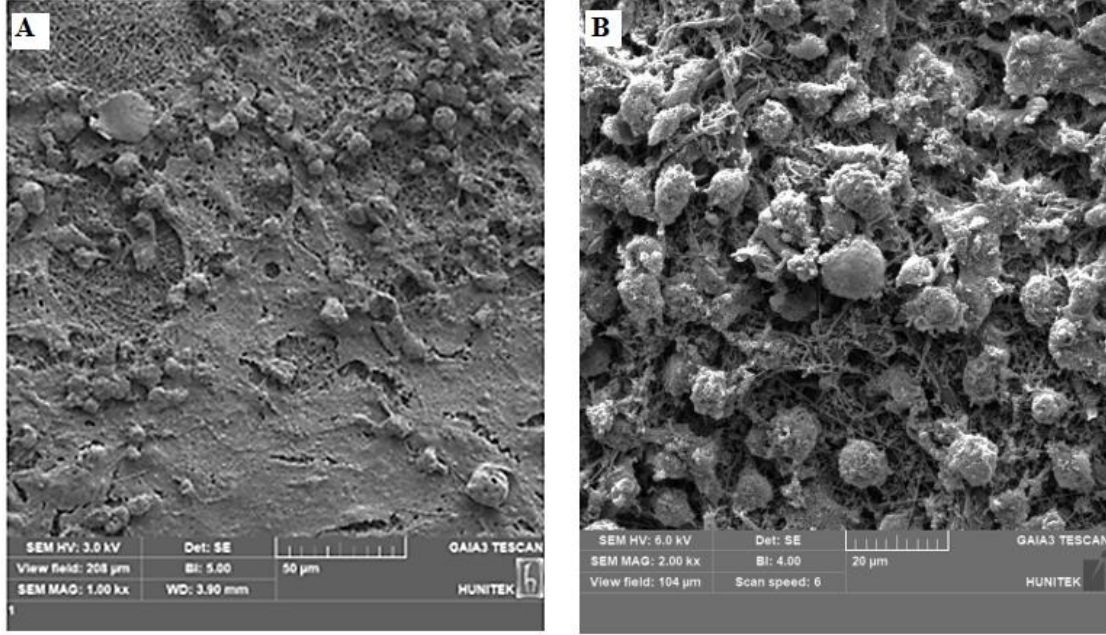


Şekil 4.73. PCL membranlarına ekilen epitel hücrelerde β -Tubulin proteininin immünositokimya analizi ile görüntülenmesi. (A: Çekirdek boyaması (mavi), B: β -Tubulin boyama (kırmızı), C: A ve B'nin çakıştırılmış görüntüsü (B' ve C': B ve C'nin yüksek büyütmeli görüntüleridir).

PLLA ve PCL membranlarına ekilip farklılaştırmaya alınan bronş epitel hücrelerinin immünositokimyasal analiz ile görüntülenmesi çalışmalarında hücrelerde β -Tubulin proteininin varlığı gösterilmiştir.

4.9.7. PLLA ve PCL Membranlar Üzerine Ekilen Epitel Hücrelerinde SEM Analizi

PLLA ve PCL nanofiber membranlarının hücrel uyumluluğunu ayrı ayrı değerlendirmek amacıyla, nanofiberli membranlar üzerinde hücre yapışması ve yayılma durumları SEM kullanılarak gözlemlenmiştir. Şekil 4.74, hücre kültüründe 21 gün sonra PLLA ve PCL membranları üzerinde büyütülen hücrelerin SEM görüntülerini göstermektedir.



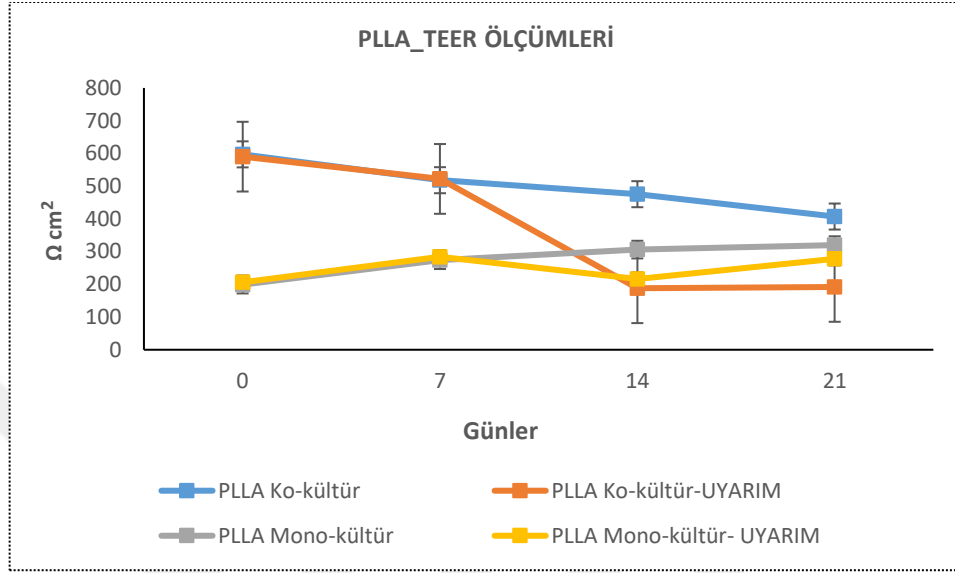
Şekil 4.74. PLLA ve PCL membranlar üzerinde ko-kültüre edilen epitel hücrelerinin SEM görüntüleri (A: PLLA membran-1000X büyütme; B: PCL membran 2000X büyütme).

Şekil 4.74’te PLLA ve PCL membranlar üzerinde ko-kültüre edilmiş hücrelerin sadece üst yüzeyden çekilmiş görüntüleri incelendiğinde, her iki membran yüzeyinde de sferoid tipi morfolojilerin varlığı, hücrelerin membranlara tutunmuş olduğunun bir kabulü olarak görülmektedir [233, 248]. Hücreler nanofiber topografyası boyunca membranlara tutunmuş ve iyi bir şekilde membranlarla hücre kümeleri oluşturmuştur.

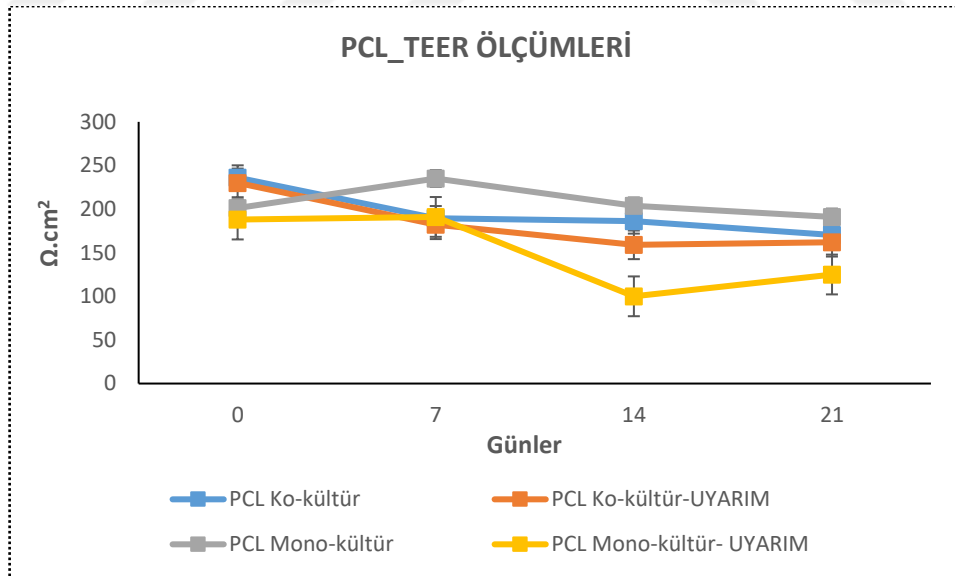
4.9.8. HDM ve Sitokinlerle (IL-4+IL-13) Uyarılan PLLA ve PCL Membranlara Ekili Hücrelerde TEER Analizi

ALI kültür’de farklılaştırmaya alınarak büyütülen epitel hücreleri, PLLA ve PCL membranlarda da hastalık modelini taklit edebilmesi amacıyla, epitel hücre sıkı bağlantılarını yıktığı literatürde gösterilmiş alerjen ve sitokinler varlığında uyarılmıştır [205, 249]. PLLA ve PCL membranlara ekili epitel hücreler IL-4 ve IL-13 varlığında

HDM alerjisi ile 24 saat uyarıldıktan sonra TEER değeri karşılaştırılmıştır. Gerçekleştirilen TEER değerlerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.75 ve Şekil 4.76'da paylaşılmıştır.



Şekil 4.75. PLLA membranlarda kültüre edilen A549 epitel hücrelerinin 14.gün uyarımı ve TEER ölçümleri



Şekil 4.76. PCL membranlarda kültüre edilen A549 epitel hücrelerinin 14.gün uyarımı ve TEER ölçümleri

ALI kültürde farklılaştırılan A549 hücrelerine 14.günde apikalden HDM alerjisi, bazaldan ise IL-4 ve IL-13 sitokinleri verilerek farklılaşma ve uyarım öncesi-sonrası

TEER değerleri karşılaştırılmıştır. Uyarım yapıldığı gün olan 14. günden sonra ALI kültürde hücreler 1 hafta daha devam ettirilerek sıkı bağlantı yapılarında bir farklılık olup olmadığı araştırılmaya çalışılmıştır. Bu süreç içerisinde 14.günden 21.güne kadar TEER değerlerinde artış kaydedilmiştir. Bu da bize hücre etkinliğinin uyarım sonrası da devam ettiğinin ve havayolu yeniden modellemesinde (remodelling) hastalık modelinin *in-vivo* ortamdaki gibi taklit edilebilir olması bakımından kullanılabilir malzemeler olduğunun nn açmıştır [206].

PLLA ve PCL membranlar hava yolu epitelinin hücresel ve yapısal temsiline uygun olup akciğer biyolojisi, hastalık modellemesi ve ilaç keşfi alanlarında akademik ve farmasötik araştırmalar için de önemli bir araç sunmakta ve bu alanda bazı hayvan deneylerine olan ihtiyaı azaltma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında piyasada ticari olarak satılan ve hava-sıvı arayüzü kültür sistemlerinde kullanılan transwell membranların kullanım potansiyellerini artıracak, ko-kültür çalışmalarını kolaylaştıracak yeni 3 boyutlu transwell-adaptör model sistemler geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla tezin ilk hedefi olarak, farklı tasarımlara sahip transwell-adaptör modellerin baskısı alınarak hücre kültür sistemlerine entegre edilmiştir. Uygun bulunan biyouyumlu adaptör modelin sitotoksosite (MTT) çalışmaları gerçekleştirilmiş ve ko-kültür çalışmalarında kullanılmıştır. Farklı hücre hatlarında modelin etkinliği test edilip TEER analizleri gerçekleştirilmiştir. Havayolu epitel hücrelerinin akciğer fibroblastları ile olan hücre-hücre etkileşimlerinin gerçekleştirildiği ko-kültür çalışmaları yapıp Hematoksilen&Eozin boyama, Taramalı Elektron Mikroskobu ile görüntüleme çalışmaları, immünositokimyasal analiz ile epitele özgü farklılaşma proteinlerinin boyamaları gerçekleştirilmiştir. Havayolu epitel hücrelerinde ifade olan genlerin belirlenmesi amacıyla Gerçek Zamanlı PZR çalışmaları yapılmıştır. Etkinlikleri belirlenen modeller üzerinde astım hastalığını modelleyebilmek ve doğrulayabilmek amacıyla havayolu epitel bariyerlerini bozduğu literatürde bilinen alerjen ve sitokinlerle uyarılarak validasyon çalışmaları yapılmıştır. Tezin ikinci hedefi olan ve piyasada bulunan biyobozunur özellikte olmayan membranların yerine biyobozunur özellikte membranlar (PLLA ve PCL) tasarlanarak yeni membran sistemler geliştirilmiştir. Sentezlenen biyobozunur membranların karakterizasyonları yapılarak fiber çapları, kalınlık, kimyasal yapı analizi, gözeneklilik, mekanik dayanım, biyobozunurluluk ve sitotoksosite analizleri gerçekleştirilmiştir. Hava-sıvı arayüzü sistemlerinde kullanılmak üzere geliştirilen yeni biyobozunur membran sistemlerinde de tezin ilk hedefinde olduğu gibi ko-kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve H&E, İmmünositokimya ve TEER ölçüm çalışmaları yapılmıştır. Hastalık modellemesi için yine aynı alerjen ve sitokinlerle havayolu epitel hücrelerinin uyarımları gerçekleştirilip validasyonları yapılmıştır.

Tez çalışmaları kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi yorumlanmıştır.

- Çalışmanın ilk hedefi olan ve piyasada ticari olarak satılan epitel hücre farklılaşmasında sıklıkla kullanılan transwell insertlerin her iki yüzüne de kolaylıkla hücre ekiminin yapılabileceği bir adaptör tasarımı geliştirilmiştir.
- 8 farklı transwell-adaptör modelin baskısı alınıp hücre kültürü sistemlerine entegre edilerek ön denemeler yapılmıştır. Gerçekleştirilen ön denemelerde ilk 7 model başarısız olmuştur. Sızıntı çalışmalarının neticesinde başarılı olarak kabul edilen biyouyumlu medikal reçineden üretilen Adaptör Model-8 seçilmiştir.
- Yeni 3B adaptör modellere uyacak şekilde ölçüleri belirlenen 24 kuyucuklu plakaya ek parçalar getirilerek yeni kapak tasarımı oluşturulmuş ve kapağın yapılandırılmasında ‘fotopolimer reçine’ kullanılmıştır. Modelin baskısı Solid Works programı kullanılarak alınmıştır. Yeni tasarlanan bu parça deneyler sırasında herhangi bir kontaminasyona sebep olmamıştır.
- Adaptör Model-8’in hücre kültürlerinde uygunluğunun test edilmesi amacıyla sitotoksosite (MTT) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Buna göre test ettiğimiz numunenin (adaptör model özütü) %100 özütünün canlılığı %94,8 olarak hesaplanmış olup sitotoksosite potansiyeli olmadığı yorumu yapılmıştır. %50, %25, %12,5 ve %6,25 özüt değerlerinde ise bu canlılık oranı %94,8’in üzerinde olduğu için malzememizin biyouyumlu ve sitotoksik özellikte olmadığı anlaşılmıştır.
- Hücre kültürlerinde etkinliği test edilen yeni transwell-adaptör model kullanılarak ko-kültür çalışmalarına geçilmiştir. Ko-kültür çalışmaları hem Corning firmasının önerdiği hem de yeni 3B adaptör model sistemler ile yapılmıştır.
- Ko-kültür deneyleri, BEAS-2B sağlıklı bronş epitel ve A549 kanserli alveolar epitel hücre hatlarının kullanılmasının yanı sıra astımlı bireylerin bronşlarından izole edilen primer hücrelerle de gerçekleştirilmiştir.

- Ko-kültür süresince hücrelerin gelişimi takip edilmiş ve farklılaşmaya alındıktan sonra transwell membranının apikal yüzeyinde hiçbir sızıntı meydana gelmediği gözlemlenmiştir. Bu durum hücrelerin birbirleriyle bağlantıda olduklarını ve sıkı bağlantı yapılarının düzgün şekilde oluşturduklarını göstermektedir.
- Corning model ile ekilen hücrelerin yeni transwell adaptör ile ekilen hücrelere kıyasla daha fazla hücre kaybına neden olduğu, (ko-kültür ekiminde membranın bazal kısmına ekilen ve tutunamayan hücrelerin dökülmesi), transwell adaptör sistemle gerçekleştirilen ekim yönteminde ise neredeyse hiç yüzen hücrenin olmadığı anlaşılmıştır.
- Hava-sıvı arayüzü (ALI) kültür sistemine göre farklılaştırılan hücrelerde TEER ölçümleri hem sağlıklı bronşial epitel BEAS-2B, hem de akciğer alveolar epiteli A549 hücre hatlarıyla gerçekleştirilmiş ve literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu hücrelerin dışında primer epitel hücreleriyle de TEER analizleri gerçekleştirilmiş ve literatürle desteklenmiştir.
- Transwell membranlar üzerinde ekimi gerçekleştirilen epitel hücreler Hematoksilen & Eozin ile boyanmış ve hücrelerin canlılıklarını koruyarak etkin bir şekilde çoğaldığı ve epitel tabakalaşmanın olduğu tespit edilmiştir.
- ALI kültür yöntemi ile transwell-adaptör modeli kullanılarak çoğaltılan hücrelerde ZO-1, β -Tubulin, E-kaderin ve Muc5ac proteinlerinin ifadesini tespit edebilmek için immunositokimya boyamaları gerçekleştirilmiş ve çalışmalar neticesinde BEAS2B, A549 ve primer epitel hücrelerde bu proteinlerin varlığı doğrulanmıştır.
- ALI kültür yöntemi ile farklılaştırılan A549 hücrelerde ZO-1(TJP1) ve E-kaderin (CDH1) genlerinin ifadesinin belirlenmesi amacıyla gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre transwell adaptör modeli ve mono-kültür ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda TJP-1 ve CDH1 gen ifadelerinin Transwell adaptör modeli kullanılan grupta 14. günde arttığı tespit edilmiştir. TJP-1 gen

ifadesi 0. güne kıyasla 14.günde 5 katlık bir artış göstermiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. CDH1 gen ifadesi ise 3 katlık artış göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Mono-kültür yönteminde ise hem TJP-1 hem de CDH1 gen ifadelerinde 14.günde azalma tespit edilmiştir.

- ALI kültür’de oluşturulmuş modellerin hastalık modelini taklit edebilmesi amacıyla, epitel hücre sıkı bağlantılarını yıktığı literatürde gösterilmiş farklı alerjen denemeleri ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu amaçla ev tozu akarı olarak bilinen ve solunum yolu alerjik hastalığının patogeneğinde güçlü rol oynayan HDM alerjeni kullanılarak doz denemeleri gerçekleştirilmiştir.
- Artan konsantrasyonda HDM ile uyarılan epitel hücrelerde doz artışına bağlı olarak hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. 100 µg/ml HDM ile uyarılan hücrelerde canlılık %75’e düşmüştür. MTT deneyi sonucu Etbr/Calcein deneyleri ile doğrulanmıştır.
- HDM ile 24 saatlik uyarmı sonrası 10 µg/mL konsantrasyondan itibaren hücre ölümünün başladığı ve hücre canlılığının doz artışına bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. 24 saat uyarmı için yapılan mitokondriyel aktivite testinin floresan hücre görüntüleriyle uyumlu olduğu görülmüştür.
- Tez çalışması kapsamında etkin bir hastalık modeli oluşturmak amacıyla besiyeri ortamına IL-4 ve IL-13 sitokinleri eklenerek deneyler gerçekleştirilmiştir.
- Epitel hücreleri IL-4 ve IL-13 varlığında HDM alerjeni ile 24 saat uyarıldıktan sonra EtBr/Kalsein AM floresan boyama ile hücre canlılıkları test edilmiştir. Artan konsantrasyonda HDM ile IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile uyarılan bronş epitel hücrelerinde konsantrasyon artışın ile hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. En yüksek doz olan 100 µg/ml HDM ile uyarılan hücrelerde IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin varlığı ile hücrelerde büzüşme, yüzeyden kopup ayrılma ve morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir.

- HDM konsantrasyonu artışı ile hücrelerde ZO-1 sıkı bağlantı proteinlerinin kırılmaya başladığı tespit edilmiştir. ALI kültür deneylerine IL-4 ve IL-13 varlığında 100 µg/ml HDM ile devam edilmesine karar verilmiştir.
- HDM ve sitokinlerle (IL-4 + IL-13) uyarılan primer hücrelerin validasyonu ve TEER analizi gerçekleştirilmiştir. 21.günde transwell insert'lerin apikal kısmına 100 µg/ml HDM ve bazal kısmına da IL-4 (25 ng/ml) +IL-13 (25 ng/ml) olacak şekilde uyarımları yapıldıktan sonra TEER ölçümleri yapılmıştır.
- Transwell kültürlerde farklılaştırılan mono-kültür ve ko-kültür gruplarında 7, 14 ve 21.günlerdeki TEER sonuçları değerlendirilmiştir. 21.günde uyarımları gerçekleştirilen ko-kültürlerde 2500-3000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ aralığında iken uyarıldıktan 24 saat sonra bu değer 980 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ seviyesine düşmüştür. Bu durum bize literatürde hastalık modelini taklit edebilmek için sıklıkla kullanılan alerjen ve/veya sitokinlerin bu modelle de çalışıyor olduğunu göstermektedir.
- Transwell-adaptör modeli kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda astımlı primer epitel hücrelerinin IL-4 ve IL-13 varlığında HDM ile uyarımı sonucu TEER değerinde düşüş tespit edilmiştir. Ayrıca ZO-1 bağlantı proteinin yapısının HDM ile uyarım sonucu bozulduğu gösterilmiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar Transwell-adaptör modeli kullanılarak gerçekleştirilen ko-kültür deneylerinde havayolu epitel hücrelerinin başarılı bir şekilde farklılaştırılarak hastalık modelini oluşturduğunu göstermiştir.
- Transwell-adaptör model kullanılarak ko-kültür koşullarında geliştirilen epitel-fibroblast hücrelerinin varlığı SEM kullanılarak analiz edilmiştir. Transwell membran üzerine ekili epitel hücreler ve membran altına ekilen fibroblast hücrelerinin varlığı SEM mikroskobu ile doğrulanmış olup etkili bir şekilde membran yüzeyine tutunduğu tespit edilmiştir.
- Elektroegirme tekniği kullanılarak üretilen PLLA ve PCL nanofiber membranların hazırlanmasında %4 PLLA-Kloroform çözeltisi kullanılarak elde edilen fiberlerin ışık mikroskobunda incelenmesi sonucu fiberlerde çok sayıda boncuk (bead) yapılarının oluştuğu gözlenmiştir. Bu görüntüler incelendiğinde fiberlerin oluşumunda istenmeyen boncuk yapılarının giderilmesi gerektiği;

bunun için de farklı çözücü/çözücü grupları kullanılarak fiber optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

- %4 (a/a) PLLA-Kloroform ve PLLA-(DCM/DMF) çözeltileri ile elde edilen fiberler incelendiğinde kloroform çözeltisi kullanılarak hazırlanan parametrelerden DCM/DMF çözeltisi kullanılarak hazırlanan parametrelere geçildiğinde boncuk içerikli fiber oluşumunun kısmen önüne geçildiği görülmüştür. Bu durum iletkenliği artırmak adına dimetilformamid çözücüsünün diklorometan çözücüsü ile kullanımıyla sağlanmış olabileceği yorumu yapılmıştır.
- PLLA membranların karakterizasyonunda gözlemlenen fiber içerikli boncuk yapılarının giderilmesi ve fiber çaplarının 200 nm'den daha küçük sentezlenip homojen dağılım sergileyebilmesi için elektroegirme sırasında kullanılan iğne uç çaplarında değişikliğe gidilmiştir. 0,51 mm (21 G) iğne iç çapa sahip şırınga, 0,26 mm (26 G) iç çapa sahip şırıngayla değiştirilerek deneyler tekrarlanmıştır. Bu amaçla üç farklı koşulda membranlar hazırlanmıştır.
- Yapılan SEM değerlendirmesinde; 10 cm toplama mesafesinde 26 G iğne uç çapına sahip şırınga kullanılarak ve 1 mL/sa'lik akış hızı ile üretilen %4'lük PLLA membranlarının ortalama fiber çapı 192 ± 49 nm olarak hesaplanmıştır.
- Poli (ε-kaprolakton) (PCL) membranların üretilmesi ve SEM analizi ile morfolojilerinin belirlenmesi çalışmalarına geçilmiştir. PCL membranların optimizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar neticesinde iki koşul belirlenmiştir. Koşul 1: %17,5 PCL; 17 kV'lık potansiyel fark, 7,5 cm toplama mesafesi, 0,07 mL/sa'lik akış hızı (21 G'lik iğne uç çapı). Koşul 2: %17,5 PCL; 17 kV'lık potansiyel fark, 7,5 cm toplama mesafesi, 1,5 mL/sa'lik akış hızı uygulanmıştır (26 G'lik iğne uç çapı).
- Yapılan SEM değerlendirmesinde Koşul-1'e ait fiber organizasyonunun yönlü/hızlı (aligned); Koşul-2'ye ait fiber organizasyonunun ise yönsüz/rastgele (random) dağılım gösterdiği anlaşılmıştır. Akciğer bazal membrana ait ekstraselüler matriks fiberlerinin rastgele dağılım gösterdiği dikkate alınarak daha sonraki çalışmalarda Koşul-2'den devam edilmiştir.

- Koşul-2'ye ait PCL fiber çaplarının 50 nm ile 275 nm arasında dağılım gösterdiği kaydedilmiştir. PCL membranlarına ait ortalama fiber çapı $153,33 \pm 27$ nm olarak hesaplanmıştır. Bu değerlendirmeler neticesinde PCL membranlarının hedeflenen fiber çap boyutu ve dağılımına uygun olduğu; ayrıca bu membran üzerinde istenmeyen boncuk (bead) yapılarının hemen hemen oluşmadığı görülmüştür.
- SEM analizi ile PLLA ve PCL membranların fiber çapları hesaplanmış ve istenen özellikte boncuksuz ve yönsüz (random) fiberler oluşturularak hücre kültür çalışmalarına hazır hale getirilmiştir. 50 nm ile 275 nm arasında dağılım gösteren PLLA ve PCL fiber çaplarının akciğer matrikslerinde yer alan kollajen ve elastin fiberlerinin çapları dikkate alındığında benzer ebatlarda olduğu anlaşılmıştır.
- Optimize edilmiş PLLA ve PCL membranlar toplayıcı yüzeyinden kaldırıldıktan sonra dijital kumpas yardımıyla kalınlık ölçümü yapılmıştır. 2 saat boyunca elektroğirme işlemine tabi tutulan PLLA membranlarda kalınlık 77 ± 12 μ m; 4 saat boyunca elektroğirme işlemine tabi tutulan PLLA membranlarda kalınlık 131 ± 10 μ m; 6 saat boyunca elektroğirme işlemine tabi tutulan PLLA membranlarda kalınlık 242 ± 14 μ m olarak ölçülürken;
- 2 saat boyunca elektroğirme işlemine tabi tutulan PCL membranlarda kalınlık 144 ± 16 μ m; 4 saat boyunca elektroğirme işlemine tabi tutulan PCL membranlarda kalınlık 398 ± 11 μ m; 6 saat boyunca elektroğirme işlemine tabi tutulan PCL membranlarda kalınlık 405 ± 9 μ m olarak ölçülmüştür.
- PLLA ve PCL membranlara ait kimyasal yapı analizi ve üretim metodundan kaynaklı herhangi bir safsızlık olup olmadığının belirlenmesi amacıyla ATR-FTIR Analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pikler ayrıntılı incelenerek daha önceki literatür bulguları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre hem PLLA hem de PCL fiber moleküllerinin yapısındaki bağlar tanımlanmış ve literatürde gösterilen karakteristik pikler ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.
- 2 saat spinlenen PLLA ve PCL membranlarına ait ortalama gözenek çapı ve dağılımları baz alınarak yapılan değerlendirmede; PLLA membranlarına ait maksimum gözenek boyutu $0,5310$ μ m ile minimum gözenek boyutu $0,3546$ μ m

boyut aralığında kaydedilmiş olup ortalama gözenek çapı 0,3988 μm olarak ölçülmüştür. PCL membranlarına ait maksimum gözenek boyutu ise 0,5359 μm ile minimum gözenek boyutu 0,3580 μm boyut aralığında kaydedilmiş ve ortalama gözenek çapı 0,4000 μm olarak ölçülmüştür.

- Bu sonuçlara göre analizi gerçekleştirilen hem PLLA hem de PCL membranlarının ortalama gözenek çaplarının 0,4 μm olduğu ve ticari olarak kullanılan biyobozunur olmayan Corning transwell membranlarıyla benzer gözenek çaplarına sahip oldukları tespit edilmiştir.
- PLLA ve PCL elektroëirilmiş membranların mekanik özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla 50 N'luk yük altında malzemelerin maksimum taşıyabileceği yük ve Çekme Testi deneyleri gerçekleştirilmiştir.
- Gerilim-gerinim grafiğı üzerinden PLLA membranlarının ortalama elastik modülleri her bir örnek için aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. 2 saatlik örnek için Elastik Modülü= 6,82 $\pm$ 0,57 MPa; 4 saatlik örnek için Elastik Modülü= 10,57 $\pm$ 1,95 MPa; 6 saatlik örnek için Elastik Modülü= 42,95 $\pm$ 1,95 MPa;
- Gerilim-gerinim grafiğı üzerinden PCL membranlarının ortalama elastik modülleri her bir örnek için aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. 2 saatlik örnek için Elastik Modülü= 5,60 $\pm$ 1,54 MPa; 4 saatlik örnek için Elastik Modülü= 1,17 $\pm$ 0,70 MPa; 6 saatlik örnek için Elastik Modülü= 4,32 $\pm$ 0,11 MPa;
- Malzemenin kırılmadan dayanabileceği maksimum yük 'Çekme Mukavemeti' olarak adlandırılır. Gerçekleştirilen Çekme Testi neticesinde oluşturulan PLLA ve PCL membranlarına ait çekme mukavemetlerinin ortalaması sırasıyla 1,18 $\pm$ 0,57 MPa ve 1,46 $\pm$ 0,58 MPa olarak belirlenmiştir.
- PLLA membranlarının *in vitro* bozunma testleri 1 mL Proteinaz-K (2 mg/ml) enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzimatik bozunma deneylerine ilaveten hücre kültür koşullarını birebir yansıtacak şekilde PLLA ve PCL membranları besiyeri ortamında bekletilerek ve aynı zamanda PBS'e göre daha fizyolojik koşulları yansıtan bir çözelti olan Ringer çözeltisi içerisinde tutularak ek bozunma testleri gerçekleştirilmiştir.

- PLLA membranlarında gerçekleştirilen enzimatik bozunma deneylerinde 28. günün sonunda membranların %90'ın üzerinde enzimatik bozunmaya uğradığı gözlemlenmiştir.
- 28 günlük degradasyon çalışmalarına ek olarak membranlar ayrıca besiyeri ve Ringer çözeltisi içerisinde 6 aya kadar devam ettirilmiştir. Deney sonuçlarına göre ne PLLA ne de PCL membranlarda anlamlı bir bozulmanın henüz başlamadığı anlaşılmıştır. PLLA membranlar besiyeri ortamında %0,5; PCL membranlar %1,02 bozunma gösterirken; Ringer çözeltisi ortamında PLLA membranlar %0,8; PCL membranlar ise %1,5 bozunmaya uğramışlardır.
- PLLA ve PCL membranların 6 aya kadar anlamlı bir bozunma davranışı sergilemeyip stabil kalmaları havayolu *in-vitro* modellemesi deneyleri açısından bir avantaj teşkil etmektedir. Membranların bu anlamda *in-vitro* bozunma direnci sergilemeleri trake, bronş gibi yapıların onarılmasını uzun süre destekleyebilir olması bakımından önem taşımaktadır ve doku mühendisliği çalışmalarında iyi birer araç olarak değerlendirilebilir olduklarını düşündürmektedir.
- PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen sitotoksikite analizi verilerine göre; en yüksek derişime sahip %100 PLLA ve %100 PCL membranlarında canlılık değeri %91 olarak kaydedilmiş ve derişim oranları azalırken de yine kontrole yakın canlılık göstermişlerdir. Buna göre ISO 10993-5 standardı referans alınarak yapılan değerlendirmeye göre hem PLLA hem de PCL membranlarının sitotoksik olmadığı anlaşılmıştır.
- PLLA ve PCL membranlar üzerinde yetiştirilen hücrelerin farklılaşma öncesi 4 günlük proliferasyonları değerlendirilmiş ve birinci günden son güne %51 oranında bir proliferasyon artışı kaydedilmiştir.
- PLLA ve PCL membranlarda gerçekleştirilen mono-kültür ve ko-kültür çalışmaları boyunca membranlar üzerinde 0, 7, 14 ve 21. günlerde TEER ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

- PLLA mono-kültürde gerçekleştirilen deneyde TEER değerleri sıfırcı günden itibaren 21.güne kadar artış göstermiştir. PLLA ko-kültürlerin olduğu grup ise zaman içerisinde azalma eğilimi göstermiştir. TEER değerleri sonucuna göre sadece PLLA membranların mono-kültür gruplarında düzenli şekilde TEER değerlerinin artışı gözlenmiştir. Bu da bize PLLA membranlarının düzgün şekilde hücrel bariyer oluşturduğunu ve 21 gün boyunca sürdürülebilir olduğunu göstermiştir.
- PLLA ve PCL membranlarına ekilerek ALI kültür yöntemi ile çoğaltılan hücrelerin membran yüzeyine etkin bir şekilde tutunup çoğaldığını göstermek için Hematoksilen & Eozin boyama yapılmış ve hücrelerin canlılıklarını koruyarak etkin bir şekilde membranlar üzerinde çoğaldığı ve epitel tabakalaşmanın olduğu tespit edilmiştir.
- PLLA ve PCL membranların immünohistokimyasal analiz ile görüntülenmesi çalışmalarında hücrelerde β -Tubulin proteininin varlığı gösterilmiştir.
- PLLA ve PCL nanofiber membranlarının hücrel uyumluluğunu ayrı ayrı değerlendirmek amacıyla, nanofiberli membranlar üzerinde hücre yapışması ve yayılma durumları SEM kullanılarak gözlemlenmiştir. PLLA ve PCL membranlar üzerinde ko-kültüre edilmiş hücrelerin sadece üst yüzeyden çekilmiş görüntüleri incelendiğinde, her iki membran yüzeyinde de sferoid tipi morfolojilerin varlığı, hücrelerin membranlara tutunmuş olduğunun bir kabulü olarak görülmektedir. Hücreler nanofiber topografyası boyunca membranlara tutunmuş ve iyi bir şekilde membranlarla hücre kümeleri oluşturmuştur.
- ALI kültür’de farklılaştırmaya alınarak büyütülen epitel hücreleri, PLLA ve PCL membranlarda da hastalık modelini taklit edebilmesi amacıyla, epitel hücre sıkı bağlantılarını yaktığı literatürde gösterilmiş alerjen ve sitokinler varlığında uyarılmıştır.
- ALI kültür’de farklılaştırılan hücrelere 14.günde apikalden HDM alerjeni, bazalden ise IL-4 ve IL-13 sitokinleri verilerek farklılaşma ve uyarım öncesi-

sonrası TEER değerleri karşılaştırılmıştır. Uyarım yapıldığı gün olan 14. günden sonra ALI kültürde hücreler 1 hafta daha devam ettirilerek sıkı bağlantı yapılarında bir farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. Bu süreç içerisinde 14.günden 24 saat sonra düşüş yaşanmış; ancak sonraki günlerde yeniden TEER değerlerinde artış kaydedilmiştir. Bu da bize hücre etkinliğinin uyarım sonrası da devam ettiğinin ve havayolu yeniden modellemesinde (remodelling) hastalık modelinin *in-vivo* ortamdaki gibi taklit edilebilir olması bakımından kullanılabilir malzemeler olduğunun nn açmıştır.

- PLLA ve PCL membranlar hava yolu epitelinin hücresel ve yapısal temsiline uygun olup akciğer biyolojisi, hastalık modellemesi ve ilaç keşfi alanlarında akademik ve farmasötik araştırmalar için de önemli bir araç sunmakta ve bu alanda bazı hayvan deneylerine olan ihtiyaı azaltma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. McConnell, Anatomy and physiology of the respiratory system, Respiratory Muscle Training 2013, pp. 3-36.
- [2] A.K.S.a.S.K. Singh, Overview on Anatomy of human respiratory system., (2014).
- [3] J.E.H.-G.v.H. Arthur C. Guyton, Tibbi Fizyoloji, (2001).
- [4] M. Chuzo Nagaishi, Functional Anatomy and Histology of the lung, (1974) 295.
- [5] P. Bajaj, J.F. Harris, J.H. Huang, P. Nath, R. Iyer, Advances and Challenges in Recapitulating Human Pulmonary Systems: At the Cusp of Biology and Materials, ACS Biomater Sci Eng 2(4) (2016) 473-488.
- [6] D.E. Wagner, R.W. Bonvillain, T. Jensen, E.D. Girard, B.A. Bunnell, C.M. Finck, A.M. Hoffman, D.J. Weiss, Can stem cells be used to generate new lungs? Ex vivo lung bioengineering with decellularized whole lung scaffolds, Respirology 18(6) (2013) 895-911.
- [7] B.L. Hogan, C.E. Barkauskas, H.A. Chapman, J.A. Epstein, R. Jain, C.C. Hsia, L. Niklason, E. Calle, A. Le, S.H. Randell, J. Rock, M. Snitow, M. Krummel, B.R. Stripp, T. Vu, E.S. White, J.A. Whitsett, E.E. Morrisey, Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function, Cell Stem Cell 15(2) (2014) 123-38.
- [8] E. Shebani, S. Shahana, C. Janson, G.M. Roomans, B.H.R. group, Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma, Tissue Cell 37(2) (2005) 145-52.
- [9] J.C. BONNER, Molecular and Biochemical Toxicology - Respiratory Toxicity, (2007).
- [10] W.F.B.E.L. Boulpaep, Medical physiology : a cellular and molecular approach, (2012).
- [11] M. Ochs, J.R. Nyengaard, A. Jung, L. Knudsen, M. Voigt, T. Wahlers, J. Richter, H.J. Gundersen, The number of alveoli in the human lung, Am J Respir Crit Care Med 169(1) (2004) 120-4.
- [12] D.E.R. S.E. Dunsmore, Extracellular matrix biology in the lung, (1996).
- [13] E.S. White, Lung extracellular matrix and fibroblast function, Ann Am Thorac Soc 12 Suppl 1 (2015) S30-3.
- [14] M. Derya, The Role of Extracellular Matrix in Lung Diseases, Biology and Medicine 06(02) (2014).
- [15] W.P. M.H. Ross, Histology: A Text and Atlas, With Correlated Cell and Molecular Biology, Lippincott Williams & Wilkins (Sixth Edition) (2016) 662-697.
- [16] J.S.B. H.A. Vaccaro, Structural Features of Alveolar Wall Basement Membrane, (1981).
- [17] T.W. Huang, Composite Epithelial and Endothelial Basal Laminae, (1978).
- [18] M.I. Townsley, Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins, Compr Physiol 2(1) (2012) 675-709.
- [19] K.B. A.J. Hance, R.G. Crystal, Lung collagen heterogeneity. Synthesis of type I and type III collagen by rabbit and human lung cells in culture, (1976).
- [20] T.D.F. C.W. Castor, A.M. Furlong, G.W. Jourdain, Hyaluronic acid and proteoglycan synthesis by lung fibroblasts in basal and activated states, (1983).
- [21] J.R. R. Campagnone, C.B. Rich, M. Miller, D.R. Keene, L. Sakai, J.A. Foster, Pulmonary fibroblasts: a model system for studying elastin synthesis, (1987).

- [22] R.C.K. J.A. Elias, B. Freundlich, P.M. Sampson, Regulation of human lung fibroblast glycosaminoglycan production by recombinant interferons, tumor necrosis factor, and lymphotoxin, (1988).
- [23] M.G. B. Baum, Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling, *J Cell Biol.* (2011).
- [24] N.F.A. et.al., Middleton's ALLERGY Principles and Practice, (eighth edition) (2014).
- [25] H.L.W. H. Wan, C. Soeller, D. C. Gruenert, P.J. Thompson, M.B. Cannell, G.A. Stewart, D.R. Garrod, C. Robinson, Quantitative structural and biochemical analyses of tight junction dynamics, *Clinical and Experimental Allergy* (1999) 685-698.
- [26] M.J.O.H. S.K. Runswick, L. Jones, C.H. Streuli, D.R. Garrod, Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning, *Nat Cell Biol.* (2001) 823-30.
- [27] S.S. A-J. Relova, N. Makeeva, G.M. Roomans, Effect of cytokines on ICAM-1 and ZO-1 expression on human airway epithelial cells, *Cell Biol Int.* (2005) 768-77.
- [28] Q.A. Justiz Vaillant AA, Interleukin, (2021).
- [29] A.N. C.T. Capaldo, Cytokine regulation of tight junctions, *Biochim Biophys Acta* (2009) 864-871.
- [30] M.W.-K. N. Gour, IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease, *Cytokine* (2015) 68-78.
- [31] D.R.R. C.R. Weber, L. Su, L. Shen, E.A. Sullivan, Y. Wang, J.R. Turner, Epithelial Myosin Light Chain Kinase Activation Induces Mucosal Interleukin-13 Expression to Alter Tight Junction Ion Selectivity, (2010) 12037-12046.
- [32] W.S. S. Fichtner-Feigl, K. Kawakami, R.K. Puri, A. Kitani, IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis, *Nat Med.* (2006) 99-106.
- [33] M.Z. J.H. Zhang, Y.N. Wang, X.Y. Zhang Correlation between IL-4 and IL-13 gene polymorphisms and asthma in Uygur children in Xinjiang, *Exp Ther Med* (2019) 1374-1382.
- [34] G.L.G. A.J Coyle, C. Bertrand, S.Tsuyuki, C.H. Heusser, M.Kopf, G.P. Anderson, Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity, (1995) 54-59.
- [35] D.A.L. R.I. Tepper, B.Z. Stanger, J. Campos-Torres, A.K. Abbas, P.Leder, IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cell development in transgenic mice, *Cell* (1990) 457-467.
- [36] T.V. Minoo Ahdieh, and Adel Youakim, Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN- γ , *American Journal of Physiology-Cell Physiology* (2001) 2029-2038.
- [37] M.B.R. S.P. Colgan, C.A. Parkos, C. Delp-Archer, D. McGuirk, A.E. Bacarra, P.F. Weller, J.L. Madara, IL-4 directly modulates function of a model human intestinal epithelium, *J Immunol* (1994) 2122-2129.
- [38] D. Sheppard, Functions of pulmonary epithelial integrins: from development to disease, *Physiol Rev* (2003) 673-6-86.
- [39] Q.L. H. Yu, V.P. Kolosov, J.M. Perelman, X. Zhou Interleukin-13 induces mucin 5AC production involving STAT6/SPDEF in human airway epithelial cells., *Cell Commun Adhes* (2010) 83-92.
- [40] G.C. Y. Maeda, Y. Xu., Airway epithelial transcription factor NK2 homeobox 1 inhibits mucous cell metaplasia and Th2 inflammation, *Am J Respir Crit Care Med* (2011) 421-429.
- [41] S.T. Holgate, The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis, *Immunol Rev* (2011) 205-219.

- [42] , D.A.K. T.R. Bai, Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences, *Clin Sci* (2005) 463-477.
- [43] S.M.P. C. Xiao, S. Field, Defective epithelial barrier function in asthma, *J Allergy Clin Immunol.* (2011) 549-556.
- [44] S.L.J. P.A. Wark, F. Bucchieri, Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus, *J Exp Med* (2005) 937-947.
- [45] Y.X. J.A. Cakebread, C. Grainge Exogenous IFN-beta has antiviral and antiinflammatory properties in primary bronchial epithelial cells from asthmatic subjects exposed to rhinovirus., *J Allergy Clin Immunol* (2011) 1148-1154.
- [46] W.R.J.H. T.S. Hallstrand, An update on the role of leukotrienes in asthma, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2010) 60-66.
- [47] T.V. M. Ahdieh, A. Youakim, Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma, *Am J Physiol Cell Physiol* (2001) 2029-2038.
- [48] R.M. S. Prasad, K. Kaukinen, K.L. Hayes, R.M. Powell, T.T. MacDonald, Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells, *Lab Invest* (2005) 1139-1162.
- [49] B.O. G. Burgstaller, M. Gerckens, E. S. White, H.B. Schiller, O. Eickelberg, The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease, (2017).
- [50] T.M. J.K. Burgess, G. Tjin, J.C. Karlsson, G. Westergren-Thorsson, The extracellular matrix – the under-recognized element in lung disease ?, *J Pathol.* (2016).
- [51] J.K.B. V. Chan, J.C. Ratoff, B.J. O'connor, A. Greenough Extracellular matrix regulates enhanced eotaxin expression in asthmatic airway smooth muscle cells, *Am J Respir Crit Care Med* (2006) 379-385.
- [52] A.J.W. P.K. Jeffery, F.C. Nelson, Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity, *Am Rev Respir Dis* (1989) 1745–1753.
- [53] R.B. W.R. Roche, J.H. Williams , 520–524, Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics, *Lancet* (1989) 520-524.
- [54] M.D. B.B. Araujo, L.F. Silva,, Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma., *Eur Respir J* (2008) 61-69.
- [55] W.T. D.S. Postma, Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Proc Am Thorac Soc* (2006) 434-439.
- [56] M.T. M. Hoshino, N. Aoike Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis., *J Allergy Clin Immunol* (2001) 295-301.
- [57] J.K.B. P.R. Johnson, P.A. Underwood Extracellular matrix proteins modulate asthmatic airway smooth muscle cell proliferation via an autocrine mechanism, *J Allergy Clin Immunol* (2004) 690-696.
- [58] R. Annoni, T. Lancas, R. Yukimatsu Tanigawa, M. de Medeiros Matsushita, S. de Moraes Fernezlían, A. Bruno, L. Fernando Ferraz da Silva, P.J. Roughley, S. Battaglia, M. Dolhnikoff, P.S. Hiemstra, P.J. Sterk, K.F. Rabe, T. Mauad, Extracellular matrix composition in COPD, *Eur Respir J* 40(6) (2012) 1362-73.
- [59] S.L. A. Papaportfyriou, K. Kostikas, Increased levels of osteopontin in sputum supernatant in patients with COPD., *Chest* (2014) 951-958.
- [60] A.J.K. J.M. Sand, P. Lange Accelerated extracellular matrix turnover during exacerbations of COPD., *Respir Res* (2015) 69.

- [61] B.M. K.R. Stenmark, N. Galie, Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2009) 1013-1032.
- [62] C.A.T. G.J. Poiani, S.E. Yohn, 968–978., Collagen and elastin metabolism in hypertensive pulmonary arteries of rats, *Circ Res* (1990) 968-978.
- [63] I.E.F. H.B. Schiller, G. Burgstaller, Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair., (2015) 819.
- [64] K.F. Papakonstantinou E, Karakiulakis G. , Increased hyaluronic acid content in idiopathic pulmonary arterial hypertension. , *Eur Respir J* (2008) 1504–1512.
- [65] E.D. Kalay N, Canatan H., Elevated plasma hyaluronan levels in pulmonary hypertension, *J Exp Med* (2013) 7-11.
- [66] A.M. Lauer ME, Comhair SA., Modification of hyaluronan by heavy chains of inter-alpha-inhibitor in idiopathic pulmonary arterial hypertension, *J Biol Chem* (2014) 6791-6798.
- [67] R.R. Sethi T, Moore SM, Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo., *Nat Med.* (1999) 662-668.
- [68] T.M. Chen Y, Yang Y., Lysyl hydroxylase 2 induces a collagen cross-link switch in tumor stroma, *J Clin Invest* (2015) 1147-1162.
- [69] C.K. Naba A, Hoersch S., The matrisome: in silico definition and in vivo characterization by proteomics of normal and tumor extracellular matrices., *Mol Cell Proteomics* (2012).
- [70] H.C. Thannickal VJ, Horowitz JC, Matrix biology of idiopathic pulmonary fibrosis a workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute, *Am J Pathol* (2014) 1643-1651.
- [71] H.R. Booth AJ, Cornett AM, Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation, *Am J Respir Crit Care Med* (2012) 866-876.
- [72] H. B., 137–147, Mechanical aspects of lung fibrosis: a spotlight on the myofibroblast, *Proc Am Thorac Soc* (2012) 137-147.
- [73] W. ES., Lung extracellular matrix and fibroblast function, *Ann Am Thorac Soc* (2015) 30-33.
- [74] W.W. Saums MK, Han B., Mechanically and chemically tunable cell culture system for studying the myofibroblast phenotype., *Langmuir* (2014) 5481-5487.
- [75] P.G. Silver FH, Cell growth on collagen: a review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix., *J Long Term Eff Med Implants* (1992) 67-80.
- [76] E.S. Hafemann B, Erdmann C, Use of a collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis, *Burns* (1999) 373-384.
- [77] G.M. Hayen W, Kumar S, Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture. , *J Cell Sci* (1999) 2241-2251.
- [78] A.L. Rodin S, Niaudet C, Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/ E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment, *Nat Commun* (2014) 3195.
- [79] L.M. Raeber GP, Hubbell JA. , Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration., *Biophys J* (2005) 1374-1388.
- [80] M.S. Goetz JG, Navarro-Lérida I, Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis, *Cell* (2011) 148-163.
- [81] H.R. Booth AJ, Cornett AM, Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. , *Am J Respir Crit Care Med* (2012) 866-876.

- [82] V.S. Uhl FE, Wagner DE, Preclinical validation and imaging of Wnt-induced repair in human 3D lung tissue cultures., *Eur Respir J* (2015) 1150-1166.
- [83] V.S. Burgstaller G, Lindner M, Multidimensional immunolabeling and 4D time-lapse imaging of vital ex vivo lung tissue. , *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2015) 323-332.
- [84] B.S. Donovan C, Tran J, Rosiglitazone elicits in vitro relaxation in airways and precision cut lung slices from a mouse model of chronic allergic airways disease., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2015) 1219-1128.
- [85] S.B. Goldstein TA, Zeltsman D, Introducing a 3-dimensionally printed, tissue-engineered graft for airway reconstruction: a pilot study. , *Otolaryngol Head Neck Surg* (2015) 1001-1006.
- [86] K. Zscheppang, J. Berg, S. Hedtrich, L. Verheyen, D.E. Wagner, N. Suttorp, S. Hippenstiel, A.C. Hocke, Human pulmonary 3D models for translational research, *Biotechnology journal* 13(1) (2018) 1700341.
- [87] A. Harb, M. Fakhreddine, H. Zaraket, F.A. Saleh, Three-Dimensional Cell Culture Models to Study Respiratory Virus Infections Including COVID-19, *Biomimetics* 7(1) (2021) 3.
- [88] J.B. Katja Zscheppang, Sarah Hedtrich, Leonie Verheyen, Darcy E. Wagner, Norbert Suttorp, Stefan Hippenstiel, and Andreas C. Hocke, Human Pulmonary 3D Models For Translational Research, *Biotechnol. J.* (2018) 1700341.
- [89] A.H. Bahmanpour, T. Navaei, F. Ahadi, Pulmonary system responses to biomaterials, *Handbook of Biomaterials Biocompatibility*, Elsevier2020, pp. 653-665.
- [90] H. Moghadas, M.S. Saidi, N. Kashaninejad, A. Kiyomarsioskouei, N.-T. Nguyen, Fabrication and characterization of low-cost, bead-free, durable and hydrophobic electrospun membrane for 3D cell culture, *Biomedical Microdevices* 19(4) (2017) 1-9.
- [91] A.J. Miller, J.R. Spence, In vitro models to study human lung development, disease and homeostasis, *Physiology* 32(3) (2017) 246-260.
- [92] B. K., *Altern Lab Anim* (2009) 89-141.
- [93] S. Upadhyay, L. Palmberg, Air-liquid interface: relevant in vitro models for investigating air pollutant-induced pulmonary toxicity, *Toxicological Sciences* 164(1) (2018) 21-30.
- [94] C.E. Barkauskas, M.-I. Chung, B. Fioret, X. Gao, H. Katsura, B.L. Hogan, Lung organoids: current uses and future promise, *Development* 144(6) (2017) 986-997.
- [95] R.K. Vadivelu, H. Kamble, M.J. Shiddiky, N.-T. Nguyen, Microfluidic technology for the generation of cell spheroids and their applications, *Micromachines* 8(4) (2017) 94.
- [96] A. Doryab, G. Amoabediny, A. Salehi-Najafabadi, Advances in pulmonary therapy and drug development: Lung tissue engineering to lung-on-a-chip, *Biotechnology advances* 34(5) (2016) 588-596.
- [97] W.J.H.-S. K. B. Adler, J. E. Repine, *J. Clin. Invest.* (1990) 75.
- [98] M. Sakagami, *Adv. Drug Deliv. Rev* (2006) 1030.
- [99] Z.P. K. BeruBe, C. Job, T. Hughes, *Toxicology* (2010) 311.
- [100] A.A.T. M. M. Choe, M. A. Swartz, *Nat. Protocols* (2006) 357.
- [101] J.H. S. G. Klein, T. Serchi, B. Blömeke, A. C. Gutleb, *Toxicol. In Vitro* (2011) 1516.
- [102] K.J. J. E. Ekert, B. Strake, J. Pardinas, S. Jarantow, R. Parkinson, D. C. Colter, *PLoS ONE* (2014).
- [103] F.P. M. Zanoni, C. Arienti, A. Zamagni, S. Santi, R. Polico, A. Bevilacqua, A. Tesei, *Sci. Rep* (2016) 19103.
- [104] M.Z. A. Amann, G. Gamerith, M. Bitsche, J. M. Huber, G. F. Vogel, M. Blumer, S. Koeck, E. J. Pechriggl, J. M. Kelm, W. Hilbe, H. Zwierzina., *PLoS ONE* (2014) 92511.

- [105] A.R. D. Fatykhova, C. Machnik, K. Guruprasad, F. Pache, J. Berg, M. Toennies, T. T. Bauer, P. Schneider, M. Schimek, S. Eggeling, T. J. Mitchell, A. M. Mitchell, R. Hilker, T. Hain, N. Suttorp, S. Hippenstiel, A. C. Hocke, B. Opitz., PLoS ONE (2015) 137108.
- [106] A.B. A. C. Hocke, J. Knepper, A. Peter, G. Holland, M. Tonnies, T. T. Bauer, P. Schneider, J. Neudecker, D. Muth, C. M. Wendtner, J. C. Ruckert, C. Drosten, A. D. Gruber, M. Laue, N. Suttorp, S. Hippenstiel, T. Wolff., Am. J. Respir. Crit. Care Med (2013) 882.
- [107] A.B. V. K. Weinheimer, M. Tonnies, G. Holland, J. Knepper, T. T. Bauer, P. Schneider, J. Neudecker, J. C. Ruckert, K. Szymanski, B. Temmesfeld-Wollbrueck, A. D. Gruber, N. Bannert, N. Suttorp, S. Hippenstiel, T. Wolff, A. C. Hocke., J. Infect. Dis (2012) 1685.
- [108] J.M.B. J. P. Morin, A. Gay, C. Crochemore, C. Corbiere, C. Monteil., Xenobiotica (2013) 63.
- [109] N.K. Y. Bai, K. R. Patel, I. Rosas, M. J. Sanderson, X. Ai, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2016) 656.
- [110] M.S. C. Morin, V. Echave, M. M. Gomes, E. Rousseau., Am. J. Physiol. (2007) 1037.
- [111] M.S. C. Morin, V. Echave, M. M. Gomes, E. Rousseau., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2008) 192.
- [112] M.S. C. Morin, V. Echave, E. Rousseau, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2008) 638.
- [113] M.S. Y. Tabet, C. Sirois, E. Rizcallah, E. Rousseau, Am. J. Physiol. (2013) 562.
- [114] E.N. M. Le Guen, S. Grassin-Delyle, P. Devillier, C. Faisy., PLoS ONE (2015) 127765.
- [115] F.M.P. C. Faisy, M. Le Guen, E. Naline, S. Grassin Delyle, E. Sage, M. L. Candenas, P. Devillier, Crit. Care (2011) 208.
- [116] P.D.S. M. R. Sadaria, D. A. Fullerton, G. A. Justison, J. H. Lee, F. Puskas, F. L. Grover, J. C. Cleveland, Jr., T. B. Reece, M. J. Weyant., Ann. Thorac. Surg (2011) 478.
- [117] A.W.M. L. M. Fernandes, I. L. Medeiros, M. N. Samano, L. G. Abdalla, A. T. Correia, N. A. Nepomuceno, M. Canzian, P. M. Pego-Fernandes, Acta Cir. Bras (2015) 359.
- [118] R.B. J. A. Frank, J. W. Lee, A. Ishizaka, T. Uchida, M. A. Matthay., Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol (2007) 52.
- [119] B.K. M. Gnadt, M. Schmidt, P. Hogger, Lung (2012) 431.
- [120] X.F. J. W. Lee, N. Gupta, V. Serikov, M. A. Matthay, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2009) 16357.
- [121] A.K. J. W. Lee, D. H. McKenna, Y. Song, J. Abbott, M. A. Matthay, Am. J. Respir. Crit. Care Med (2013) 751.
- [122] G.F.C. D. F. McAuley, U. I. Hamid, J. G. Laffey, J. Abbott, D. H. McKenna, X. Fang, M. A. Matthay, J. W. Lee., Lung Cell. Mol. Physiol. (2014) 809.
- [123] P.M.P.-F. I. L. Medeiros, A. W. Mariani, F. G. Fernandes, F. V. Unterpertinger, M. Canzian, F. B. Jatene, Clinics (2012) 1101.
- [124] R.A. J. D. O'Neill, A. Anandappa, J. Costa, J. Javidfar, H. M. Wobma, G. Singh, D. O. Freytes, M. D. Bacchetta, J. R. Sonett, G. Vunjak-Novakovic, Ann. Thorac. Surg (2013) 1046.
- [125] R.H. A. J. Booth, A. M. Cornett, A. A. Dreffs, S. A. Matthes, J. L. Tsui, K. Weiss, J. C. Horowitz, V. F. Fiore, T. H. Barker, B. B. Moore, F. J. Martinez, L. E. Niklason, E. S. White., Am. J. Respir. Crit. Care Med. (2012) 866.

- [126] N.R.B. D. E. Wagner, C. S. Parsons, D. Sokocevic, E. M. Brooks, Z. D. Borg, M. J. Lathrop, J. D. Wallis, A. B. Daly, Y. W. Lam, B. Deng, M. J. DeSarno, T. Ashikaga, R. Loi, D. J. Weiss, *Biomaterials* (2014) 3281.
- [127] N.R.B. D. E. Wagner, D. Sokocevic, M. J. DeSarno, Z. D. Borg, C. S. Parsons, E. M. Brooks, J. J. Platz, Z. I. Khalpey, D. M. Hoganson, B. Deng, Y. W. Lam, R. A. Oldinski, T. Ashikaga, D. J. Weiss, *Biomaterials* (2014) 2664.
- [128] Y.Z. H. Sun, H. Pan, X. Chen, J. L. Balestrini, T. T. Lam, J. E. Kanyo, A. Eichmann, M. Gulati, W. H. Fares, H. Bai, C. A. Feghali-Bostwick, Y. Peng Gan, X. Moore, M. W. White, E. S. Sava, P. Gonzalez, A. L. Cheng, Y. Niklason, *Arthritis Rheumatol* (2016) 1251.
- [129] J.P.G. S. E. Gilpin, G. Gonzalez, X. Ren, J. M. Asara, D. J. Mathisen, J. P. Vacanti, H. C. Ott, J. , *Heart Lung Transplant*. (2014) 298.
- [130] C.P. M. Rahmati, A. Mobasheri, M. Mozafari, *Bioengineered scaffolds for stem cell applications in tissue engineering and regenerative medicine*, *Adv Exp Med Biol* (2018) 1-17.
- [131] K. Christman, *Biomaterials for tissue repair*, *Science* (2019) 340-341.
- [132] M.M. C. Naeem, F. Sefat, *Scaffolds for lung tissue engineering*, *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds 2* (2020).
- [133] S. Ricard-Blum, *The collagen family*, *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2010).
- [134] M.K. R. Khan, *Use of collagen as a biomaterial: an update*, *J Indian Soc Periodontol* (2013) 539.
- [135] J.M. E. Green, J. Bell, C. Winlove, *The structure and micromechanics of elastic tissue*, *Interface Focus* (2014).
- [136] J.V. W. Daamen, J. Vanhest, T. Vankuppevelt, *Elastin as a biomaterial for tissue engineering*, *Biomaterials* (2007) 4378–4398.
- [137] D.K. C. Vepari, *Silk as a biomaterial*, *Prog Polym Sci* (2007) 991–1007.
- [138] M.H. Wenk E, Meinel L. , *Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications*, *J Control Rel* (2011) 128-141.
- [139] Y.-b.D. Wang Mei-sa, Hui-ming Huang, Zhong-ling Zhu, Shuang-shuang Du, Shao-yong Chen., *Silk fibroin peptide suppresses proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in human lung cancer cells.*, *Acta Pharm. Sinica* (2019) 522-529.
- [140] M.K. Mottaghitlab Fatemeh, Mehdi Farokhi, Subhas C, Kundu Rui L, Mahdi Gholami Reis, Hassan Bardania, *Targeted delivery system based on gemcitabine-loaded silk fibroin nanoparticles for lung cancer therapy*, *ACS Appl. Mat. Inter* (2017) 31600-31611.
- [141] W.Y. B. Wang, J. McKittrick, M. Meyers, 229–318, *Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration*, *Prog Mater Sci* (2016) 229-318.
- [142] S.T. J. McLellan, S. Shelton, M. Kumar, *Keratin-based biofilms, hydrogels, and biofibers*, *Keratin Protein Biopolym* (2018) 187-200.
- [143] W. A, *In vivo biocompatibility, clearance, and biodistribution of albumin vehicles for pulmonary drug delivery*, *J Control Rel* (2015) 1-9.
- [144] V.S. John TA, Minshall RD, Ridge K, Tirupathi C, Malik AB., *Evidence for the role of alveolar epithelial gp60 in active transalveolar albumin transport in the rat lung*, *J Physiol* (2001) 547-559.
- [145] L.C. Zhang H, Hou X, Wang L, Zhang D. . , *Study of the combined treatment of lung cancer using geneloaded immunomagnetic albumin nanospheres in vitro and in vivo*, *Int J Nanomed* (2016) 1039-1050.

- [146] Z.S. Aiyelabegan HT, Fanuel S, Eatemadi A, Ebadi MTK, Sadroddiny E., Albumin-based biomaterial for lungs tissue engineering applications. , *Int J Polym Mater Polym Biomater* (2016).
- [147] C.A. Sarrasague MM, Rubin E, Influence of serum protein and albumin addition on the structure and activity of an exogenous pulmonary surfactant, *Respir Physiol Neurobiol* (2011) 316-321.
- [148] Y.-O. SR., Development of optimized, inhalable, gemcitabine-loaded gelatin nanocarriers for lung cancer., *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* (2017) 299-321.
- [149] Z.M. Foox M, Drug delivery from gelatin-based systems, *Expert Opin Drug Deliv* (2015) 8-10.
- [150] T.T. Mozafari Masoud, Ali Beynaghi., Trends in biotechnology at the turn of the millennium., *Rec. Patents Biotech* (2020) 78-82.
- [151] O.M. Hathout RM, Gelatin-based particulate systems in ocular drug delivery, *Pharm Dev Technol* (2016) 379-386.
- [152] H.R. Abdelrady H, Osman R, Saleem I, Mortada ND. , Exploiting gelatin nanocarriers in the pulmonary delivery of methotrexate for lung cancer therapy, *Eur J Pharm Sci* (2018) 115-126.
- [153] N.M. Mohebbi S, Zarrintaj P, Jafari SH, Gholizadeh SS, Saeb MR, Chitosan in biomedical engineering: a critical review, *Curr Stem Cell Res Ther* (2019) 93-116.
- [154] Vijayakurup, Chitosan encapsulation enhances the bioavailability and tissue retention of curcumin and improves its efficacy in preventing b[a]p-induced lung carcinogenesis, *Cancer Prev Res* (2019).
- [155] M.M. Rahmati M, Biocompatibility of alumina-based biomaterials, *J Cell Physiol* (2019).
- [156] G.M. Mahmoudi S, Sabzichi M, Ramezani F, Hamishehkar H, Samadi N. , Targeted hyaluronic acidbased lipid nanoparticle for apigenin delivery to induce Nrf2-dependent apoptosis in lung cancer cells., *J Drug Deliv Sci Technol* (2019).
- [157] M.K. K. Hamad, M. Ayyoob, J. Joo, F. Deri., Polylactic acid blends: the future of green, light and tough, *Prog Polym Sci* (2018) 83-127.
- [158] V.V. G. Narayanan, E. Kuyinu, C. Laurencin., Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering, *Adv Drug Deliv Rev* (2016) 247-276.
- [159] H.E. E. Göktürk, Poliglolikolik asit' in (PGA) biyomedikal uygulamaları, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* (2017).
- [160] A.D. R. Brannigan, Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates, *Biomater Sci* (2017) 9-21.
- [161] E.A. F. Danhier, J. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, , *J Control Release* (2012) 505-522.
- [162] A.P. S. Sharma, S. Kori, R. Sandhir, PLGA-based nanoparticles: a new paradigm in biomedical applications, *Trac Trends Anal Chem* (2016) 30-40.
- [163] M.G. D. Mondal, S. Venkatraman, , Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: current scenario and challenges, *Int J Polym Mater Polym Biomater Sci* (2016) 255-265.
- [164] J.B. Alves MH, Smith AA, Zelikin AN., Poly(vinyl alcohol) physical hydrogels: new vista on a long serving biomaterial, *Macromol Biosci* (2011).
- [165] W.S. Baker MI, Schwartz Z, Boyan BD. A, A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. , *J Biomed Mater Res, B: Appl Biomater* (2012) 1451-1457.

- [166] P.L. Samavedi S, Van Dyke M, Goldstein AS., Synthetic biomaterials for regenerative medicine applications. Regenerative medicine applications in organ transplantation, Elsevier (2014) 81-99.
- [167] T.N. A. H. Bahmanpour, F. Ahadi, Pulmonary system responses to biomaterials, Handbook of Biomaterials Biocompatibility (2020).
- [168] C.Y. Puskas JE, Biomedical application of commercial polymers and novel polyisobutylene-based thermoplastic elastomers for soft tissue replacement, Biomacromolecules (2004) 1141-1154.
- [169] B.K. Ivanova EP, Crawford RJ., Advanced synthetic polymer biomaterials derived from organic sources, New functional biomaterials for medicine and healthcare (2014) 71-99.
- [170] J.B. Okamoto M, Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds., Prog Polym Sci (2013) 1487-1503.
- [171] L.R. Polyakova A, Schiraldi D, Hiltner A, Baer E. , Oxygen-barrier properties of copolymers based on ethylene terephthalate, J Polym Sci, B Polym Phys (2001) 1889-1899.
- [172] M.A. Elsayy, K.-H. Kim, J.-W. Park, A. Deep, Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites, Renewable and Sustainable Energy Reviews 79 (2017) 1346-1352.
- [173] M.S. Reeve S, Downey MJ, Gross RA., Macromolecules (1994).
- [174] M.S. MacDonald RT, Gross RA, Macromolecules (1996).
- [175] D.V. Cai H, Gross RA, McCarthy SP, J Polym Sci Part B Polym Phys (1996).
- [176] T.M. Li S, Garreau H, Braud C, Vert M, Polym Degrad Stab (2000).
- [177] E. Carletti, A. Motta, C. Migliaresi, Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture, Methods Mol Biol 695 (2011) 17-39.
- [178] M.J. Jenkins, K.L. Harrison, The effect of crystalline morphology on the degradation of polycaprolactone in a solution of phosphate buffer and lipase, Polymers for Advanced Technologies 19(12) (2008) 1901-1906.
- [179] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, P. Wang, The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant, Biomaterials 27(9) (2006) 1735-40.
- [180] S.U. Pham QP, Mikos AG. , Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications, A review. Tissue Eng (2006) 1197-1211.
- [181] E.M.C.-H. Alysha P. Kishan, Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications, Journal of biomedical materials research Part A 105 (2017) 2892-2905.
- [182] FormLabs. <https://formlabs.com/3d-printers/form-2/>. (Accessed 30.04.2022).
- [183] A.R.K. Balaji Srinivasan, Mandy Brigitte Esch, Hasan Erbil Abaci, Michael L. Shuler, James J. Hickman, TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems J Lab Autom. (2016) 107-126.
- [184] S.C. Kathrin Benson, Hans-Joachim Galla, Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond, (2013).
- [185] S. Montesanto, N.P. Smithers, F. Bucchieri, V. Brucato, V. La Carrubba, D.E. Davies, F. Conforti, Establishment of a pulmonary epithelial barrier on biodegradable poly-L-lactic-acid membranes, PLoS One 14(1) (2019) e0210830.
- [186] R.E. Rayner, P. Makena, G.L. Prasad, E. Cormet-Boyaka, Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies, Sci Rep 9(1) (2019) 500.
- [187] D. Papazian, P.A. Wurtzen, S.W. Hansen, Polarized Airway Epithelial Models for Immunological Co-Culture Studies, Int Arch Allergy Immunol 170(1) (2016) 1-21.

- [188] W.U. Eaton EA, Wilson HM, Aberg G, Walle T, Stereoselective sulphate conjugation of salbutamol by human lung and bronchial epithelial cells., *J Clin Pharmacol* (1996) 201-206.
- [189] S.M. Proud D, Ward PE, Glucocorticoids do not alter peptidase expression on a human bronchial epithelial cell line. , *Am J Respir Cell Mol Biol* (1994) 57-65.
- [190] C.E. Stewart, E.E. Torr, N.H. Mohd Jamili, C. Bosquillon, I. Sayers, Evaluation of differentiated human bronchial epithelial cell culture systems for asthma research, *J Allergy (Cairo)* 2012 (2012) 943982.
- [191] T.D. Bleck B, Jaspers I, Curotto de Lafaille MA, Reibman, Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation, *J Immunol* (2006) 7431–7437.
- [192] B.H. Mayer AK, Fey F, Schmidt LM, Dalpke AH, Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment, *Eur J Immunol* (2008) 1689–1699.
- [193] S.B. Lieber M, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G, A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells, *Int J Cancer* (1976) 62-70.
- [194] C.T. Papazian D, Arge M, Vorup-Jensen T, Nielsen CH, Lund K, Wurtzen PA, Hansen S, Polarization affects airway epithelial conditioning of monocyte-derived dendritic cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* (2015) 368–377.
- [195] B.Z. Kim KJ, Crandall ED, A useful in vitro model for transport studies of alveolar epithelial barrier, *Pharm Res* (2001) 253-255.
- [196] W.H. Winton HL, Cannell MB, Gruenert DC, Thompson PJ, Garrod DR, Stewart GA, Robinson C, Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability, *Clin Exp Allergy* (1998) 1273–1285.
- [197] K.A.F.G.O.M.M.L.A.L. Audus, Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism, *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* (1998) 359 –366.
- [198] E.C. Forbes B, Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications, *Eur J Pharm Biopharm* (2005) 193-205.
- [199] Y.C. Caraballo JC, Westphal W, Moninger T, Comellas AP, Ambient particulate matter affects occludin distribution and increases alveolar transepithelial electrical conductance, *Respirology* (2011) 340-349.
- [200] K.S. Rothen-Rutishauser BM, Gehr P A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. , *Am J Respir Cell Mol Biol* (2005) 281–289.
- [201] C. O'Leary, B. Cavanagh, R.E. Unger, C.J. Kirkpatrick, S. O'Dea, F.J. O'Brien, S.A. Cryan, The development of a tissue-engineered tracheobronchial epithelial model using a bilayered collagen-hyaluronate scaffold, *Biomaterials* 85 (2016) 111-27.
- [202] J. Wu, Y. Wang, G. Liu, Y. Jia, J. Yang, J. Shi, J. Dong, J. Wei, X. Liu, Characterization of air-liquid interface culture of A549 alveolar epithelial cells, *Braz J Med Biol Res* 51(2) (2017) e6950.
- [203] M. A.Calderón, House Dust Mite Respiratory Allergy: An Overview of Current Therapeutic Strategies, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 3 (2015) 843-855.
- [204] M.W. Paulina Wawrzyniak, Kerstin Wanke, Mübeccel Akdis, Marek Sanak, Cezmi A. Akdis, Regulation of bronchial epithelial barrier integrity by type 2 cytokines and histone deacetylases in asthmatic patients, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139 (2016).

- [205] B. Saatian, F. Rezaee, S. Desando, J. Emo, T. Chapman, S. Knowlden, S.N. Georas, Interleukin-4 and interleukin-13 cause barrier dysfunction in human airway epithelial cells, *Tissue Barriers* 1(2) (2013) e24333.
- [206] H. Harrington, P. Cato, F. Salazar, M. Wilkinson, A. Knox, J.W. Haycock, F. Rose, J.W. Aylott, A.M. Ghaemmaghami, Immunocompetent 3D model of human upper airway for disease modeling and in vitro drug evaluation, *Mol Pharm* 11(7) (2014) 2082-91.
- [207] S.-H. Tan, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process, *Polymer* 46(16) (2005) 6128-6134.
- [208] S.B. Shamim Zargham, Amir Tavakoli,, The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber, *Journal of engineered fibers and fabrics* (2012).
- [209] A.R. Amir Houshang Hekmati, Reza Ghazisaeidi Jean-Yves Drean, Effect of needle length, electrospinning distance, and solution concentration on morphological properties of polyamide-6 electrospun nanowebs, *Textile Research Journal* (2013) 1452–1466.
- [210] B. Suki, J.H. Bates, Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases, *Respir Physiol Neurobiol* 163(1-3) (2008) 33-43.
- [211] S.E. Dohui Kim, Sang Min Park, Hyeonjun Hong, Dong Sung Kim, A collagen gel-coated, aligned nanofiber membrane for enhanced endothelial barrier function, *Scientific Reports* (2019).
- [212] N.a.O.L. Vasanthan, Effect of microstructure on hydrolytic degradation studies of poly (l-lactic acid) by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Polymer Degradation and Stability* (2009) 1364-1372.
- [213] C. Ribeiro, Tailoring the morphology and crystallinity of poly (L-lactide acid) electrospun membranes., *Science and Technology of Advanced Materials* (2011).
- [214] J. Zhang, Structural Changes and Crystallization Dynamics of Poly(l-lactide) during the Cold-Crystallization Process Investigated by Infrared and Two-Dimensional Infrared Correlation Spectroscopy, *Macromolecules* (2004) 6433-6439.
- [215] Monika, Effect of Dicumyl Peroxide on a Poly(lactic acid) (PLA)/Poly(butylene succinate) (PBS)/Functionalized Chitosan-Based Nanobiocomposite for Packaging, *ACS Omega* (2018) 13298-13312.
- [216] B.Z. Pengju Pan, Weihua Kai, Tungalag Dong, Yoshio Inoue, Polymorphic Transition in Disordered Poly(l-lactide) Crystals Induced by Annealing at Elevated Temperatures, (2008).
- [217] A. Jash, G. Paliyath, L.-T. Lim, Activated release of bioactive aldehydes from their precursors embedded in electrospun poly(lactic acid) nonwovens, *RSC Advances* (2018) 19930-19938.
- [218] E. Abdelrazek, Spectroscopic studies and thermal properties of PCL/PMMA biopolymer blend, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* (2016) 10-15.
- [219] M. Gümüşderelioğlu, A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix, *Journal of biomedical materials research Part A* (2011) 461-472.
- [220] A. Elzubair, et al., The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. *Journal of dentistry*, (2006) 784-789.
- [221] S. Rajendran, T. Uma,, Conductivity studies on PVC/PMMA polymer blend electrolyte, *Materials Letters* (2000) 242-247.
- [222] J. Hou, et al., Sustained release of N-acetylcysteine by sandwich structured polycaprolactone/collagen scaffolds for wound healing, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2019) 1414-1424.

- [223] L. Ghasemi-Mobarakeh, et al., , Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C* (2010) 1129-1136.
- [224] M. Shoja, et al.,, Preparation and characterization of Poly (ϵ -Caprolactone)/TiO₂ micro-composites, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* (2015) 471-477.
- [225] A. Hivechi, et al.,, Synthesis and Characterization of Exopolysaccharide Encapsulated PCL/Gelatin Skin Substitute for Full-Thickness Wound Regeneration, *Polymers (Basel)* (2021).
- [226] T. Elzein, et al., , FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of colloid and interface science*, (2004) 381-387.
- [227] J.S. Lyu, J.-S. Lee, J. Han, , Development of a biodegradable polycaprolactone film incorporated with an antimicrobial agent via an extrusion process, *Scientific reports* (2019) 1-11.
- [228] https://www.corning.com/catalog/cls/documents/protocols/Transwell_InstructionManual.pdf.
- [229] A.N.K. Samuel R. Polio, Carey E. Dougan, Nathan P. BirchID, D. Ezra Aurian-BlajeniID, Jessica D. SchiffmanID, Alfred J. Crosby, Shelly R. Peyton, Cross-platform mechanical characterization of lung tissue, *PLoS ONE* (2018).
- [230] B. Hinz, Mechanical Aspects of Lung Fibrosis-A Spotlight on the Myofibroblast, *Proc Am Thorac Soc* 9 (2012) 137-147.
- [231] J. Liu, D.Y. Lin, B. Wei, D.C. Martin, Single Electrospun PLLA and PCL Polymer Nanofibers: Increased Molecular Orientation with Decreased Fiber Diameter, *Polymer (Guildf)* 118 (2017) 143-149.
- [232] E.P.S. Tan, C.T. Lim, Physical properties of a single polymeric nanofiber, *Applied Physics Letters* 84(9) (2004) 1603-1605.
- [233] D.C. Christopher Mahoney, Jenora Waterman, Jagannathan Sankar & Narayan Bhattarai, Electrospun nanofibers of poly(ϵ -caprolactone) depolymerized chitosan for respiratory tissue engineering applications, (2016).
- [234] J. Yan, L. Qiang, Y. Gao, X. Cui, H. Zhou, S. Zhong, Q. Wang, H. Wang, Effect of fiber alignment in electrospun scaffolds on keratocytes and corneal epithelial cells behavior, *J Biomed Mater Res A* 100(2) (2012) 527-35.
- [235] W.-R.C. Chun-Yuan Liu¹, Wei-Bor Tsai², and Pen-Hsiu Grace Chao, Effect Of Solvent On Electrospun Plla Fiber Mechanical Characteristics And Ligament Fibroblast Responses, (2010).
- [236] L.A. V. Guarino, Multifunctional scaffolds for bone regeneration, *Bone Substitute Biomaterials* (2014).
- [237] J.S.R. Rui L. Reis, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (2005).
- [238] A. Jarerat, Y. Tokiwa, Degradation of Poly (L-lactide) by a Fungus, *Macromolecular Bioscience* 1(4) (2001) 136-140.
- [239] A. Banerjee, K. Chatterjee, G. Madras, Enzymatic degradation of polymers: a brief review, *Materials Science and Technology* 30(5) (2014) 567-573.
- [240] M.S. Reeve, S.P. McCarthy, M.J. Downey, R.A. Gross, Polylactide stereochemistry: effect on enzymic degradability, *Macromolecules* 27(3) (1994) 825-831.
- [241] S. Li, S. McCarthy, Influence of crystallinity and stereochemistry on the enzymatic degradation of poly (lactide) s, *Macromolecules* 32(13) (1999) 4454-4456.
- [242] A. Pegoretti, L. Fambri, C. Migliaresi, In vitro degradation of poly (L-lactic acid) fibers produced by melt spinning, *Journal of applied polymer science* 64(2) (1997) 213-223.
- [243] G.e.a. Teoh, Development of resorbable nanocomposite tracheal and bronchial scaffolds for paediatric applications, *Br J Surg* (2015) 140-150.

- [244] J. Raghunath, et al., Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage, *Biotechnol Appl Biochem* (2007) 73-84.
- [245] Y.Z.M. N. BÖLGEN, K. ACATAY, 'I. VARGEL and E. PISKIN, In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* (2005) 1537-1555.
- [246] K.D.N. Meital Zilberman 1, Robert C Eberhart, Mechanical properties and in vitro degradation of bioresorbable fibers and expandable fiber-based stents, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* (2005) 792-799.
- [247] M.A.L. Ena Ray Banerjee, Thalia Papayannopoulou, Michael Kahn, Charles E. Murry, William R. Henderson Jr, Human Embryonic Stem Cells Differentiated to Lung Lineage-Specific Cells Ameliorate Pulmonary Fibrosis in a Xenograft Transplant Mouse Model, *PLoS ONE* (2012).
- [248] J.-M.S. CHEN-HUAN LIN, SHAN-HUI HS., Evaluation of Type II Collagen Scaffolds Reinforced by Poly(ϵ -Caprolactone) as Tissue-Engineered Trachea, *Tissue Engineering Part C* 14.
- [249] F.R. Steve N. Georas, Epithelial barrier function: At the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation, *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 134 (2014) 509-520.

EKLER

EK 1- TEZDEN TÜRETİLMİŞ BİLDİRİLER

1- **Sema TUNCER**, Seçil SUBAŞI, Selcan GENÇ, Gülçin GÜNAL KARATAŞ, H. Murat AYDIN, İ. Çağatay KARAASLAN. “**Akciğer Havayolunun 3 Boyutlu Yapılandırılması ve Deneysel Modellemesi**” XXVIII. Uluslararası katılımlı Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi; Ela Quality Hotel, Belek -Antalya; (13-17 Ekim 2021).

