



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü



***AKCİĞERLERDEKİ HAVA-SIVI ARAYÜZEYİNİN
İNCELENMESİNE YÖNELİK ÇİP-ÜSTÜ-EPİTELİYAL
BARİYER PLATFORMU GELİŞTİRİLMESİ***

Yüksek Lisans Tezi

Bilgesu KAYA

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir

2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

***AKCİĞERLERDEKİ HAVA-SIVI ARAYÜZEYİNİN
İNCELENMESİNE YÖNELİK ÇİP-ÜSTÜ-EPİTELYAL
BARİYER PLATFORMU GELİŞTİRİLMESİ***

Bilgesu KAYA

Danışman: Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir

2023

Bilgesu KAYA tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Akciğerlerdeki Hava-Sıvı Arayüzeyinin İncelenmesine Yönelik Çip-Üstü-Epitelial Bariyer Platformu Geliştirilmesi*” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 31 Ocak 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ

.....

Üye : Doç. Dr. Aylin Zıylan ALBAYRAK

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Akciğerlerdeki Hava-Sıvı Arayüzeyinin İncelenmesine Yönelik Çip-Üstü-Epitelial Bariyer Platformu Geliştirilmesi*” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

31/01/2023

Bilgesu KAYA

ÖZET**AKCİĞERLERDEKİ HAVA-SIVI ARAYÜZEYİNİN
İNCELENMESİNE YÖNELİK ÇİP-ÜSTÜ-EPİTELYAL BARIYER
PLATFORMU GELİŞTİRİLMESİ**

KAYA, Bilgesu

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Ocak 2023, 73 sayfa

Günümüzde, mevcut hücre kültürü modelleri, insanlardaki karmaşık, organ düzeyindeki hastalık süreçlerini, hastalıkların patofizyolojisini, hedef dışı ilaç toksisitesini yansıtmakta başarısız olduğundan, pre-klinik ilaç geliştirme çalışmaları, hayvan modelleri üzerinde yapılan deneylere dayanmaktadır. Ancak, ilaç geliştirme süreçlerinde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* modellerin, insan metabolizmasını taklit etmede yetersiz kaldığı giderek daha açık hale gelmektedir. Bunlara alternatif olarak çip üstü organ platformları, dokuların fizyolojik fonksiyonlarını taklit etmek için tasarlanmış, mikro mimarileri, mikro ortamları ve doku-doku arayüzlerini daha iyi oluşturan mikroakışkan platformlardır. Bu tez çalışması kapsamında, daha önce hücre kültürü sistemlerinde kullanılmamış olan PHI20 jel membranları ile oluşturulmuş olan bir çip üstü alveol platformu geliştirilmiş ve bu platformda, nefes alıp verme mekanizması nedeniyle hava-sıvı arayüzeyinde bulunan akciğer epitel hücrelerinin maruz kaldığı mekanik stresin taklit edilebilmesini sağlamak amacıyla Arduino ve servo motor tabanlı bir sistem geliştirilmiştir. Çevresel kirleticilerin epitelyal bariyer disfonksiyonu üzerindeki etkisinin çipte oluşturulabilmesi için, Calu-3 hücreleri, PM2.5 temsilen 800 µg/mL konsantrasyonda silika partiküllerine maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, dinamik+mekanik stres (DMS) koşullarının hücre canlılığını arttırdığı, silika partiküllerinin DMS koşullarında hücrelere daha fazla etki ederek sitotoksik etki gösterdiği ve proinflamatuvar yanıtta DMS koşullarının TNF-α regülasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: mekanostres; akciğer; epitel bariyeri; çip üstü organ; silika partikülleri

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF AN EPITHELIAL BARRIER-ON-A-CHIP
PLATFORM FOR INVESTIGATION OF AIR-LIQUID INTERFACE
IN LUNGS**

KAYA, Bilgesu

MSc Thesis, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Ozlem YESIL-CELIK TAS

January 2023, 73 pages

Currently, pre-clinical drug development studies are based on experiments on animal models, as current cell culture models fail to reflect complex, organ-level disease processes in humans, the pathophysiology of diseases, and off-target drug toxicity. However, it is becoming increasingly clear that the *in vitro* and *in vivo* models used in drug development are insufficient to mimic human metabolism. Alternatively, organ-on-a-chip platforms are microfluidic platforms designed to mimic the physiological functions of tissues, better forming microarchitectures, microenvironments and tissue-tissue interfaces. Within the scope of this thesis, an alveolus-on-a-chip platform built with PHI20 gel membranes, which has not been used in cell culture systems before. Arduino and servo motor based system has been developed for this platform to simulate the mechanical stress that lung epithelial cells in the air-liquid interface are exposed to due to the breathing mechanism. and. In order to establish the effect of environmental pollutants on epithelial barrier dysfunction on the chip, Calu-3 cells were exposed to silica particles at a concentration of 800 µg/mL representing PM2.5. According to the results obtained, it was observed that dynamic + mechanical stress (DMS) conditions increased cell viability, silica particles had a cytotoxic effect by acting more on cells under DMS conditions, and DMS conditions had positive effects on TNF- α regulation in proinflammatory response.

Keywords: mechanostress; lung; epithelial barrier; organ-on-chip; silica particles

ÖNSÖZ

Yeni ilaçların geliştirilmesi oldukça maliyetli ve zaman alan süreçlerdir. Bu süreçlerde yer alan faz çalışmalarını daha efektif hale getirmek için pre-klinik çalışmaları geliştirmek gerekmektedir. Bu kapsamda, daha kesin sonuçlar alınacak ve hayvan denek kullanımını azaltacak sistemlerin oluşturulması oldukça önemlidir. Bu amaçlara hizmet etmesi ve literatüre katkı sağlaması amacıyla tez çalışmam kapsamında geliştirmiş olduğum çip üstü epitelyal bariyer platformunun gerek akciğer hastalıklarının modellenmesinde gerekse çoklu organ etkileşimlerinin inceleneceği daha kompleks platformlarda kullanılabileceğine yönelik motivasyonum bana ışık olmuştur. Dileğim, çip üstü organ platformlarının yakın zamanda dünya genelinde çok daha yaygın olarak kullanılması ve hayvan denek kullanımının azaltılmasıdır.

İZMİR

31/01/2023

Bilgesu KAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Solunum Sistemi.....	3
2.1.1. Alveol.....	4
2.1.2. Hava-sıvı arayüzeyi ve epitelyal bariyer.....	6
2.1.3. Epitelyal bariyer disfonksiyonu.....	7
2.2. Çip Üstü Organ Sistemleri.....	8
2.2.1. Çip üstü organ platformu üretimi.....	12
2.3. Çip Üstü Akciğer.....	13
2.3.1. Çip üstü akciğer uygulamaları.....	14
2.4. Tezin Amacı.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç.....	19
3.1.1. Sarf malzemeler.....	19

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Sistem Tasarımı ve Fabrikasyonu.....	20
3.2.1.1. Mekanik stres sistemi.....	22
3.2.2. Simülasyon.....	23
3.2.3. PHI20 jel membran üretimi.....	23
3.2.4. Çekme testi.....	24
3.2.5. Temas açısı analizi.....	24
3.2.6. Degradasyon analizi.....	24
3.2.7. Sterilizasyon tekniğinin belirlenmesi.....	25
3.2.8. Kalitatif absorpsiyon/boyanma analizi.....	25
3.2.9. Besin ortamı seçimi.....	25
3.2.10. İnsan akciğer epitel (Calu-3) hücre kültürü.....	25
3.2.11. Yüzey kaplama.....	27
3.2.12. Canlılık analizi.....	27
3.2.13. İmmünofloresan boyama.....	27
3.2.14. Laktat dehidrojenaz aktivitesi (sitotoksosite) analizi.....	28
3.2.15. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) analizi.....	28
3.2.16. İstatiksel analiz.....	29
4. BULGULAR.....	30

İÇİNDEKİLER (devamı)

	<u>Sayfa</u>
4.1. Simülasyon.....	30
4.2. Çekme Testi.....	31
4.3. Temas Açısı Analizi.....	31
4.4. Degradasyon Analizi.....	32
4.5. Sterilizasyon Tekniğinin Belirlenmesi.....	32
4.6. Kalitatif Absorpsiyon/Boyanma Analizi.....	32
4.7. Besin Ortamı Seçimi.....	33
4.8. Yüzey Kaplama.....	34
4.9. Canlılık Analizi.....	34
4.10. İmmünofloresan Boyama.....	35
4.11. Laktat Dehidrojenaz Aktivitesi (Sitotoksosite) Analizi.....	35
4.12. Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF- α) Analizi.....	36
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	37
6. ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	42
TEŞEKKÜR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. İnsan akciğerinin anatomisi.....	4
Şekil 2.2. İnsan akciğerindeki bölgelere göre hücre tipleri ve epitelyal bariyer değişimi.....	5
Şekil 2.3. Alveollerde bulunan hava-sıvı arayüzeyinin illüstrasyonu.....	7
Şekil 2.4. Birden fazla organ ile oluşturulan çip-üstü-organ, çip-üstü-insan modelleri ve çalışılan mekanizmalar.....	11
Şekil 2.5. Mikroakışkan çipler için fabrikasyon metotları.....	13
Şekil 2.6. Bir çip üstü organ düzeyinde akciğer işlevlerinin yeniden oluşturulması.....	15
Şekil 2.7. Pulmoner ödem modeli.....	15
Şekil 2.8. Mikroakışkan çip.....	16
Şekil 2.9. Pnömatik solunum mekanizmasına sahip çip üstü.....	16
Şekil 2.10. Çip üstü insan küçük havayolu.....	17
Şekil 2.11. Çip üstü pulmoner tromboz.....	17
Şekil 3.1. Çip tasarımı ve mekanik stres uygulaması.....	20
Şekil 3.2. Tekli ve çoklu platformlar için kalıp tasarımları.....	21
Şekil 3.3. PDMS katmanların kalıplama yöntemi ile üretimi.....	21
Şekil 3.4. Çekme sisteminde kullanılacak olan PMMA sıkıştırıcılar ve servo motorlar ile mikroplatformun yerleştirileceği komponentler.....	22
Şekil 3.5. PMMA plakalar ile sıkıştırılmış dörtlü çip sistemi.....	22
Şekil 3.6. Mikroçipin mekanik stres platformuna yerleştirilmesi.....	23
Şekil 4.1. Yer değiştirme simülasyonu.....	30
Şekil 4.2. Stres simülasyonu.....	30
Şekil 4.3. Gerilme simülasyonu.....	31
Şekil 4.4. Çekme testi sonucunda oluşan gerilme-gerinim grafiği.....	31
Şekil 4.5. PHI20 jelin temas açısı analizleri.....	32
Şekil 4.6. Degradasyon grafiği.....	32
Şekil 4.7. Absorpsiyon/Boyanma analizi.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.8. Calu-3 hücreleri için besin ortamı seçimi.....	33
Şekil 4.9. PHI20 jel üzerinde fibronektin kaplamalı ve kaplamasız Calu-3 hücre kültürü.....	34
Şekil 4.10. WST-1 canlılık analizi.....	34
Şekil 4.11. İmmünofloresan boyama (DAPI).....	35
Şekil 4.12. Sitotoksosite analizleri.....	35
Şekil 4.13. Tümör nekroz faktörü- α analizi.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

g

Gram

Pa

Paskal

mg

Miligram

ng

Nanogram

 μ g

Mikrogram

 μ L

Mikrolitre

mL

Mililitre

ms

Milisaniye

%

Yüzde

°C

Santigrat derece

sn

Saniye

dk

Dakika

rpm

Dakikada devir

Kısaltmalar

Açıklama

3B

Üç boyutlu

2B

İki boyutlu

D

Dinamik

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devamı)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DI	Deiyonize
DMS	Dinamik+mekanik stres
PDMS	Polidimetilsiloksan
PBS	Fosfat tamponlu salin
PM2.5	Partikül madde (2.5 µm ve daha küçük)
PM10	Partikül madde (10 µm ve daha küçük)
S	Statik
S+	Silikalı
S-	Silikasız
BSA	Bovine serum albumin
ECM	Ekstrasellüler matris
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
TGF-β3	Dönüştürücü büyüme faktörü beta-3
IL-1β	İnterlökin 1 beta
IL-6	İnterlökin 6

1. GİRİŞ

Yeni ilaç etken maddelerinin geliştirilmesi oldukça zaman alan, aynı zamanda da çok büyük bütçelerin ayrıldığı uzun soluklu süreçlerden oluşur. İlaçların geliştirilme sürecinde en sık başarısızlığa uğranan ve ayrılan bütçenin en yüksek olduğu aşamalar, klinik araştırmalardaki ikinci ve üçüncü fazdır. Bu nedenle önceki aşamalarda yapılan uygun gözlem ve araştırmalar, maliyet ve harcanan süreyi önemli derecede azaltmaktadır (Sung vd., 2010). Günümüzde, mevcut hücre kültürü modelleri, insanlardaki karmaşık, organ düzeyindeki hastalık süreçlerini, hastalıkların patofizyolojisini, belirli hasta alt gruplarının kişiselleştirilmiş ilaç duyarlılıklarını ve hedef dışı ilaç toksisitesini yansıtmakta başarısız olduğundan, klinik öncesi (pre-klinik) ilaç geliştirme çalışmaları, hayvan modelleri üzerinde yapılan deneylere dayanmaktadır. Ancak, şu anda ilaç geliştirme süreçlerinde kullanılan hücre hatları (*in vitro*) ve hayvan modellerinin (*in vivo*), insan metabolizmasını tahmin etmede yetersiz kaldığı giderek daha açık hale gelmektedir. Örneğin, kardiyak toksisite ve karaciğer toksisitesi, onay almış ilaçların piyasadan geri çekilmesindeki başlıca nedenlerdir. Ayrıca, ilaçla ilişkili advers olaylara bağlı olan hastaneye yatışlardan sonra karşılaşılan akut böbrek problemlerinin %20 kadarı, pre-klinik modellerde öngörülememiş olan ilaca bağlı nefrotoksisiteyle ilişkilendirilmektedir (Kim vd., 2012). Diğer birçok ilaç, etkinliğinin yetersizliği ve etki mekanizmasının zayıf anlaşılması nedeniyle başarısız olmaktadır. Pazarlanan ilaçların birçok başarısızlığa uğramasına ek olarak, her yıl onaylanan yeni ilaç sayısı da son 20 yılda azalmıştır. FDA'nın onay sürecinden geçebilen her bir ilaca karşılık yaklaşık 9 diğer ilaç, insanlar üzerindeki klinik denemelerde başarısızlığa uğramaktadır (Çipte Organlar, 2016). Bu nedenlerle, ilaç keşfi ve sağlık araştırmaları için yeni yöntem ve yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Hem geleneksel hücre kültürü modellerinin hem de hayvan deneylerinin yukarıda belirtilen sınırlamaları, araştırmacıları alternatif modellerin geliştirilmesine yöneltmiştir. Bu alandaki en heyecan verici gelişmelerden biri, organoidler de dahil olmak üzere üç boyutlu (3B) bir sistemde hücrelerin kültürlenmesi için mikro mühendislik tekniklerinin kullanılması olmuştur. Son yıllarda çalışılmakta olan bir yöntemle, bu kısıtlamaların önüne geçilerek, daha az masrafla daha iyi sonuçlar elde etmek mümkün hale gelmiştir. Mikroakışkan biyosistemlerin, genellikle "çip üstü organ" olarak anılan gelişmiş biyolojik yaklaşımlarla entegrasyonu hızla ilerlemiştir. Mikroakışkan hücre kültürleri, karmaşık fizyolojik doku özelliklerinin ve işlevlerinin araştırılmasını sağlar. Çip üstü organ platformları, dokuların fizyolojik fonksiyonlarını taklit etmek için tasarlanmış, canlı hücreler ile hücre kültürlerinin oluşturulduğu, sürekli olarak perfüze edilen kanallar ile oluşturulan bu hücre kültürlerinin desteklendiği mikroakışkan platformlardır (Sellgren vd., 2014). Araştırmacılar, akciğer, bağırsak, kalp, böbrek, karaciğer, kan damarları, hava-sıvı arayüzeyi ve kan-beyin bariyeri gibi birçok farklı yapıyı bu platformlar üzerinde oluşturmuşlardır. Çip üstü organ sistemleri, geleneksel 2B hücre kültürü sistemleriyle karşılaştırıldığında mikro mimarileri, mikro ortamları ve doku-

doku arayüzlerini daha iyi oluşturur; daha önce mümkün olmayan karmaşık insan biyolojik süreçlerinin incelenmesine yardımcı olur. Bu teknoloji ile üretilen mikro-yapıların davranışları aynen insan vücudundaki yapı iskelelerinin davranışları gibi hücrelerin yaşaması, büyümesi ayrıca bu hücreler ile moleküller, iyonlar, ilaç partikülleri gibi yapılar arasındaki interaksyon bu modellerdeki mikro-kanallar vasıtasıyla gerçekleşir ve gözlemlenir. Diğer bir deyişle bu çipler sayesinde, direkt olarak insan üzerinde denenmeden önce, bir ilacın insanlar üzerindeki immünolojik ve toksikolojik etkisi, etki süresi ve güvenilir olup olmadığı ile ilgili saptamalar yapılabilecektir.

İnsan vücudunda akciğer önemli bir solunum organıdır ve oksijenin havadan kan dolaşımına taşınması ana görevidir. Bu nedenle hayati bir organ olduğundan, akciğer hastalıkları da önde gelen ölüm nedenlerinden biri haline gelmiştir. İstatistiklere göre, astım dahil olmak üzere, kronik alt solunum yolu hastalıklarına bağlı ölümler, 2020 yılında dünyada altıncı en önemli ölüm nedeni olmuştur (Mortalite Verileri, 2020). Akciğer nakli, donör kısıtına rağmen en önemli tedavi yöntemlerindendir. Son yıllarda ortalama bekleme süresi azalmakla birlikte yıllık akciğer nakli sayısı 4600'ün üzerindedir (van der Mark vd., 2020). Ayrıca aktif hepatit B, hepatit C veya HIV gibi hastalıkları olan hastalara nakil yapılamamasının yanında, akciğer transplantasyonunun, kan pıhtıları, enfeksiyonlar ve yeni akciğerin reddi gibi kısıtlamaları vardır (Shah, 2013). Bu nedenle birçok araştırma, akciğer doku mühendisliği dahil olmak üzere, bağışıklık sisteminin baskılanmasının gerekmediği, hastanın kendi hücrelerini kullanarak dokunun büyüyebildiği diğer yöntemlere odaklanmıştır. Bu amaçla, biyomimetik mikroakışkan akciğer kültürü modelleri, hücrelerin maruz kaldığı mekanik ve fizyolojik özellikleri yeniden oluşturabilecek, doku bütünlüğünün oluşturulmasına elverişli ve *in vivo* mikroçevreyi en iyi şekilde taklit edebilecek sistemlerin geliştirilmesi için tasarlanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, çevresel kirleticilere maruz kalan birincil bölgelerden biri olan akciğer mikroçevresinin araştırılması hedeflenmiştir. Alveollerde gaz değişimini sağlayan hava-sıvı arayüzeyinin incelenmesine yönelik bir çip üstü alveol platformu geliştirilmiştir. Şeffaf, geçirgen, esnek ve ince yapılı PHEMA tabanlı bir membran kullanılarak oluşturulan platform, Arduino tabanlı bir mekanik stres sistemine adapte edilmiş ve nefes alıp-verme mekanizmasının çip üzerinde taklit edilmesi sağlanmıştır. Bu çip üstü alveol platformu içerisinde oluşturulan epitelyal bariyer üzerinde, PM2.5 çevresel kirleticilerini temsilen silika partiküllerine maruziyet gözlemlenmiştir. Statik, dinamik ve mekanik stres uygulanan koşullar altında hücreler arası sıkı bağlantı proteinlerindeki değişimler, sitotoksik etki ve proinflatuar yanıt araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Sistemi

Solunum sistemi, kana oksijen sağlamak ve kandaki karbondioksiti uzaklaştırmak için özelleşmiş bir organ sistemidir. Genel olarak sanıldığından daha çeşitli işlevlere sahiptir:

- Kan ve hava arasında oksijen ve karbondioksit alışverişini sağlar.
- Konuşma ve diğer sesler (gülme, ağlama) için kullanılır.
- Koku alma duyusu ile farklı kokuları algılamamızı sağlar.
- Asit-baz dengesi. CO₂'yi ortadan kaldırarak vücut sıvılarının pH'ını kontrol etmeye yardımcı olur. Fazla CO₂ su ile reaksiyona girer ve hidrojen iyonları salar:



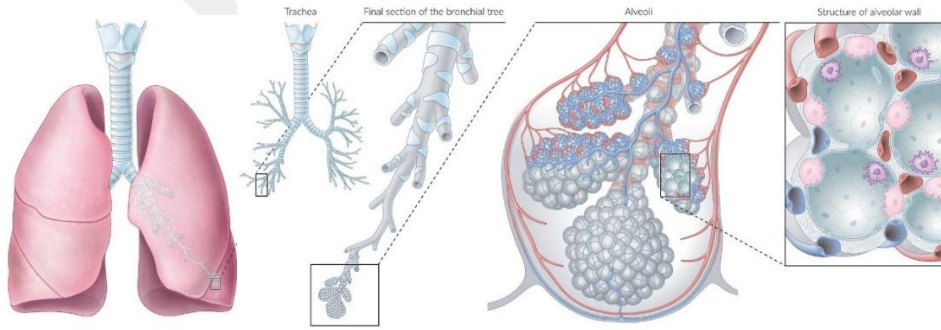
Bu nedenle, solunum sistemi CO₂ üretim hızına ayak uyduramazsa, H⁺ birikir ve vücut sıvılarının pH'ı anormal derecede düşük olur (asidoz).

- Akciğerler, kan basıncını düzenlemeye yardımcı olan anjiyotensin II adı verilen bir vazokonstriktörün sentezine katkı sağlar.
- Solunum, göğüs ve karın arasında lenf ve venöz kan akışını destekleyen basınç gradyanları oluşturur.
- Karın kaslarını kasarken derin bir nefes almak ve tutmak, idrara çıkma, dışkılama ve doğum sırasında karın içeriğinin dışarı atılmasına yardımcı olur.

Solunum sisteminin başlıca organları burun, farinks, gırtlak, trakea, bronşlar ve akciğerlerdir. Akciğerlerin içinde hava, esasen bronşlar, bronşlar ve alveollerden oluşan çıkmaz bir yol boyunca akar. İnhalasyon sırasında, gelen hava alveollerde durur ve alveolar duvar boyunca kan dolaşımıyla gaz alışverişi yapar; soluk verme sırasında geri dışarı akar. Solunum sisteminin iletken bölümü, esas olarak burun deliklerinden bronşlar kadar, yalnızca hava akışına hizmet eden geçitlerden oluşur. Bu geçitlerde kanla gaz alışverişi olmaz çünkü duvarları yeterince hızlı gaz difüzyonuna izin vermeyecek kadar kalındır. Solunum bölümü, alveoller ve diğer gaz değişim bölgelerinden oluşur. Burundan gırtlığa geçen hava yoluna genellikle üst solunum yolu (baş ve boyundaki solunum organları) denir ve trakeadan akciğerlere geçen bölgeler alt solunum yolunu (göğüs solunum organları) oluşturur.

Solunum sistemi, bir iletken bölgeden (ağız, burun, farinks, gırtlak, trakea, bronşlar, bronşlar ve terminal bronşlar) ve bir solunum bölgesinden (akciğer parankimi; yani solunum bronşlar, alveolar kanallar ve alveolar keseler) oluşur. İletim bölgesi, solunum yolu olmayan dokudan oluşur ve O₂/CO₂ değişiminin gerçekleştiği solunum bölgesinin havalandırılması

için geçişi sağlar. Solunum sistemi ayrıca bir üst yol (larenksten yukarıya doğru olan yapılar) ve bir alt yol (larenksin altındaki yapılar) olmak üzere ikiye ayrılır. Bronşlara kadar tüm solunum yolu, hava yollarını toz ve mikroorganizmalardan temizlemeye yardımcı olarak immünolojik koruma sağlayan silli epitel ile kaplıdır. Trakea ve bronşlarda bulunan hiyalin kıkırdak yapısı, koruma ve bütünlük sağlar. Gaz alışverişi akciğerlerin alveollerinde gerçekleşir. Sağ akciğer 3 lobdan (üst, orta, alt), sol akciğer 2 lobdan (üst, alt) ve sağ akciğerin orta lobuna homolog bir yapı olan linguladan oluşur (Şekil 2.1). Sol akciğer, boşluğunu kalp ile paylaşır, dinlenme sırasında yaklaşık 1.4 L hacme sahiptir. Sağ akciğer ise 1.5 L hacme sahiptir. Akciğerlerin toplam ağırlığı ise yaklaşık 800 g olarak not edilmiştir (Reuter vd., 2014). Akciğerlerin gelişimi embriyonik dönemde başlar ve yaklaşık 8 yaşına kadar devam eder. Kısaca 5 faz ile özetlendiğinde; embriyonik aşama 3.-6. hafta, psödoglandüler aşama 5.-17. hafta, kanaliküler aşama 16.-25. hafta, sakküler aşama 24. hafta-doğum aralığında ve alveolar aşama 36. hafta – 8. yaş aralığında tamamlanmaktadır. (Rehman vd., 2019).

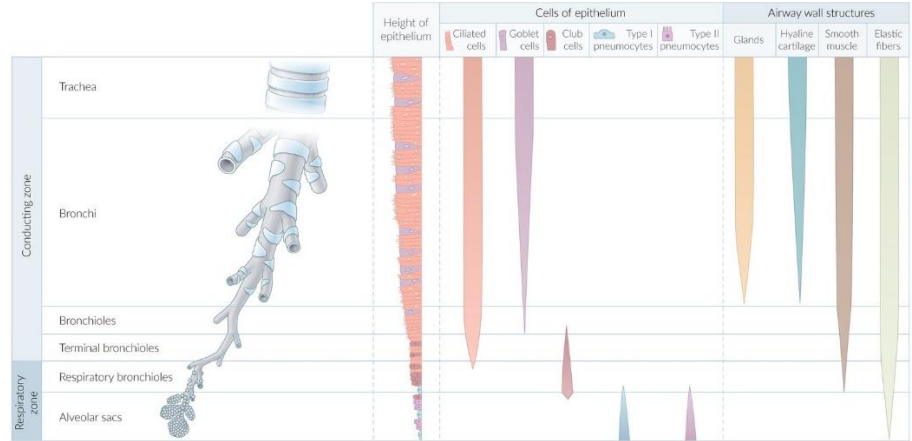


Şekil 2.1. İnsan akciğerinin anatomisi (Airways and Lungs, 2022)

2.1.1. Alveol

Her bir insan akciğeri, gaz değişimi için yaklaşık 70 m²'lik bir yüzey alanı sağlayan 'alveol' adı verilen yaklaşık 150 milyon küçük keseye sahip süngerimsi bir kütledir. Bir alveol yaklaşık 0,2-0,5 mm çapında bir kesedir. Skuamöz (tip I) alveolar hücreler olarak adlandırılan ince, geniş hücreler alveolar yüzey alanının yaklaşık %95'ini kaplar. İncelikleri, alveoller ve kan dolaşımı arasında hızlı gaz difüzyonuna izin verir. Diğer %5, yuvarlak ve küboidal büyük (tip II) alveolar hücrelerle kaplıdır. Daha az yüzey alanı kaplamalarına rağmen, büyük alveolar hücreler, skuamöz alveolar hücrelerden önemli ölçüde fazladır (Şekil 2.2) (Functions of the Respiratory Portion). Büyük alveolar hücrelerin iki işlevi vardır: skuamöz alveolar hücreler hasar gördüğünde alveolar epiteli onarılır ve alveol ile en küçük bronşları kaplayan, nefes verirken bu bölgenin çökmesini önleyen bir fosfolipit/protein karışımı olan pulmoner sürfaktan (mukus) salgırlar. Mukus olmadan, nefes verme sırasında sönen bir alveolün duvarları

birbirine yapışır ve bir sonraki nefes alma sırasında alveolleri yeniden şişirmek çok zor olur.



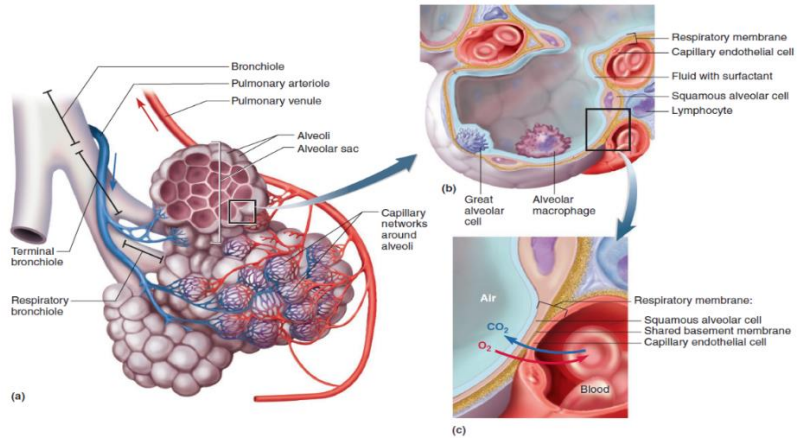
Şekil 2.2. İnsan akciğerindeki bölgelere göre hücre tipleri ve epitelyal bariyer değişimi (Functions of the Respiratory Portion).

10 μm 'den büyük parçacıklar burun boşluğuna kadar ilerleyebilir ve burada burun kılları tarafından tutularak temizlenir. 3-10 μm büyüklüğündeki parçacıklar trake veya bronşlara kadar ilerleyebilir, burada mukosiliyer temizlenmeye maruz kalır. 3 μm 'den küçük parçacıklar ise, boyutlarının küçük olması nedeniyle alveollere kadar ilerleyebilir, burada alveolar makrofajlar yardımıyla temizlenir. Akciğerde en fazla bulunan hücre, alveollerin lümenlerinde ve aralarındaki bağ dokusunda dolaşan alveolar makrofajlardır. Bu hücreler, solunum yolunun üst kısımlarında mukus tarafından yakalanmaktan kaçan toz parçacıklarını fagositize ederek alveolleri birikintilerden arındırır. Enfekte olan veya kanayan akciğerlerde makrofajlar ayrıca bakterileri ve gevşek kan hücrelerini fagositize eder. Her gün 100 milyon kadar alveolar makrofaj, yutulmak ve sindirilmek üzere mukosiliyer yürüyen merdivenden yukarı çıkarken ölmekte ve akciğerleri üzerlerindeki artıklardan arındırmaktadır. Her alveol, pulmoner arter tarafından sağlanan bir kılcıl kan damarı bütünü ile çevrilidir. Alveolar hava ile kan arasındaki solunum zarı adı verilen bariyer, yalnızca skuamöz alveolar hücreden, kapiller skuamöz endotel hücresinden ve bunların ortak bazal zarından oluşur. Bunların toplam kalınlığı, kılcıl damarlardan geçen eritrositlerin 7 μm çapından farklı olarak sadece 0,5 μm 'dir. Sıvının alveollerde birikmesini önlemek çok önemlidir, çünkü gazlar kanı yeterince havalandırmak için sıvıdan çok yavaş yayılır. Alveol duvarındaki nem filmi dışında, alveoller, fazla sıvının kan kılcıl damarları ve lenfatik kılcıl damarlar tarafından emilmesiyle kuru tutulur. Akciğerler, vücuttaki diğer organlardan daha kapsamlı bir lenfatik drenaja sahiptir. Bu, kendi seröz sıvımızda boğulmamızı engeller (Reid vd., 2019; Alraiyes vd., 2011).

2.1.2. Hava-sıvı arayüzeyi ve epitelyal bariyer

Epitel dokusu, neredeyse hiç hücre içi boşluk bırakmadan sürekli bir tabaka oluşturarak bir bariyer görevi görür ve vücudu çevresel stresten, fiziksel ve kimyasal hasarlardan, enfeksiyonlardan ve alerjenlerden korur. Derinin, gastrointestinal sistemin ve hava yolunun epitel bariyerleri, çevresel saldırılara ve alerjenlere karşı fiziksel bir bariyer sağlamak ve iç ve dış ortamlar arasındaki iletişimi dengeleyen bir doku arayüzü sağlamak gibi ortak kritik işlevlere hizmet eder. Epitel bariyerin yapısı ve işlevi, konakçı ve çevre arasındaki ana arayüzler olan cilt, gastrointestinal sistem ve solunum yolu arasında farklılık gösterir. Cilt bariyeri çok hücreli, tabakalı, sıkı ve savunmacıdır. *Stratum korneum*, fiziksel olarak yeterli kalınlık ve sağlamlıktaki üst tabakayı oluşturur. Hücreler arası lipid ve protein komplekslerinin yoğun yapısı cilt bariyer fonksiyonları için çok önemlidir. Bağırsak bariyeri, protein-protein bağları nedeniyle seçici geçirgenliğe sahiptir. Mikroplara ve toksinlere karşı etkili bir savunma sağlarken besinleri, suyu ve elektrolitleri emmek için tasarlanmıştır (Sözener vd. 2020). Solunum bariyeri çok incedir ve siller, kas kasılması, mukus ve antibakteriyel fonksiyon ile sürekli bir fiziksel temizleme sağlayarak bir bariyer görevi görür. Burun boşluğundan bronşlara kadar, solunum ağacının iletken kısmı psödostratifiye sütunlu silli epitel ile kaplanırken, alveolar bölge, gaz değişimini sağlayan ince bir skuamöz epitel hücre tabakası ile kaplıdır (Şekil 2.3). Mukosiliyer yürüyen merdivenler, hücreler arası protein bağlantıları ve salgılanan antimikrobiyal maddeler solunum bariyerine katkıda bulunur (Loxham ve Davies, 2017; Moens ve Veldhoen, 2012).

İnsan akciğerinin yüzey alanı ($80m^2$) kabaca bir tenis kortu büyüklüğündedir (Notter, 2000). Bu, akciğeri küçük boyutlu partiküller ve diğer gaz halindeki kirleticiler için insan vücuduna ana giriş kapısı olarak temsil eder (Ghio vd., 2012). Ultra ince veya nano boyutlardaki partiküller, mukosiliyer bariyeri ve makrofajik klirensi önemli ölçüde aşabilme kapasiteleri sayesinde akciğerlerin alveolar bölgesine kolayca nüfuz edebilir ve orada birikebilir (Latvala vd., 2016).



Şekil 2.3. Alveollerde bulunan hava-sıvı arayüzeyinin illüstrasyonu (Saladin ve McFarland, 2008)

2.1.3. Epitelyal bariyer disfonksiyonu

Çevre, sağlığımız için önemli bir belirleyicidir. 19. yüzyılda yaşanan sanayi devriminin ardından, tüm dünyada sanayileşme kaynaklı çevre sağlığı tehditleri artmıştır. Başta insanlar ve evcil hayvanlar olmak üzere tüm canlıların sağlığına yönelik tehdit oluşturan partikül madde (PM) oluşumu, dizel egzozu, ozon ve sigara dumanındaki artışlar ve toksik yükteki artışlar ile şehirlerde hava kalitesinde büyük düşüşler meydana gelmiştir. PM2.5, PM10 ve dizel egzozuna maruz kalınması sonucunda insan solunum yolu hücrelerinde bulunan Occludin, Claudin-1 ve ZO-1 gibi sıkı bağlantı proteinlerine zarar geldiği ve epitel hücrelerde ROS sekresyonunun arttığı görülmüştür. Bir fare modeli üzerinde yapılan çalışmalara göre PM2.5 maruziyetinin endotel hücrelerdeki e-cadherin seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Cooper ve Loxham, 2019).

Son araştırmalar, temizlik ürünlerinin, deterjanların/yüzey aktif maddelerin, işlenmiş gıdaların, nanopartiküllerin ve mikropplastiklerin kullanımındaki artışların yanı sıra, son yıllarda, küresel ısınma ve iklim değişikliğinin de solunum sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olduğunu ve bazı alerjenlerin etkilerinin arttığını ortaya koymuştur. Epitelyal bariyer üzerine ilk çalışmalar, bağırsak bariyeri ve bunun inflamatuvar hastalıklarla bağlantısı üzerine yapılmıştır. Çevresel maruziyetler, bağırsak mikrobiyomunun yapısını değiştirebilmekte ve normal immün regülasyonu bozarak alerjik hastalıkların gelişimini tetikleyebilmektedir. Astım, kronik rinosinüzit, alerjik rinit, atopik dermatit, eozinofilik özofajit ve çölyak hastalıklarında, etkilenen organlarda ‘sızdıran epitel’ olarak adlandırılan epitelyal bariyerdeki kusurlar gösterilmiştir ve bu durum, ilgili hastalıkların patogenezinde epitelyal bariyerin fonksiyonunu yitirmesine yönelik hipotezlerin gelişmesine yol açmıştır (Georas vd., 2014). Birçok epidemiyolojik

çalışma, artan astım riskine yönelik olarak, çeşitli kirlleticilere sürekli olarak maruz kalan belirli meslek grupları ve epitelyal bariyer disfonksiyonu arasında bir ilişki olduğunu vurgulamıştır. Buna göre, epitelyal bariyer bütünlüğünün korunması veya bariyer disfonksiyonunun restorasyonu, kusurlu bariyer için tedavi modaliteleri, bariyerin epigenetik düzenlenmesi ve bariyer sızıntısının saptanması için yöntemler, epitelyal bariyer hipotezini desteklemektedir (Egawa vd., 2018).

Akciğer fonksiyonunun azalmasına neden olan alveolar hasar, çeşitli akut ve kronik akciğer hastalıklarının ayırt edici özelliğidir. Bunlar arasında akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), kronik obstrüktif akciğer hastalığında (KOAH) amfizem ve idiopatik pulmoner fibroz yer alır (Whitsett ve Weaver, 2015). Alveolar epitelyal bariyerde yer alan, tip 1 alveolar epitel hücreleri ve tip 2 alveolar epitel hücreleri, solunan maddeler için birincil hedeftir. Bu hücrelerin yaralanması, birçok akciğer hastalığı için önemli bir başlatıcı olay olarak kabul edilir (Guillot vd., 2013). Alveolar onarımı ve alveolar bariyer bütünlüğünü iyileştirmeyi amaçlayan tedavilere acilen ihtiyaç duyulmaktadır, ancak hiçbiri henüz tam anlamıyla mevcut değildir. Alerjik hastalığı olan hastalarda, epitelyal bariyerin homeostatik dengesindeki farklılaşma kaybına ve azalmış birleşme bütünlüğüne rastlanmaktadır. Daha da önemlisi, bu özelliklerle karakterize edilen epitelyal bariyer disfonksiyonunun atopi ve alerjik hastalık gelişiminden önce gerçekleştiği, dolayısıyla bu tür hastalıklarda öncül olaylardan biri olduğu görülmektedir (Chambers ve Mercer, 2015). Alerjik hastalığın başlangıcında bariyer disfonksiyonunun merkezi öneminin giderek daha fazla anlaşılmasına rağmen, normal bariyer fonksiyonunu bozan mekanizmalarla ilgili birçok önemli soru yanıtlanmayı beklemektedir.

2.2. Çip Üstü Organ Sistemleri

Bir çip üzerine insan organlarının fizyolojisini ve işlevselliğini taklit eden mikrofizyolojik sistemler olarak da bilinen mikroakışkan temelli çip üstü organ sistemleri, optik olarak geçirgen olan polimerler kullanılarak elde edilen, farklı hücre türleri üzerinde denemeler yapılmasına olanak sağlayan platformlardır. Bu platformlar üzerinde oluşturulan 3B hücre kültürü ve yapay mikroçevre, *in vivo*'ya benzeyen bir ortam oluşturduğundan, 2B monolayer hücre kültürlerine kıyasla hücre farklılaşmalarını destekleyici ve doku organizasyonunu geliştirici bir etkiye sahiptir (Yeşil-Çeliktaş, 2016). Çip üstü organların kullanımı, hücre kültürü ve biyolojik analiz için mikroakışkan cihazların uygulanmasıyla başlayarak otuz yıl öncesine kadar izlenebilir (Whitesides, 2006). Doku

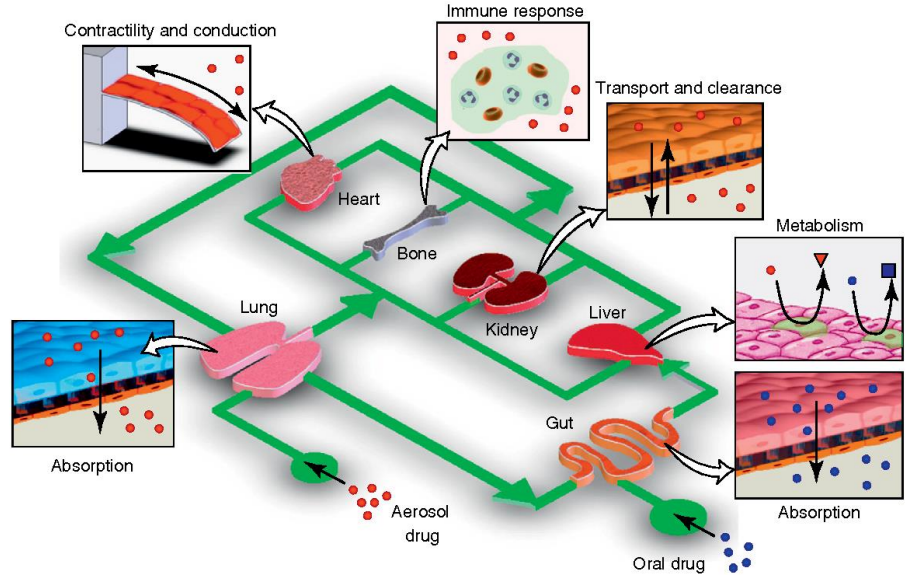
mühendisliğin aksine, indirgemecilik bakış açısıyla tasarlandığı göz önüne alındığında, klinik çalışmalar kapsamında insan denek kullanımının yerine geçmesi için tüm dokuları veya organları orijinal ölçekte yeniden oluşturmaya çalışmaz. Bunun yerine, bu teknik, temel organotipik hücresel mimariyi ve işlevselliği, 3 boyutlu hücre dışı matrisi (3D ECM), biyokimyasal faktörleri ve biyofiziksel belirteçleri daha küçük ölçekte taklit etmeyi amaçlar. Bu, insan dokularının veya organlarının *in vivo* mikroyapısal ve fonksiyonel özelliklerini yansıtır. Böylece tıp, biyoloji ve farmakolojide etkili ve doğru araştırma yapılmasını sağlayarak hastalık modelleme ve ilaç taraması yapılabilmesine hizmet eder (Bhatia ve Ingber, 2014).

Çip üstü organların temel avantajı, çok düşük bir maliyetle üretilibilmeleri ve ilaç dozajında çok çeşitli konsantrasyonların test edilmesine olanak sağlamalarıdır. Bu durum, çip üstü organların, yapılan araştırmayı önemli ölçüde hızlandırmasını sağlamaktadır. Yeni bir ilacın geliştirilmesi sırasında, ilk testler zorluk çekilmeden birçok kez tekrarlanabilir. Ek olarak, bugün yaygın olarak tartışılan hayvan deneylerinin sebep olduğu etik sorunları ortadan kaldırmaktadır. Tıbbi araştırmalar için test hayvanlarının üretilmesine yönelik giderek artan tartışmalar söz konusuken çip üst organ teknolojisi buna önemli bir alternatif sunmaktadır. Petri kaplarına kıyasla, insan hücrelerinin mikro-ortamı (oksijen seviyeleri, sıcaklık, pH, vb.), bir çip içerisinde daha iyi oluşturulabilir. Genellikle en önemli ölçütlerden biri olarak üç boyutlu hücre kültürü oluşturmaya elverişli oluşu, çip üstü organ sistemlerinin önemli avantajlarından biridir. Geleneksel hücre kültürlerinde, hücrelerin *in vivo*'da maruz kaldığı mekanik stresin taklit edilmesi mümkün değildir, örneğin akciğer hücrelerini solunum hareketlerini taklit eden mekanik gerilmeye maruz bırakmak bu kültürler için söz konusu değildir. Üç boyutlu etkilerinin dışında çip üstü organlar, mikroakışkanların kullanımıyla da yenilikçi bir çözümdür. Çip üstü organ sistemlerinin diğer avantajlarından biri ise mikroakışkan çiplerin kullanımının kolay, taşınabilir, küçük olması ve seri üretiminin gerçekleştirilebiliyor olmasıdır. Küçük boyutları sayesinde, birçok mikroakışkan sistemin tek bir çip üzerine entegre edilebilmesine olanak sağlamaktadırlar (Casquillasorgans vd., 2017).

2000'lerin başından bu yana araştırmacılar, *in vitro* biyokimyasal ve farmakolojik analizler için, kontrol edilebilir ve organotipik hücre kültürü oluşturmak amacıyla, çeşitli mikroakışkan cihazları ve çip üstü laboratuvar (lab on a chip) sistemlerini uygulamaya çalışmış, bu da çip üstü organ konseptini ortaya çıkarmıştır. 2010 yılında, Harvard'dan Ingber ve ekibi hem biyoloji hem de mühendislik topluluklarının dikkatini çeken bir çip üstü akciğer modeli bildirmiştir. Araştırmacılar, bu çipin mikroakışkan kanallarındaki gözenekli bir membranın iki tarafında kültürledikleri

akciğer alveolar hücreleri ve kılcal damar hücreleri ile, alveol-kılcal damar arayüzeyinde meydana gelen solunum mekanizmalarını ve çevresel etkileri inceleyebilmişlerdir (Huh vd., 2010). Bu gelişmeden itibaren, karaciğer çipleri, böbrek çipleri, pankreas çipleri, kalp çipleri, bağırsak çipleri, kan-beyin bariyeri (BBB) çipleri ve kemik/kemik iliği çipleri gibi çok sayıda tek organ odaklı çipin geliştirilmesine yönelik çalışmalar başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu tek organ çipleri, klinik öncesi geliştirme aşamasında hedef organlarda kritik biyolojik mekanizmaların yanı sıra ilaç etkinliğinin ve toksisitenin test edilmesine yardımcı olmakta ve böylece klinik deneyler için güvenilir bir referans sağlamaktadır.

Tek organ çipleri, bireysel organ fonksiyonlarını taklit etmeye odaklanırken, çoklu organ çipleri, ilaç emilimi için bağırsak bölümü ilaç metabolizması için karaciğer bölümü ve ilaç eliminasyonu için böbrek bölümü gibi birden çok organ birimini tek bir çipte entegre etmektedir (Şekil 2.4). Örneğin, de Mello ve diğerleri (2020), akut ve kronik ilaç maruziyetinin hem kalp hem de karaciğer fonksiyonları üzerindeki etkilerini analiz etmek amacıyla bir kalp-karaciğer-deri çipi geliştirerek çip üstünde üçlü bir organ sistemi oluşturmuşlardır. Ayrıca, ilaç adaylarının sistemik toksisitesini test etmek için farklı organ bölmelerinde stabil homeostazi ile sırayla bağlı bağırsak, karaciğer, deri ve böbrek bölmeleriyle entegre dört organlı bir çip geliştirilmiştir (Maschmeyer vd., 2015). Şu anda, ilaç farmakokinetiği ve farmakodinamiği analizlerine yönelik tek bir platform kullanarak tüm insan vücudunun fizyolojisini taklit etmek için 'çip üstü vücut (body on a chip)' veya 'çip üstü insan (human on a chip)' olarak adlandırılan daha gelişmiş bir versiyonun geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir. Örneğin, Miller ve Shuler (2016), insanların ana parankimal organlarını ve fizyolojik bariyer dokularını temsil eden, çeşitli hücre hatlarına sahip konsept bir 13-organ sistemi geliştirmişlerdir ve insandaki ilaç tehditlerine yanıt olarak organlar arası geçişi araştırmak için fiziksel bir yapı oluşturmuşlardır. Çip üstü insan platformunun, ilaç geliştirmede hayvan modellerinin yerini alacak alternatif bir model sistem olarak hizmet etme ve nihai olarak ilaç endüstrisinde devrim yaratma potansiyeline sahip olduğu açıktır ancak, insan sisteminin karmaşıklığı göz önüne alındığında, ele alınması gereken çok sayıda teknik zorluk vardır.



Şekil 2.4. Birden fazla organ ile oluşturulan çip-üstü-organ, çip-üstü-insan modelleri ve çalışılan mekanizmalar (Huh vd., 2011)

Çip üstü organ sistemleri, bütün bu avantajlarına rağmen elbette bazı dezavantajları da beraberinde getirmektedir. Analizin kalitesi, sistem içerisinde test edilmek istenen maddenin, platformun iç yüzeyinde adsorbe olmasından etkilenebilir. Ayrıca, mikroakışkanların, çipin mikrokanaalları içerisindeki akışı için Reynolds sayısı daima çok küçük kalacaktır. Reynolds sayısı (Re), mikro/nano ölçekte sıvıların davranışını tanımlamak için mikroakışkan çip teknolojisinde kullanılan önemli bir terimdir. Kanalda akan sıvı üzerindeki atalet ve viskoz kuvvetlerin oranını tanımlar; burada atalet kuvvetleri girdap ve karışmayı (türbülans) teşvik etme eğilimindeyken, viskoz kuvvetler bir katmanın diğerine yumuşak bir şekilde hareket etmesini sağlama eğilimindedir. Türbülans yoksa laminar akış olarak tanımlanır. Reynolds sayısı atalet kuvvetleri ve türbülans ile pozitif, viskoz kuvvetlerle negatif korelasyon gösterir. Re , akış hızları, kanal genişlikleri, yüzeylerden uzaklık ve sıvı yoğunluğu ile artar, ancak sıvı viskozitesi ile ters orantılıdır (Weibel ve Whitesides, 2006). Sonuç olarak, çip içerisindeki akış, her zaman laminardır (Avcı vd., 2018a). Bu durum, deneysel koşulların hassas bir şekilde kontrol edilmesini sağlar ancak sıvıların homojenizasyonu açısından önemli bir problemdir çünkü iyi bir karıştırma sağlanabilmesi için türbülanslı akışa ihtiyaç duyulacağından, kanallar içerisindeki laminar akış ile bu mümkün olmayacaktır. Kanal boyutları küçüldükçe, kullanım sonrası temizlemek zorlaşır. Bazı durumlarda yeni bir çip alınmasına ihtiyaç duyulabilir.

Çip üstü organ sistemlerinin geleneksel *in vitro* modellere kıyasla üstünlüklerini tek başlık altında toplarsak:

- Mikrofabrikasyonu için çeşitli tekniklerin ve malzemelerin kullanılabilmesi,

- Çip tasarımının kolayca oluşturulup modifiye edilebilmesi,
- Tekrar üretilebilirliği yüksek fabrikasyon protokolleri,
- Sensör entegrasyonu ile daha fazla veriden oluşan analizlerin yapılabilmesi,
- Kişiselleştirilmiş modellerin oluşturulabilmesi,
- Hücre/doku düzeyinde fizyolojik/hastalık tabanlı mekanik işaretlerin taklit edilebilmesi,
- Kontrollü ve dinamik bir mikroçevre oluşturulabilmesi,
- Hava-sıvı arayüzünün tekrar oluşturulabilmesi,
- Kompleks, doku benzeri bir çevre oluşturulabilmesi,
- Farklı organ bölgelerini taklit eden modüler cihaz üretim olanağı,
- Fizyolojik ve patolojik koşulların yeniden oluşturulabilmesi,
- Hızlı fabrikasyon prosesleri gibi birçok avantaja sahip olduğu görülebilmektedir (Dellaquila, 2017).

2.2.1. Çip üstü organ platformu üretimi

Çip üstü organ sistemleri, organların ve organların dahil olduğu sistemlerin işlevlerini, mekanik ve fizyolojik yapılarını taklit eden, çip üstü laboratuvar teknolojisi ve hücre biyolojisi bilgisinin entegrasyonu sonucu geliştirilmiş sistemlerdir. Çip üstü organdaki "çip" kelimesi, bilgisayar mikroçiplerinin üretilmesinde kullanılan fotolitografik oymabaskının modifiye edilmesiyle elde edilmiş orijinal bir fabrikasyon metodundan gelmektedir. Bu metot, yüzey şekil ve boyut özelliklerinin, canlı hücrelerin doğal ortamlarını algılayıp ona tepki vermesiyle aynı ölçekte (nm ila μm) kontrol edilebilmesine olanak tanır. Mikroakışkan kültür sistemleri genellikle, daha yumuşak ve esnek malzemelerde, silikon çiplerine kalıplanmış desenleri çoğaltmanın bir yolu olan litografi ile yapılır. Polidimetilsiloksan (PDMS) gibi bir sıvı polimer, oyulmuş bir silikon substrat üzerine dökülerek, optik olarak saydam ve kauçuk benzeri bir materyale polimerleşmesine izin verilmesiyle yapılır. Bu haliyle çip, kontrol edilebilir kültür koşulları sağlayarak akış hızı, basınç, oksijen ve pH gibi çeşitli akışkan ve kimyasal parametreleri hassas bir şekilde modellemek ve kontrol etmek için kompakt bir boyuta ve mikro kanallara sahiptir. PDMS tabanlı mikroakışkan çipler, üretim, kullanım ve entegrasyon kolaylığına sahiptir. Bu kültür sistemlerinin en temel özelliği, çevresel etkenlere karşı hücrel tepkilerin gerçek zamanlı, yüksek çözünürlüklü olarak görüntülenmesini sağlayan optik geçirgenliğidir. Çip üstü organ platformlarını üretmeye yönelik genel adımlar benzerdir, ancak farklı dokuların/organların özelliklerini uygun şekilde taklit etmek için farklı yapısal tasarımlar mevcuttur.

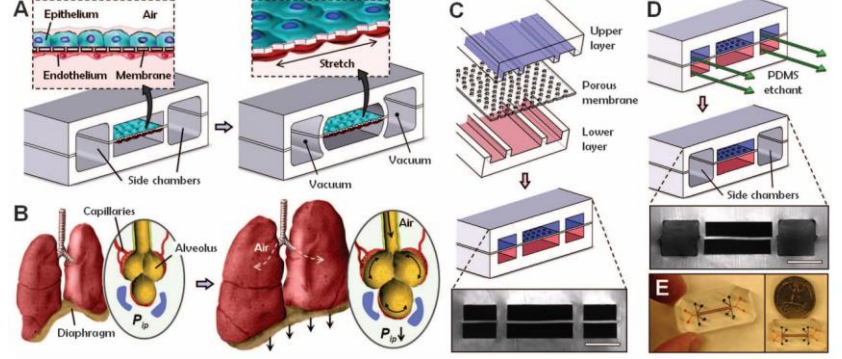
üzere, kronik alt solunum yolu hastalıklarına bağlı ölümler, 2020 yılında dünyada altıncı en önemli ölüm nedeni olmuştur (Mortality 1999-2020, 2021). Bu bağlamda, yeni tedavilerin geliştirilmesini kolaylaştırmak için çip üstü akciğer platformları büyük önem taşır.

Çip üstü akciğer, insan akciğerinin 3B mikro-mimarisini ve mikro-ortamını, solunum hareketlerini ve birincil fizyolojik fonksiyonlarını kopyalayan mikro-mühendislik ürünü bir hücre kültürü cihazıdır. Bir çip üstü akciğer modeli oluştururken göz önünde bulundurulacak önemli parametrelerden biri, fizyolojik koşulları oluşturmak ve doğal organ yapısını olabildiğince benzetmektir. Hücreler ile ECM ilişkisi iyi anlaşılmalıdır (Nalayanda vd., 2009). Modelleme yapılırken, akciğer hücrelerinin *in vivo*'da maruz kaldığı mekanik ve fizyolojik çevre koşullarının, birleşik katı ve akışkan gerilmelerinin modele olabildiğince entegre edilmesi gereklidir. Örneğin; diyafram kasının nefes alıp verirken oluşturduğu mekanik kasılma etkisi göz ardı edilemeyecek bir parametredir. Hem epitel hem de endotel hücrelerinin ortak kültürü, alveolar/epitelyal ve endotel bölümlerini taklit etmek için, ince bir zarla ayrılan iki katmanlı kanal tasarımı önemlidir. Bariyer oluşumundaki gerçek zamanlı değişiklikleri tespit etmek için biyolojik sensörlerin entegrasyonu, sistemi daha gelişmiş ve kapsamlı hale getirecektir.

2.3.1. Çip üstü akciğer uygulamaları

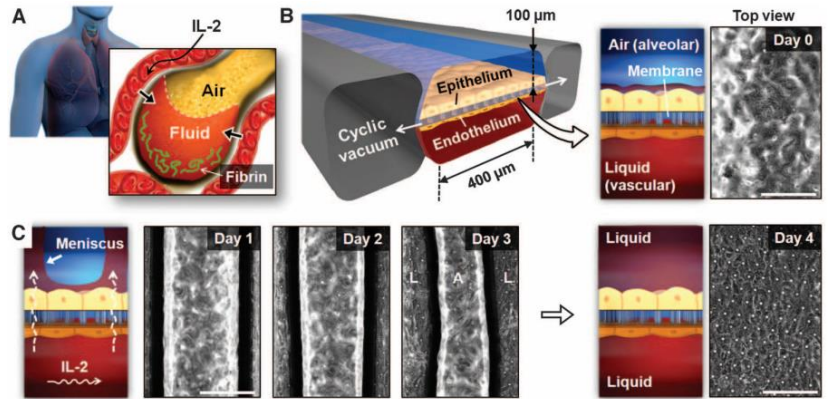
Araştırmacılar, akciğerlerdeki fizyolojik işlevleri taklit etmek için deneysel gereksinimlere göre çeşitli modeller geliştirmişlerdir. Huh ve diğerleri (2010), epitel hücrelerin uzun süreler boyunca (>2 hafta) canlı kalmasına elverişli bir model geliştirmiştir. Oluşturulan modelde, akciğerdeki en küçük fonksiyonel birim olan alveolar-kapiller arayüzün korunmasında hayati bir rol oynadıkları için önemli olan pulmoner sürfaktan (mukus) üretimi de artmıştır. Bu arayüz, vücut ile dış dünya arasındaki fiziksel bariyeri oluşturur. Bu bariyeri daha iyi oluşturmak adına, hücrelerin birbirine daha iyi tutunmasını sağlamak için, bir tarafında hava ile temas eden epitel hücrelerini ve diğer tarafında besin ortamıyla temas eden endotel hücrelerini bulunduran kolajen kaplı ince bir PDMS membran kullanılmıştır. Ayrıca bu yaklaşım, sıvı ortamda kültürlenmiş hücrelere kıyasla farklı doku katmanları üzerinde artan elektrik direnci, gelişmiş yapısal bütünlük, normal epitelyal bariyer geçirgenliği ve oldukça önemli olan mekanik stres etkisinin de oluşturulmasını sağlamıştır (Şekil 2.6). Geliştirilen çip içerisinde gerçekleştirilen hücre kültüründe, hava kirliliğinin akciğer hücreleri üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla epitel hücrelerinin yüzeyine toksik silika nanopartiküller yerleştirmiştir. Daha sonra yapay solunum mekanizması etkinleştirildiğinde havadan daha fazla toksik

partikülün kana geçtiği fark edilmiştir. Bu durum, geleneksel hücre kültürleri üzerinde yapılan testlerin vücuttaki kirlilik toksisitesini tam olarak taklit edemediğini kanıtlamıştır.



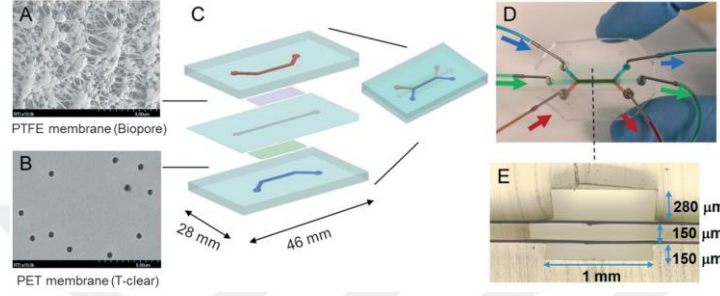
Şekil 2.6. Çip üstü organ düzeyinde akciğer işlevlerinin yeniden oluşturulması, a) çipin çalışma mekanizması, b) nefes alma sırasında akciğerlerde ve alveollerdeki değişim, c) çipi oluşturan katmanlar, d) vakum kanallarının oluşturulması ve yandan görünüm, e) çipin boyut karşılaştırması (Huh vd., 2010)

Huh ve diğerleri (2012), 2010 yılındaki çalışmalarını ilerleterek, hava akımına *E.coli* bakterisi ve kan akımına beyaz kan hücreleri entegre etmişlerdir. Beyaz kan hücrelerinin, bakterilerle savaşmak için epitel hücrelerine nasıl taşındığını gözlemleyebilmişlerdir. Bu çip daha sonra, akciğer ödemi başlangıcındaki maksimum interlökin-2 (IL-2) miktarını ölçmek için kullanılmıştır. İnterlökin-2 böbrek kanserini tedavi etmek için yukarı regüle edilen bir sitokindir ancak alveollerde sıvı birikimi gibi tehlikeli yan etkiler oluşturabilir. Bu nedenle daha sonrasında, anjiyoprotein-1'in bir IL-2 inhibitörü görevi görerek aşağı regüle edilmesindeki etkinliğini kanıtlamışlardır (Şekil 2.7).



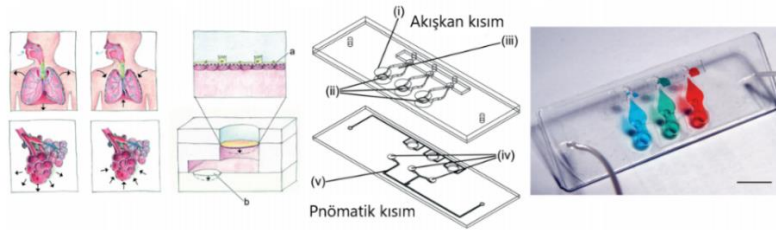
Şekil 2.7. Pulmoner ödem modeli, a) pulmoner ödem ve IL-2 mekanizması, b) çipin katmanları ve vakumla oluşturulan mekanik stres, c) pulmoner ödemde sıvı birikmesini gösteren hava kanalına sıvı geçişi (Huh vd., 2012)

Sellgren ve diğerlerinin (2014) modelinde, hava-sıvı arayüzünde iyi farklılaşmış birincil insan trakeobronşiyal epitel hücreleri ve iyi taklit edilmiş fizyolojik fonksiyonlar gösterilmiştir. *In vivo* kan damarlarında görülen fizyolojik tepki, alt bölmede yer alan endotelial hücreler tarafından yeniden oluşturulmuştur. Bu, yan bölmelerden döngüsel olarak uygulanan vakum yardımıyla oluşturulan gerilim (0,2 Hz'de %10) sayesinde elde edilmiştir. Geliştirilen platform, gerçek akciğer fonksiyonunu taklit etmek için bu tür mikroakışkan modellerin kullanımının önemini daha da vurgulamaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Mikroakışkan çip, a) PTFE membran SEM görüntüsü, b) PET membran SEM görüntüsü, c) çipin katmanları, d) çipin kanalları, e) yandan görünüm (Sellgren vd., 2014)

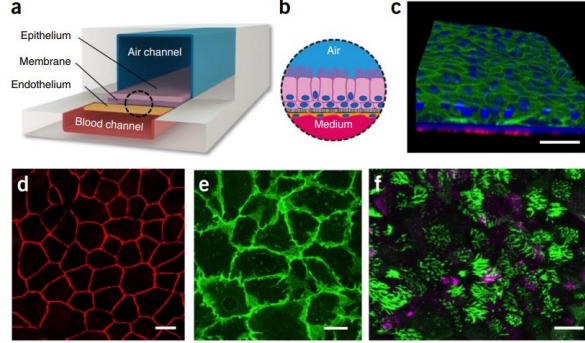
Bir başka çalışmada ise Stucki ve diğerleri (2015), akciğer fizyolojisinden ilham alarak, diyafram etkisini yaratacak şekilde tasarladıkları pnömatik katman sayesinde solunumu çip üzerinde taklit etmişlerdir. Mikrodiyaframlar ile periyodik mekanik gerilme uygulanmasının, epitel hücre tabakasının geçirgenliğini etkilediği kanıtlamışlardır. Endotel ve epitel hücreleriyle oluşturdukları ko-kültür için destek materyali olarak porlu, ince bir PDMS membran kullanmışlardır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Pnömatik solunum mekanizmasına sahip çip üstü akciğer (Stucki vd., 2015)

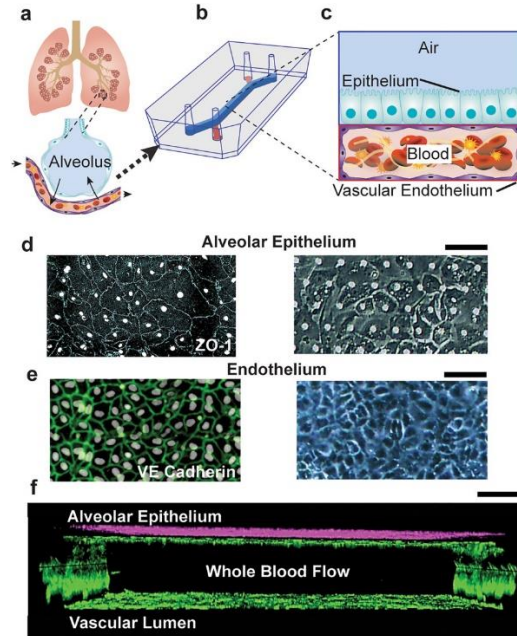
Benam ve diğerleri (2016), altta yatan bir akciğer mikrovasküler endoteli ile farklılaşmış, mukosiliyer, bronşiyol epitelini oluşturan destekleyen bir akciğer küçük hava yolu çipi geliştirmiştir. Bağışıklık hücrelerinin, alt katmandaki sıvı akışı boyunca dolaşmasını sağlayarak, Astım ve KOAH gibi enflamatuar hastalıkların karmaşık süreçlerini incelemek ve terapötik yanıtların değerlendirilmesi için bir model

geliştirmişlerdir. Küçük hava yolu IL-13 ile tedavi edildiğinde Goblet hücrelerinin sayısı, inflamatuvar sitokinlerin salgılanması artmıştır. Bu değişimler, astımlı hastaların hava yolu mukozasında görülen karşılaştırılabilir bulgular olmuştur (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Çip üstü insan küçük havayolu, a) çipin katmanları, b) hava-sıvı arayüzeyi, c) epitel ve endotellerdeki F-actin/DAPI boyaması, d) epiteller üzerinde ZO-1 sıkı bağlantı proteini boyaması, e) endoteller üzerinde PECAM-1 adherent bağlantı proteini boyaması, f) farklılaşmış insan havayolu epitel hücreleri (Benam vd., 2016)

Diğer bir çalışmada, Jain ve diğerleri (2018), gerçek bir akciğer yapısına olabildiğince yaklaşmak için besin ortamı yerine kan kullanmıştır. Geliştirdikleri modelde, mikroakışkan kanal boyunca, alveolar-kılcal zarın solunum sırasında maruz kaldığı gerilme döngüsünün de yeniden üretilmesi için yanlarında iki boş mikrokana bulunur (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Çip üstü pulmoner tromboz, a) alveollerdeki hava-sıvı arayüzeyi, b) çip sistemi, c) epitelyal bariyer ve kan akışının şematik gösterimi, d) alveolar epitellerin mikroskopik ve ZO-1 sıkı bağlantı proteini görüntüsü, e) endotellerin mikroskopik ve VE-Cadherin proteini görüntüsü, f) 12 gün sonunda konfokal mikroskop görüntüsü (pembe: E-Cadherin, yeşil: VE-Cadherin) (Jain vd., 2018)

2.4. Tezin Amacı

İlaç geliştirme süreçlerinde, en az faz çalışmaları kadar önemli olan pre-klinik çalışmalarda elde edilen sonuçların doğruluğu ve kesinliği oldukça kritiktir. İnsan immün yanıtına en yakın sonuçları elde etmek, sürecin kısaltılması, maliyetlerin düşürülmesi ve etkinin optimum düzeye çıkarılması için büyük bir çıkar yoldur. Bu tez çalışmasının amacı, pre-klinik çalışmaların iyileştirilmesi ve hayvan denek kullanımının azaltılması hedefine hizmet eden çip üstü organ platformlarının incelenmesi ve geliştirilmesidir. Bu kapsamda, kolay kalıplanabilir PDMS katmanlar ile ince, esnek, şeffaf ve hidrofilik PHI20 jel membrandan oluşan bir çip üstü alveol platformu geliştirilmesi, bu platform üzerinde insan akciğer epitel hücrelerinin (Calu-3) kültüve edilmesiyle alveollerde bulunan hava-sıvı arayüzeyinin incelenmesi ve nefes alma/verme mekanizması sırasında hava-sıvı arayüzeyinde oluşan mekanik stresin taklit edilebileceği bir sistem oluşturulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Sarf malzemeleri

- 1-bütül-3-metilimidazolyum klorür (BmimCl, ACROS Organics, Lot:A0409421)
- 2-hidroksietil metakrilat (HEMA, Aldrich, PCode: 101156304)
- 96-well plaka (Corning® Costar® Ultra-Low Attachment Multiple Well Plate, Sigma, CLS3473)
- Absolute etanol (Merck)
- Collagen A (L7220, Merck)
- Çapraz bağlayıcı (SYLGARD™ 184 Curing agent)
- İnsan Tümör Nekroz Faktörü Alfa ELISA Kiti (FineTest)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Cell culture grade, HPLC grade) (Sigma, 41640-1L, ABD)
- Dulbecco's fosfat tampon solüsyonu (D-PBS) (Merck, p.n; P4417)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium: HAMS F12 (1:1) DMEM F12 (Sigma, D6421, ABD)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Merck, E9884)
- Fibronectin (610077BD, Biosciences)
- Fosfat Tamponlu Salin (PBS) (Sigma, P4417-50TAB, ABD)
- Gelatin (from porcine skin, G2500, Merck)
- Hücre kültürü crown'ları
- KPS (Potasyum persülfat, Sigma-Aldrich, PCode: 101364069)
- L-glutamin (Biosera XC-T1755/100, ABD)
- N₂ supplement (07152, STEMCELL)
- Pastör pipet (LPitaliano, L136030, İtalya)
- Penisilin/Streptomisin (Biosera XCA4122/100, ABD)
- PDMS baz solüsyonu (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer)
- Polidimetil siloksan (PDMS)
- Serolojik pipet (1,2,5,10,25 ml) (SPL, Kore)
- TEMED

3.1.2. Kullanılan cihazlar

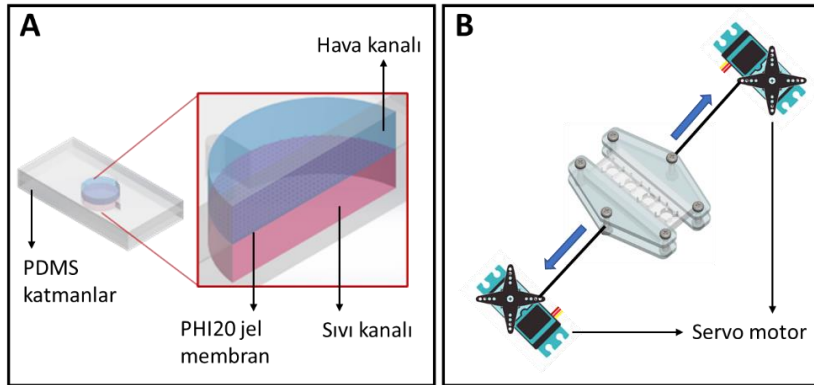
- Aydınlık alan mikroskobu (Leica DM6, Leica, Germany)
- CO₂'li inkübatör (Thermo Scientific, ABD)
- Discovery hibrit reometre (Waters)
- Floresans mikroskop, (fotoğraf makinesi aparatlı), Zeiss Axio
- Floresans mikroskop, (fotoğraf makinesi aparatlı) Zeiss Axio Observer, A1

- GraphPad Prism 8.3.0 istatistiksel analiz programı (San Diego, CA, USA)
- Hassas terazi (Radwag, AS 220 R.2, Polonya)
- Laminar akışlı kabin, Heraus Sınıf II
- Manyetik karıştırıcı (Wisd laboratuvar ekipmanları, Wise Stir, MSH-20A)
- Servo motor (MG995, Tower Pro)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, 5810R, Almanya)
- Su banyosu (Memmert, Almanya)

3.2. Yöntem

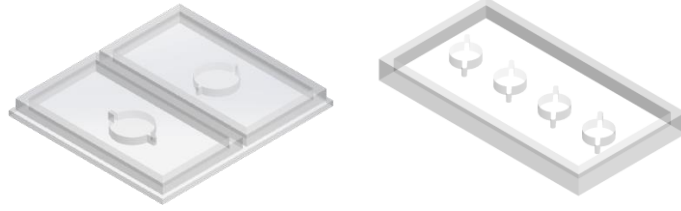
3.2.1. Sistem tasarımı ve fabrikasyonu

Mikroçip platformu ve mekanik stres sisteminin üretilebilmesi için SolidWorks 3 boyutlu bilgisayar destekli tasarım programı kullanılarak kalıp tasarımları yapılmıştır. Hava/sıvı katmanları ve çipi mekanik stres sistemine adapte ederken kullanılacak olan plakalar için ayrı ayrı çizimler yapılmıştır. Yapılan çizimler, masaüstü lazer kesim cihazı (VLS2.30 System Universal Laser) kullanılarak, gerekli kalınlıklardaki PMMA plakalar üzerinden kesilerek üretilmiştir. Mikroplatform, çalışma çipinin alt-üst biyouyumlu PDMS katmanları ve biyouyumlu PHI20 membrandan oluşacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 1a). Mekanik stresi taklit etmek amacıyla 2 adet servo motordan (Tower Pro MG995) oluşan çekme sistemine adaptasyonunu sağlamak amacıyla mikroplatform, 2 kenarından 2 şer adet olacak şekilde toplamda 4 adet PMMA ile sıkıştırılarak sisteme entegre edilmektedir (Şekil 1b). Çalışma çipinde hücre kültürü yapılacak haznenin boyutları, 10mm x 10mm x 2mm ve yüzey alanı 0,785 mm² olarak dairesel alveol yapısını mimikleyecek şekilde tasarlanmıştır.



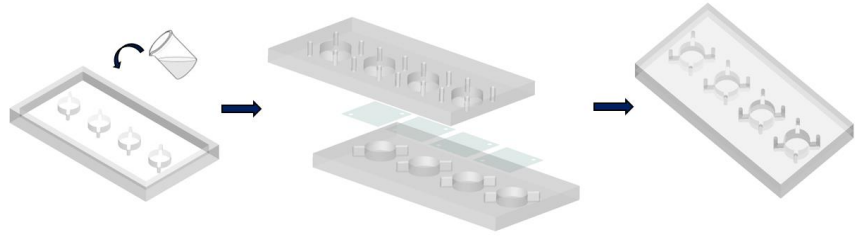
Şekil 3.1. Çip tasarımı ve mekanik stres uygulaması, a) tekli mikroplatform, b) mekanik stres oluşturmak için tasarlanan platformun çalışma prensibi (mavi ok: çekme yönü)

PDMS katmanların tasarlanan şekilde üretilmesi için PMMA levhalardan lazer kesim ile kalıp parçaları üretilmiştir. Üretilen bu PMMA parçalar kloroform kullanılarak birleştirilmiş ve kalıpların son hali elde edilmiştir (Şekil 3.2).



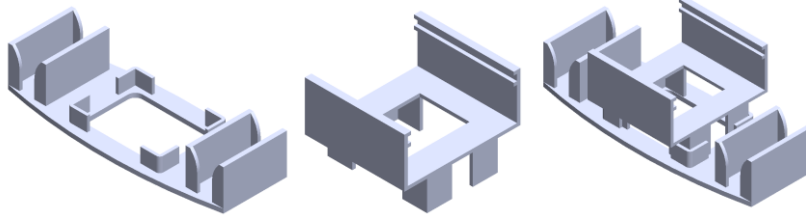
Şekil 3.2. Tekli ve çoklu platformlar için kalıp tasarımları

PDMS tabanlı mikroplatform üretimi için öncelikle, PDMS solüsyonu sırasıyla ağırlıkça 10:1 olacak şekilde PDMS baz solüsyonu (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer) ile çapraz bağlayıcı (SYLGARD 184 Curing agent) karıştırılmış ve homojenize edilmiştir. Daha sonrasında PDMS solüsyonu, üretimi yapılmış olan ve çalışmada kullanılacak olan kanal ve çalışma haznesinin desenlerini içeren kalıplara dökülerek vakum uygulaması ile içinde kalan hava alınmış, baloncuklardan arındırılmıştır (Şekil 3.3). Son aşamada kalıplar 80 °C'ye ayarlanmış etüvde 2 saat tutularak katılaşması sağlanmış ve katı, elastik özellikteki PDMS katmanların üretimi tamamlanmıştır (Devamoglu vd., 2021)



Şekil 3.3. PDMS katmanların kalıplama yöntemi ile üretimi

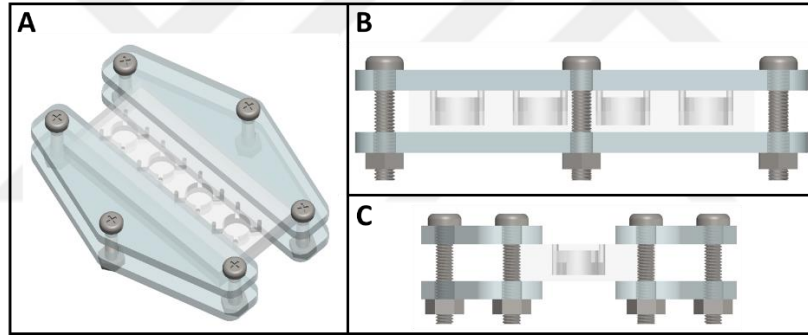
Servo motorlar ile çekme yapılacak olan standın oturtulacağı mekanik stres platformu, SolidWorks programı üzerinde 3 boyutlu olarak modellenmiştir (Şekil 3.4). Oluşturulan model Cura programı kullanılarak 3 boyutlu yazıcıda PLA malzemesinden basılarak üretilmiştir.



Şekil 3.4. Çekme sisteminde kullanılacak olan PMMA sıkıştırıcılar ve servo motorlar ile mikroplatformun yerleştirileceği komponentler

3.2.1.1. Mekanik stres sistemi

Mekanik stresin taklit edilebilmesi için 2 servo motorun PMMA'lar ile sıkıştırılmış olan PDMS çipi (Şekil 3.5) aksiyal olarak çekme prensibine dayanan Arduino Uno tabanlı platformun (Şekil 3.6) çalışması için kullanılan kod eklerde verilmiştir.

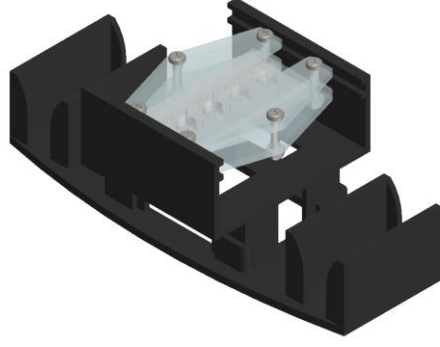


Şekil 3.5. PMMA plakalar ile sıkıştırılmış dörtlü çip sistemi A) üstten görünüm, B) çekme yapılacak yönde yandan görünüm, C) kısa kenar yandan görünüm

PHI20 jel membranlara uygulanan aksiyal çekmenin %10 gerinim oluşturması için kullanılan denklem aşağıda verilmiştir:

$$\varepsilon^{(A)} = \frac{|A'B'| - |AB|}{|AB|}$$

Jel üzerinde oluşturulan gerilme, yetişkin bir insanın nefes alıp verme mekanizmasını taklit edecek şekilde, 0.2 Hz frekansa sahip bir döngü şeklinde uygulanmıştır.



Şekil 3.6. Mikroçipin mekanik stres platformuna yerleştirilmesi

3.2.2. Simülasyon

Üretilen mikroplatformun maruz kalacağı mekanik stres altında stres, gerilme ve yer değiştirme değişimleri SolidWorks programı üzerinde simüle edilmiştir.

3.2.3. PHI20 jel membran üretimi

PHEMA tabanlı hidrojeller, Liu ve diğerlerinin (2020) optimize etmiş olduğu protokole göre, su ve iyonik sıvı (BmimCl) karışık çözeltilerinde HEMA monomerinin *in situ* serbest radikal polimerizasyonu sonrasında polimer ağındaki BmimCl'nin su ile değiştirilmesiyle hazırlanmıştır. Protokol kapsamında, ağırlıkça farklı oranlarda (0:10 ile 10:0 arasında değişen) BmimCl ve su içeren homojen prekürsör solüsyonları hazırlanmıştır. Su/BmimCl karışımı 10.0 g, HEMA 3.9 g (0.03 mol) olacak şekilde sabitlenerek karıştırılmıştır. Oluşturulan Su/BmimCl/HEMA karışımı 80°C'de 5 dakika boyunca azotlu atmosferde tutulmuştur. Redoks başlatıcıları olarak, 0.5 g KPS çözeltisi (0.02 g/ml) ve 8 µl TEMED prekürsöre eklenmiştir. Prekürsör kalıba alınmış ve serbest radikal polimerizasyonunun oluşması için 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen (iyonik sıvı içeren) hidrojeller, bağların içerisindeki BmimCl'yi uzaklaştırmak için 8 saatte bir su değiştirilerek 48 saat boyunca destile suda bekletilmiştir. Elde edilen jeller PHIx olarak adlandırılmıştır. Burada x, toplam su/iyonik sıvı karışımındaki ağırlıkça iyonik sıvı yüzdesini ifade etmektedir. PHI20 hidrojeline, su/BmimCl karışımı ağırlıkça 8:2 oranında kullanılmıştır.

3.2.4. Çekme testi

Gerilim testi olarak da bilinen çekme testi, bir numunenin zarar görene kadar kontrollü bir gerilime tabi tutulduğu temel bir malzeme bilimi ve mühendisliği testidir. İzotropik malzemelerin mekanik özelliklerinin analiz edilmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Mikroçipler içerisinde hücrelerin tutunduğu yüzeyi oluşturan ve membran görevi gören PHI20 jellerinin ve çip üstü organ platformunun mekanik özelliklerinin/dayanımlarının belirlenmesi için tek eksenli (aksiyal) çekme testi uygulanmıştır.

3.2.5. Temas açısı analizi

Temas açısı ölçümü, yüzeyin hidrofobik veya hidrofilik bir özelliğe sahip olup olmadığını değerlendirmenin niteliksel bir yoludur. Su damlası yüzeye temas ettiğinde, yüzey ile arasındaki moleküller arası etkileşimlerin gözlemlenmesine dayanır. Esas olarak bir yüzeyin ıslanabilirliğini değerlendirmek için kullanılır. Hücrelerin tutunması için gerekli olan hidrofilik yüzeyin, üretilen jel membranda sağlanıp sağlanmadığının analiz edilmesi için bu karakterizasyon tekniği kullanılmıştır. Yüzeyleri DI su ile temizlenmiş ve lam üzerinde oda sıcaklığına alınmış olan örnekler kuru haldeyken temas açısı cihazına yerleştirilmiştir. 4 µL sıvı, membran yüzeyine damlatılarak temas yüzeyi ile damlanın yaptığı açı kamera sistemi ile fotoğraflandıktan sonra program üzerinden ölçülmüştür. Ölçümler en az 3 tekrarlı olacak şekilde farklı örneklerin analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Mikroakışkan platformda kullanılacak olan PH20 jel membranlar ile karşılaştırma grubu olarak PDMS membranlar analiz edilmiştir.

3.2.6. Degradasyon analizi

Elde edilen PHI20 jel membranların zamanla, besin ortamı içerisinde bozunma miktarını belirlemek için degradasyon analizi yapılmıştır. Bunun için üretilen membranlar liyofilize edilerek tartıldıktan sonra 37 °C’de DMEM F12 besin ortamı içerisinde tutulmuştur. 1, 4 ve 7. günlerde ortamdan alınarak DI suda dinlendirildikten sonra liyofilize edilerek tartılmış ve kütle farkından yola çıkılarak jellerin biyolojik parçalanabilirlik oranı aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır (Saygılı vd., 2021):

Degradasyon (%): $(W_0 - W_d)/W_0 \times 100$

(W_0 : Jelin ilk kütlesi, W_d : Jelin inkübasyon sonrası kütlesi)

3.2.7. Sterilizasyon tekniğinin belirlenmesi

Kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için, hücre kültürü ortamı ile temas eden tüm parçaların tamamen sterilize edilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, üzerinde insan akciğer epitel hücrelerinin kültüre alınacağı PHI20 jel membranlar için 2 farklı sterilizasyon tekniği denenmiştir. 1. sterilizasyon yöntemi olarak jeller, öncelikli olarak bir gece %70 etanol içeren solüsyonda bekletilmiş, ardından her yüzü için 1 saat olacak şekilde UV sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. 2. sterilizasyon yönteminde ise jellere, etilen oksit sterilizasyonu uygulanmıştır.

3.2.8. Kalitatif absorpsiyon/boyanma analizi

Üretilen PHI20 jel membranların, belirli bir süre RPMI 1640 besin ortamında 37°C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edildiğinde besin ortamını absorplayarak renk değiştirip değiştirmediği gözlenmiştir.

3.2.9. Besin ortamı seçimi

Akciğerlerdeki hava-sıvı arayüzeyini taklit etmek için oluşturulan sistemde epitelyal bariyer oluşturmak için kullanılacak olan insan akciğer epitel hücre hattı (Calu-3) için hangi besin ortamının daha efektif olacağını belirlemek adına 3 farklı besin ortamında (DMEM High Glucose, DMEM F-12 ve RPMI) gözlem yapılmıştır.

3.2.10. İnsan akciğer epitel (Calu-3) hücre kültürü

Epitelyal bariyerin oluşturulması için kullanılan insan akciğer epitel hücreleri (Calu-3), stoklarda bulunan, pasaj numarası 9 olan hücrelerin çözündürülmesiyle platformda kullanılmıştır. Çözdürme işleminde öncelikle, içinde hücreleri bulunduran kriyo tüpler sıvı azot tankından çıkarılarak, %75'ine kadar çözündürülmek üzere önceden 37 °C'ye ayarlanmış olan su banyosuna alınmıştır. Sonrasında, biyogüvenlik seviyesi 2 (BSL-2) laminar hava akışlı kabine alınan

tüplerin içine, %90 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma ortamı, 1'er mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Hücre ve dondurma ortamı karışımı pipetaj yapıldıktan sonra tamamen alınarak santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj tüpü, 5 dk boyunca 4 °C ve 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Çöken hücre pelletine zarar vermeden, hücrelerin üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti üzerine eklenen besin ortamı iyice homojenize edilerek T25 flaskların içine alınmıştır. Flasklar 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörlerde inkübe edilmiştir. Hücrelerin besin ortamları iki günde bir olacak sıklıkla değiştirilmiştir. Hücreler, günlük olarak mikroskop altında incelenmiş ve hücre yoğunluğu, flasklardaki tutunma yüzeyinin %80'ini dolduracak düzeye geldiğinde hücre sayımı ve sonrasında ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücre ekimi için hücrelerin üstünde bulunan besin ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler PBS tampon çözeltisi ile birkaç kez nazıkçe yıkanmıştır. PBS tampon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra, T25 flask için 0.25 mL ve T75 flask için 0.75 mL olacak şekilde, hücrelerin yüzeyden kalkmasını sağlamak amacıyla tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiştir. Solüsyonun tüm yüzeye etki etmesi için 8 tekniği kullanılarak yavaşça karıştırma yapılan flasklar inkübatöre alınarak 37 °C'de 4-5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Mikroskopta yapılan gözlem sonrasında, tüm hücrelerin süspanse hale gelmesini sağlamak için kazıma yapılarak hücreler flasktan kaldırılmıştır. Sonrasında tripsin solüsyonunun nötürleşmesi ve ardından uzaklaştırılması için hücreleri içeren sıvı flasktan alınarak ayrı bir santrifüj tüpüne aktarılmış ve üzerine 4 mL besin ortamı eklenmiştir. Bu tüpün, 5 dk boyunca, 4 °C ve 1000 rpm'de santrifüj edilmesinin ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre sayımı yapılmıştır. Calu-3 hücreleri chip üstü alveol platformu içerisinde 2x10⁵ h/mL konsantrasyonda olacak şekilde kültüve edilmiştir. Çiplere ekilmeyen hücreler ise stoğa kaldırılmak üzere tekrar dondurularak -80 °C'de 1 yıla kadar muhafaza edilmiştir.

Dinamik ortam koşulları çiplerin rocker üzerine alınarak 1 rpm'de çalkalanması ile elde edilmiştir.

PM2.5 maruziyetinin epitelyal bariyer üzerindeki etkilerinin incelenmesi için 800 µg/mL silika partikülü içeren besin ortamları kullanılmıştır.

3.2.11. Yüzey kaplama

PHI20 jel membranların yüzeyi, hücre tutunmasını optimize etmek amacıyla, hücre kültürü öncesinde protein kokteyli ile kaplanmıştır. Yüzey modifikasyonu için iki farklı prosedür denenmiştir. İlkinde, fibronectin $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ içerecek şekilde PBS solüsyonu hazırlanarak hücrelerin kültürleneceği ortama verilmiş, 45 dakika boyunca havalandırılarak oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında sıvı ortamdan çekilmiştir. Diğer uygulamada ise PBS içerisinde laminin $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, fibronectin $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, kolajen A $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve proteoglikan $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ konsantrasyonda olacak şekilde solüsyon hazırlanmış ve jel yüzeyine verilmiştir. 2 saat 37°C 'de bekletildikten sonra sıvı ortamdan çekilmiş ve PBS ile yıkama yapılmıştır.

3.2.12. Canlılık analizi

Platform içerisinde kültürü gerçekleştirilen hücrelerin canlılık analizlerinin gerçekleştirilmesi için kantitatif bir analiz yöntemi olan WST-1 yapılmıştır. WST-1 prosedüründe, ilk basamak olarak hücrelerin tutunmuş olduğu PHI20 jel membranların üzerinden besin ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile 1 kez yıkama gerçekleştirilmiştir. 10:1 oranında WST-1 içeren besin ortamı solüsyonu, her kuyucuk için toplam $110 \mu\text{L}$ hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır. Hücrelerin bulunduğu kuyucuklara eklenen solüsyon 37°C ve $5\% \text{CO}_2$ 'li ortamda 3 saat süreyle, ışıktan etkilenmeyecek şekilde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, kuyucuklardaki süpernatantlar toplanmış ve 96-well plakadaki gözlere aktarılmıştır. 96-well plaka, ışısız ortamda mikrolaka okuyucuya alınarak dalga boyu 450 nm olacak şekilde spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Canlılık oranı hesaplamaları GraphPad Prism 8.0 programı üzerinden gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. İmmüno Floresan boyama

Mekanik stres ve kirleticinin, akciğer epitel hücreleri (Calu-3) üzerindeki etkisinin kalitatif olarak analiz edilmesi için DAPI immüno floresan boyaması gerçekleştirilmiştir.

3.2.14. Laktat dehidrojenaz aktivitesi (sitotoksosite) analizi

Hücre ölümü ve hücre erimesinin miktarının kantitatif olarak belirlenmesi için, hücrelerin sitozolünden süpernatanta salınan laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin ölçümüne dayanan kolorimetrik bir test olan laktat dehidrojenaz analizi yapılmıştır. Silika uygulamasının akciğer epitel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin analiz edilmesi için, çipte gerçekleştirilen hücre kültürüne ait besin ortamları eppendorf tüplere alınmış ve 250 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar 96-well kuyucuklarına alınmıştır. Reaksiyon karışımı, 45:1 oranında sırasıyla boya ve katalist içerecek şekilde gereken miktarda hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL reaksiyon karışımı eklendikten sonra 15-25 °C'de, ışıktan korunacak şekilde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında 96-well 490 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda okutulmuştur. %100 sitotoksisiteyi göstermesi için hücrelere aynı inkübasyon süresi ve koşullarında %2 Triton X-100 uygulaması yapılmıştır. Diğer örneklere yapılan işlemlerin aynısı bu hücreler üzerinden alınan süpernatanta da uygulanmıştır.

3.2.15. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) analizi

Silika uygulaması sonrasında proinflatuar yanıtı temsilen, insan tümörü nekroz faktörü alfa (TNF- α) seviyesini tahlil etmek için, çift antikorlu sandviç enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) kullanılmıştır. Bunun için öncelikle hücrelerin üstünden alınan süpernatantlar 2 kat seyreltilerek, önceden TNF- α monoklonal antikoruna ile kaplanmış ve 2 kez yıkanmış olan 96-well kuyucuklarına koyulmuştur. Plakalar 37 °C de 90 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında 2 kez yıkanan kuyucuklara 100'er µL biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonu koyulmuş ve 37 °C de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyondan alınarak 3 kez yıkanan kuyucuklara 100 µL HRP-Streptavidin konjugat solüsyonu eklenmiş ve 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında, bağlanmamış enzimlerin ortamdaki uzaklaştırılması için her defasında 2 dakika bekletilerek 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Her kuyucuğa 90 µL TMB substratı eklendikten sonra nazikçe karıştırma yapılmış ve ışıktan korunacak şekilde 10-20 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiştir. Rengin hızlı bir şekilde sarıya döndüğü gözlenmiş ve örnekler en kısa sürede 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda okutulmuştur.

3.2.16. İstatiksel analiz

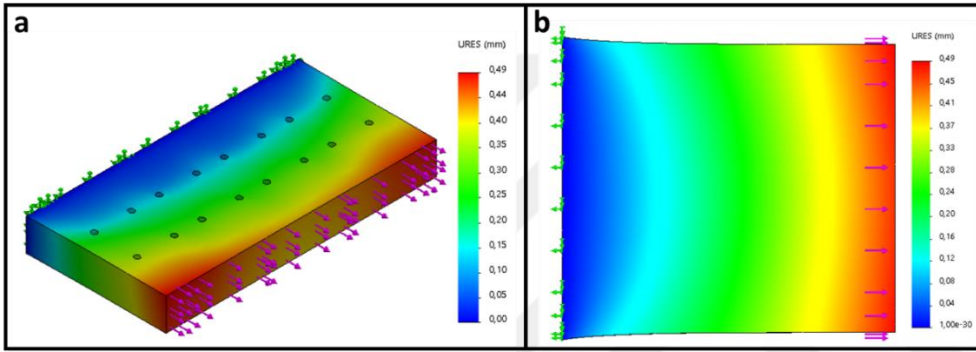
Tüm deneyler en az 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmış olup, ortalama değerleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Prism GraphPad programı üzerinde 2 yönlü ANOVA testi ve t-testi analizleri yapılmıştır.



4. BULGULAR

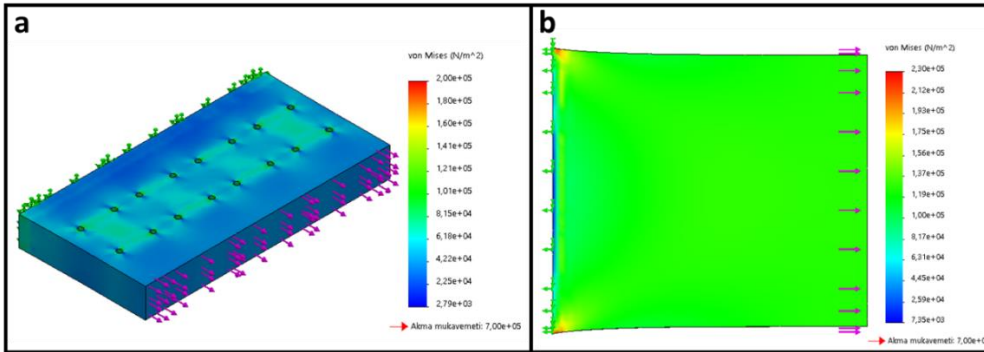
4.1. Simülasyon

SolidWorks bilgisayar destekli 3 boyutlu çizim programının Simülasyon eklentisi ile gerçekleştirilen yer değiştirme simülasyonunda, çip üstü organ platformuna ve PHI20 jel membrana aksiyal olarak çekme uygulandığında, çipin hücre kültürü gerçekleştirilecek olan alanlarının bulunduğu orta kısımlarda 0.20-0.35 mm aralığında bir yer değişimi olduğu görülmüştür, toplam yer değiştirme 1 mm'dir (Şekil 4.1a). PHI20 jel membranda da toplam yer değiştirme 1 mm olacak şekilde orta bölgelerde 0.16-0.33 mm aralığında bir değişim görülmüştür.



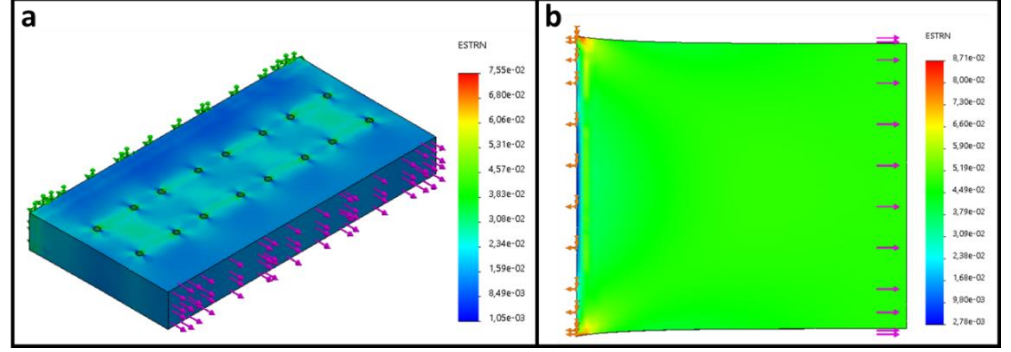
Şekil 4.1. Yer değiştirme simülasyonu, a) çip üstü organ platformu, b) PHI20 jel membran

Platform ve PHI20 jel membrana uygulanan çekme kuvveti sonucunda, platformun maruz kaldığı stres değeri, çiplerin giriş ve çıkışlarının arasındaki PDMS bağlantı bölgelerinde daha fazla oluşmuştur. Bu bölgelerdeki gerilme değeri 6.1×10^4 - 8.15×10^4 N/m² aralığında değişim göstermiştir (Şekil 4.2a). PHI20 jel membranda ise bu değer neredeyse tüm bölgelerde aynı olarak ortalama 1.19×10^5 N/m²'dir (Şekil 4.2b). Malzemelerin akma mukavemeti göstermediği görülmüştür.



Şekil 4.2. Stres simülasyonu, a) çip üstü organ platformu, b) PHI20 jel membran

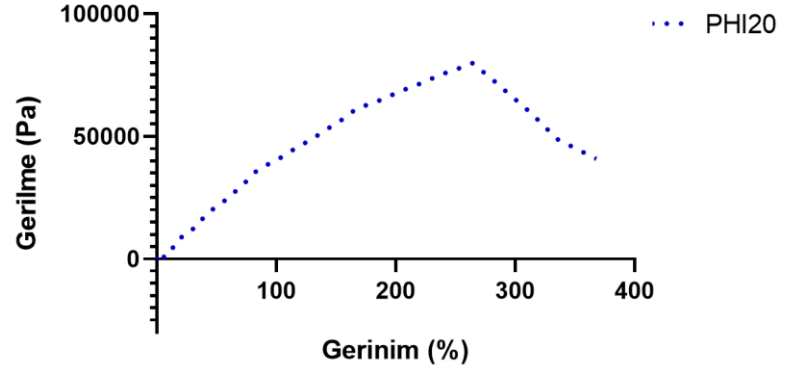
Stres simülasyonuna benzer şekilde, çipin giriş ve çıkış bölgelerinde daha fazla eşdeğer gerilme oluşmuş ve 2.34×10^2 - 3.08×10^2 N/m² aralığında olduğu görülmüştür (Şekil 4.3a). PHI20 jel membranda ise bölgesel gerilme değişimi neredeyse hiç görülmeyerek ortalama 4.49×10^2 N/m² olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. Gerilme simülasyonu, a) çip üstü organ platformu, b) PHI20 jel membran

4.2. Çekme Testi

PHI20 jel membranlara uygulanan çekme testi, Discovery Hibrit Reometer cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda PHI20 jelinin oldukça esnek bir yapıya sahip olduğu ve %265 gerinime kadar dayanım gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.4).

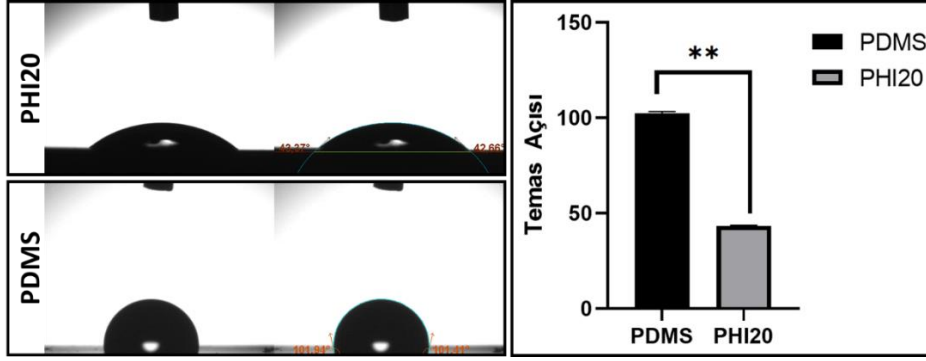


Şekil 4.4. Çekme testi sonucunda oluşan gerilme-gerinim grafiği

4.3. Temas Açısı Analizi

PHI20 jel membranlar ve negatif kontrol grubu olan PDMS membran yüzeyinde hidrofiliğe bakıldığında PHI20 jellerinin oldukça hidrofilik olduğu ve temas açısı ölçümlerinin ortalama 43.02° olduğu görülmüştür. Negatif kontrol olan PDMS membranlarda ise yüzeyin

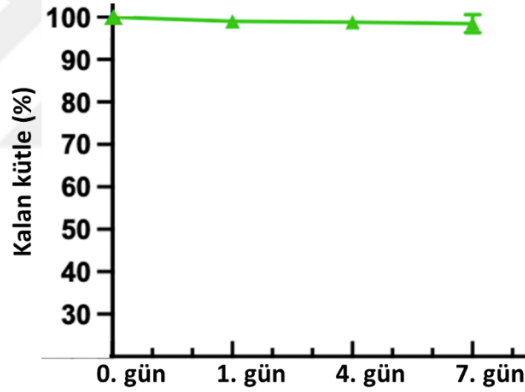
hidrofobik özellik gösterdiği ve temas açısı ölçümlerinin ortalama 101.68° olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. PHI20 jelin temas açısı analizleri

4.4. Degradasyon Analizi

PHI20 jel membranlara yapılan degradasyon analizinde 7 gün boyunca sadece %2 degradasyon olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Degradasyon grafiği

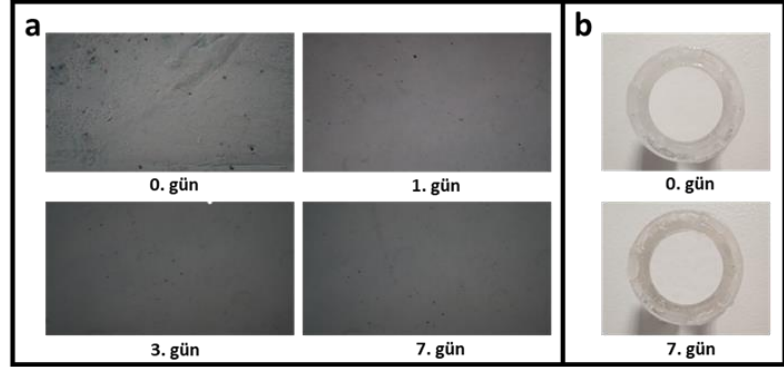
4.5. Sterilizasyon Tekniğinin Belirlenmesi

PHI20 jel membranlara uygulanan sterilizasyon yöntemlerinin ikisinde de olumlu sonuç alınmıştır. Hem etilenoksit sterilizasyonu hem de UV+etanol sterilizasyonuna tabi tutulan membranlar ile gerçekleştirilen hücre kültürlerinde kontaminasyon görülmemiş ve sterilizasyon sonrasında membranlara zarar gelmediği görülmüştür.

4.6. Kalitatif Absorpsiyon/Boyanma Analizi

5 gün boyunca hücre kültürü crown'ları üzerinde tutturularak RPMI besin ortamı içerisinde 37°C ve %5 CO_2 'li ortamda inkübe edilen PHI20

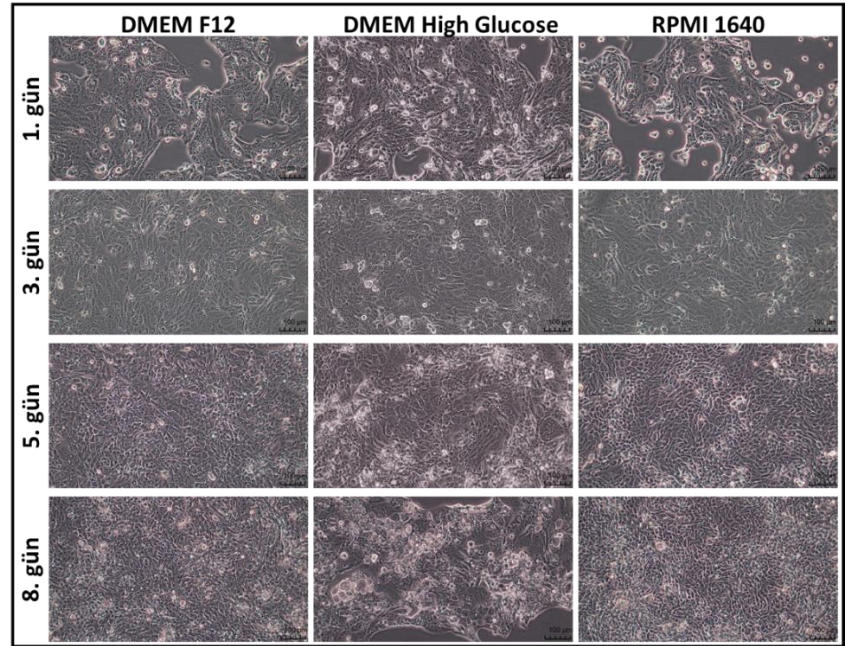
jel membranlar makroskobik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Yapılan kalitatif gözlemde, membranların besin ortamını absorplamadığı ve renk değiştirmedeği görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Absorpsiyon/Boyanma analizi, a) 7 gün boyunca besin ortamı içerisinde tutulan PHI20 jel membranının mikroskop görüntüleri, b) 0. ve 7. günlerdeki membran fotoğrafları

4.7. Besin Ortamı Seçimi

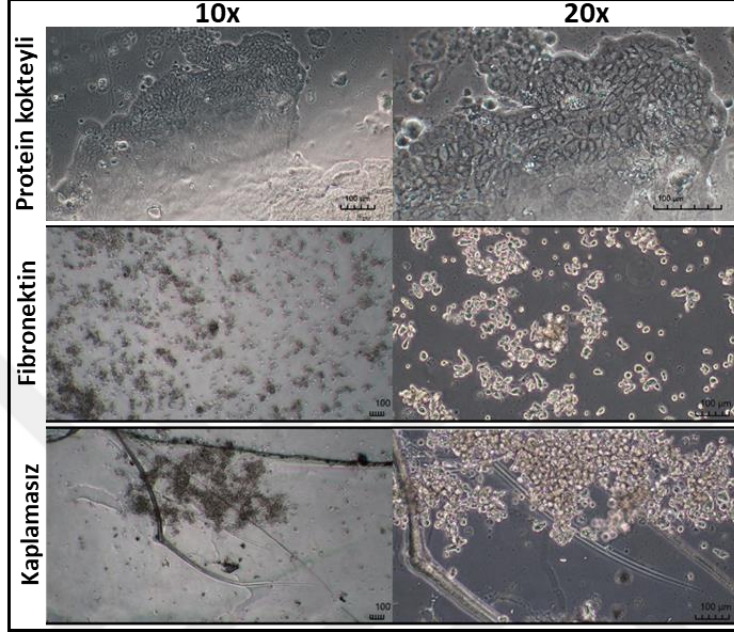
Calu-3 hücrelerinin farklı besin ortamlarına adaptasyonu değerlendirildiğinde, DMEM f12, DMEM High Glucose ve RPMI 1640 besin ortamlarında kültüre alınan hücreler, 8 günlük hücre kültürü süresince mikroskopik olarak gözlenmiştir. T75 flasks içerisinde gerçekleştirilen hücre kültürlerinde yapılan gözlemler sonucunda hücre proliferasyonu ve morfolojisi göz önünde bulundurularak DMEM F12 besin ortamının Calu-3 hücreleri için daha uygun olduğuna karar verilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Calu-3 hücreleri için besin ortamı seçimi

4.8. Yüzey Kaplama

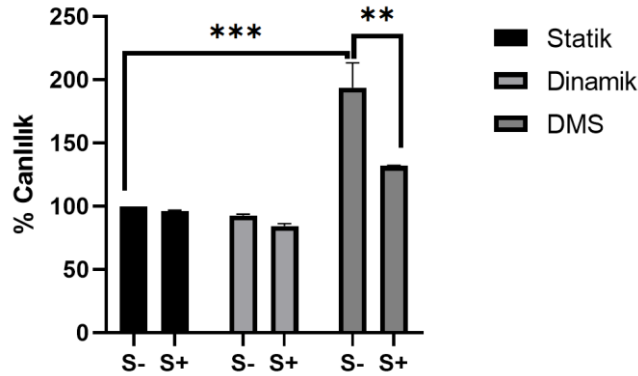
PHI20 jelinin protein kokteyli kaplanmasının, fibronektin ile kaplamaya veya kaplama yapılamasına kıyasla hücre proliferasyonu ve homojen dağılımı için daha elverişli olduğu görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. PHI20 jel üzerinde fibronektin kaplamalı ve kaplamasız Calu-3 hücre kültürü

4.9. Canlılık Analizi

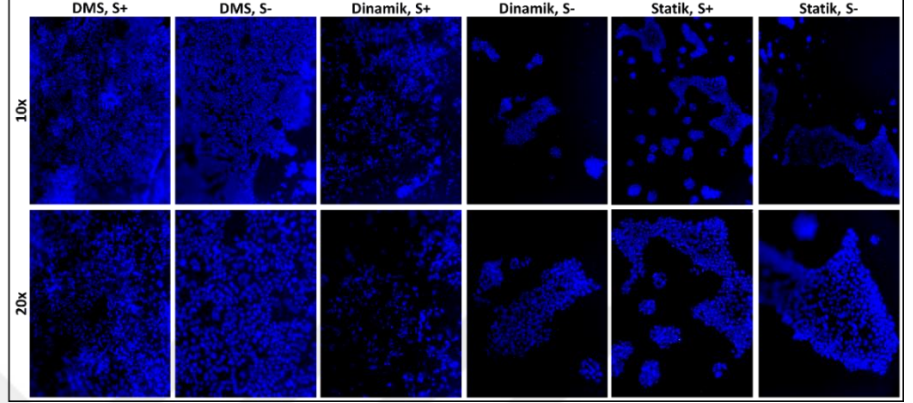
Kantitatif olarak gerçekleştirilen WST-1 canlılık analizi sonucunda dinamik+mekanik stres (DMS) koşullarında, silikanın varlığı ve yokluğu arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Aynı zamanda hücre canlılığının, statik(S-) koşulu ile karşılaştırıldığında, DMS(S-) koşullarında oldukça yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. WST-1 canlılık analizi (S-: silikalı ortam, S+: silikalı ortam, **: $p < 0.002$, ***: $p < 0.0002$)

4.10. İmmüno Floresan Boyama

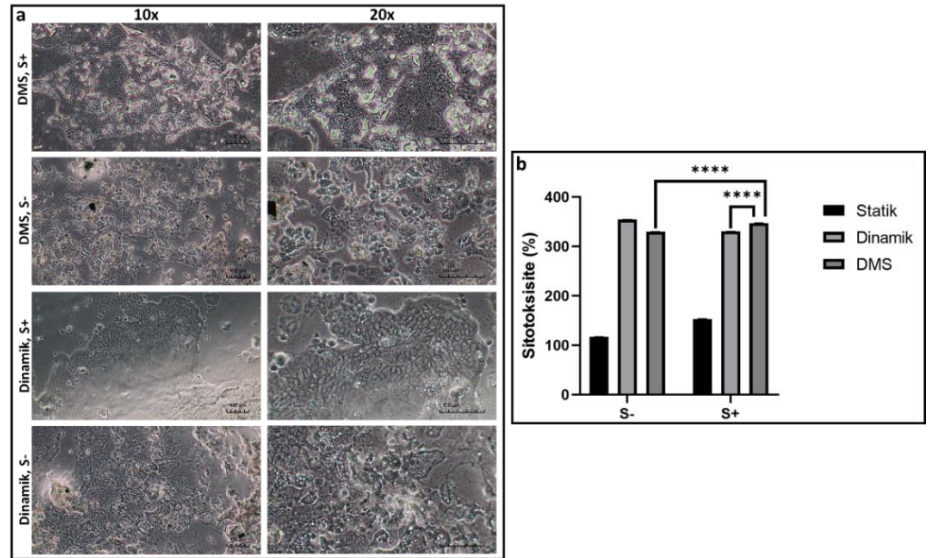
Yapılan immüno floresan görüntüleme, DAPI boyamaları karşılaştırıldığında dinamik+mekanik stres (DMS) koşulları altında silika partiküllerinin varlığının daha heterojen bir nükleus dağılımına sebep olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. İmmüno Floresan boyama (DAPI)

4.11. Laktat Dehidrojenaz (LDH) Aktivitesi Analizi

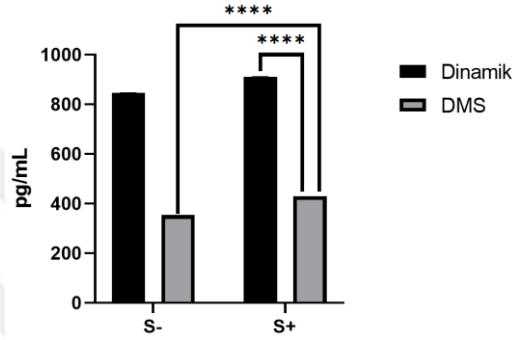
Silikanın sitotoksik etkisi laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesi tayini ile belirlenmiştir. Statik, dinamik ve dinamik+mekanik stres (DMS) koşulları için karşılaştırma yapılmıştır. Statik ve DMS gruplarında silikasız kontrol grubu ile silikalı grup arasında anlamlı farklar görülmüştür. DMS koşulunda silika daha fazla sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Sitotoksosite analizleri, a) 3 gün inkübasyon sonunda ışık mikroskobu görüntüleri, b) laktat dehidrojenaz aktivitesi (LDH) analizi (****: $p < 0.0001$)

4.12. Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α) Analizi

Çift antikorlu sandviç enzim bağlantılı ELISA ile gerçekleştirilen TNF- α analizinde dinamik koşullar ve dinamik+mekanik stres (DMS) koşulları altında silika partiküllerinin varlığı ve yokluğunda proinflatuar sitokin salınımı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında dinamik ve DMS grupları içerisinde TNF- α salınımının silikalı örneklerde daha fazla olduğu ve farkın anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Tümör nekroz faktörü- α analizi (****: $p < 0.0001$)

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Hava-sıvı arayüzeyini içeren alveollerin solunum sırasında maruz kaldığı gerinim hareketleri, alveolar hava boşluklarında ve interalveolar septada deformasyona neden olur (Knudsen ve Ochs, 2018). Ortaya çıkan mekanik zorlanma, interstisyel boşluğun değişken kalınlıkları ve karmaşık parankimal mimari nedeniyle heterojendir (Roan ve Waters, 2011). Bu dinamik ortam, birçok parametrenin eklenmesine sebep olarak, alveollerin *in vitro* koşullarda taklit edilmesini zorlaştırır. İlk zamanlarda geliştirilen çip üstü akciğer platformları, solunum hareketleriyle indüklenen alveolar bariyerin ritmik mekanik gerilimini taklit etmiştir ancak sistemlerde sıklıkla kullanılan PDMS membranlar birçok sınırlayıcı özelliğe sahiptir. PDMS membranların küçük molekül emilimi ve absorpsiyonu, özellikle ilaç geliştirme çalışmalarındaki kullanımı açısından dezavantaj oluşturmaktadır (Zamprognos vd., 2021). PDMS'i bir membran gibi ince ve gözenekli olarak üretebilmek fotolitografi gibi yöntemler gerektirdiğinden bu membranların üretim süreci maliyetli ve zordur (Huh vd., 2011). Diğer yandan PHI20 jelleri oldukça kolay ve zahmetsiz bir şekilde üretilebilmektedir. Üretim sürecindeki en önemli dezavantaj, kürlenme ve yıkama prosedürünün uzun zaman almasıdır. Bunun yanında, üretilen membranlar destile su içerisinde uzun süre bozulmadan bekletilebilmektedir.

In vivo hücreler, fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini, morfolojilerini, işlev ve davranışlarını etkileyecek hücre reaksiyonlarına neden olabilen hücre dışı matris (ECM) ile çevrilidir (Agmon ve Christman, 2016). Bu nedenle, *in vitro* çalışmalarda, yapay yüzeylerde hücre yapışması, oryantasyonu, göçü ve farklılaşması dahil olmak üzere hücre davranışını etkileyen faktörleri ve bunun nasıl kontrol edileceğini anlamak, ileri biyomühendislik ve doku mühendisliği gibi alanlar için çok önemlidir. Bu kapsamda, *in vitro* hücre kültürü sistemlerinde tutunarak üreyen hücrelerin yüzeye tutunması ve çoğalması için yüzeyin hidrofiliği oldukça kritiktir. Biyouyumlu malzemelerde yüzey, her zaman hücre tutunmasına elverişli olmasa da bu malzemeler, çeşitli yüzey modifikasyonları ile hücreler için optimum hale getirilebilir. Bu tez çalışması kapsamında, epitelyal hücre kültüründe kullanılmak üzere üretilen PHI20 jel membranları, temas açısı analizlerine bakıldığında da görüleceği üzere oldukça hidrofilik özellik göstermektedir. Birçok çip üstü organ platformunda, özellikle sistemin mekanik stres uygulamasına elverişli hale getirilmesi ve görüntülemenin iyileştirilmesi amacıyla kullanılan PDMS polimeri ile karşılaştırıldığında hücre tutunmasına çok daha uygun bir yüzeye sahiptir. Buna rağmen, yapılan tutunma denemesinde farklı proteinler ile yüzey kaplaması yapılmış olan PHI20 jel membranlar üzerindeki hücre tutunması, kaplamasız olanlara göre daha iyi sonuç vermiştir. PDMS membranlar ile yapılan çalışmalarda genellikle fibronektin kaplama metodu kullanılmasına rağmen

PHI20 jeller üzerinde protein kokteyli ile kaplama yapılması daha iyi sonuç vermiştir (Huh vd., 2010; Stucki vd., 2015).

Degradasyon analizi sonucunda, üretilen PHI20 jel membranların, 7 gün boyunca 37 °C’de DMEM F12 besin ortamında tutulduğunda, biyolojik olarak oldukça az miktarda (%2) parçalandığı görülmüştür. Doku mühendisliği uygulamalarında biyobozunurluk önemli bir kriter iken *in vitro* çip üstü organ sistemlerinde uzun ömürlü hücre kültürlerinin oluşturulabilmesi için düşük degradasyon yüzdesi daha etkilidir. Saygili ve diğerleri (2021), kıkırdak doku onarımını indükleyen bir implant olarak kullanılması için TGF- β 3 yüklü nanopartiküller içeren hidrojelleri geliştirmiş ve bu hidrojellerin biyobozunurluk analizlerini gerçekleştirmişlerdir. TGF- β 3 içeren nanopartiküllerin zamanla yavaş salınımını hedefleyen grup, jellerin ilk hafta içerisinde %15 degradasyon gösterdiğini ve bu değerin kıkırdak yenilenmesi ile tutarlı olduğunu belirtmiştir. Bir diğer çalışmada ise, kalp doku mühendisliğinde kullanılmak üzere geliştirilen yamaların, ilk 5 günde %30-40 oranında biyobozunurluk gösterdiği ve kalp doku mühendisliğinde kullanım için oldukça elverişli olduğu belirtilmiştir (Sayed vd., 2019).

Geleneksel hücre kültürü yöntemleri, hücreleri kesme gerilimi, gerinim/sıkıştırma, spesifik boyutlu ve geometrik nanoyapılar dahil olmak üzere fizyolojik mekanik sinyallere maruz bırakmaz. Bu sinyaller, hücre proliferasyonun yanı sıra, 2 boyutlu modellerde eksik olan doku morfogenezinden organ gelişimine kadar olan fizyolojik süreçlerde yer alır (Mousavi ve Hamdy, 2015). Bu nedenle hücrelerin bulunduğu mikroçevrede maruz kaldıkları mekanik koşulların *in vitro* kültürlerde de sağlanması elzemdir. Bu tez çalışması kapsamında Arduino ve servo motor temelli olarak geliştirilen mekanik stres (çekme) sistemi, alveollerdeki nefes alıp verme mekanizmasını taklit etmek için tasarlanmıştır. Halihazırda bulunan diğer çalışmaların aksine, membranlara vakum uygulanması ile değil, çipin bir bütün olarak aksiyal şekilde çekilmesi prensibine dayandırılmıştır (Stucki vd., 2015; Zamprogno vd., 2021). Servo motorların dönme açısı ve süresi değiştirilerek elde edilmek istenen gerinim değerine göre ayarlama yapılması avantaj sunar. Böylelikle farklı mekanik stres uygulamalarının araştırılması için elverişli bir sistem oluşturmaktadır.

Statik, dinamik ve DMS koşulları için canlılık analizleri karşılaştırıldığında, statik koşullarda silikalı ve silikasız koşullarda %canlılık değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bunun sebebinin, statik koşullarda herhangi bir mekanik gerilme veya besin ortamı sirkülasyonu bulunmadığından silika partiküllerinin hücreler arasına iyi penetre olamadığı, dolayısıyla da kontrol grubu ile anlamlı bir fark oluşmadığı düşünülebilir. Dinamik koşullar değerlendirildiğinde, statik koşullarda olduğu gibi kontrol grubu ile silika uygulanan grup arasında anlamlı bir fark görülmemektedir.

İmmüno Floresan görüntüleme ile de desteklenerek, statik koşulların aksine besin ortamı sirkülasyonu olan bu grupta da benzer bir tablo görülmesini ancak DMS koşullarındaki gruplar ile anlamlı farklar oluşmasını mekanik stres varlığı ile ilişkilendirmek mümkündür. Her bir hücreyi birer mekanosensör olarak tanımlayan Ingber (2018), hücrelerin maruz kaldıkları mekanik kuvvetler sebebiyle farklı sinyal yollarını etkinleştirebildiklerini ve bu değişimin kimi zaman apoptoza neden olurken kimi zaman ise hücre büyümesini indükleyebileceğini belirtmiştir. Bunu, bir molekülün fiziksel olarak bozulmasının, onun şeklini ve kimyasal aktivitelerini (bağlanma kinetiği, termodinamiği vs.) değiştireceği ve dolayısıyla hücre içi biyokimyanın ve gen ekspresyonunun değişeceği yaklaşımı üzerinden açıklamaktadır. Bu yaklaşımdan yola çıkılarak, DMS koşullarının hücre proliferasyonunu ve silikanın etkinliğini arttırmış olabileceği sonucuna varmak mümkündür.

İmmüno Floresan boyama görüntüleri değerlendirildiğinde, mekanik stres uygulanan silikalı örneklerde kontrol gruplarıyla kıyaslandığında gözle görülür bir deformasyon olduğu, mekanik stres uygulandığında akciğer epitel hücrelerin deforme olduğu ve çekirdek yapısının bozulduğu görülmektedir. Statik koşullarda tutulan çiplerde silikalı ve silikasız koşullarda morfolojik olarak fark görülmemekle birlikte, dinamik ve DMS ortam koşullarında tutulan örneklerde fark görülmüştür. Buradan, mekanik stresin silika parçacıklarının penetrasyonunu arttırdığı ve hücre yapısına daha çok zarar vermelerine sebep olduğu çıkarımı yapılabilir. Huh ve diğerleri (2010), oluşturdukları çip üstü akciğer platformunda mekanik stres varlığında ortama polistiren nanopartikülleri ekleyerek hücrelerin partikül alımını incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, %10 gerilim uygulandığında, hiç gerilim uygulanmayan statik koşullara göre, 100 nm polistiren nanopartiküllerin hücresel alımını arttırdığını göstermiştir.

Silika nanopartiküllerinin havayolu hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi LDH aktivitesi ile analiz edildiğinde, DMS koşulları altında kültive edilen hücrelerin dinamik ve statik koşullardaki kültürlerle kıyasla daha fazla etkilendiği ve LDH salınımının indüklendiği görülmektedir. Donkers ve diğerleri (2022), bağırsak ve akciğer epitel hücreleri ile oluşturdukları iki farklı bariyeri temsil eden çipler üzerinde, çevre kirliliği nedeniyle maruz kaldığımız birçok farklı mikro/nanopartikülün etkisini incelemiştir. 96 saat süreyle oluşturdukları kültürlerde sitotoksikite miktarı değişse de bu tür partiküllere maruziyetin sitotoksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Kullanılan çip üstü akciğer platformunda mekanik stresin taklit edilmediği koşullarda mikro/nanopartikül varlığı %5-10 aralığında sitotoksik etki göstermiştir.

TNF- α , hücre apoptozunu ve proliferasyonunu aynı anda düzenleyen sinyal yollarına sahip bir sitokindir (Lai vd., 2019). Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen platformda, bir proinflatuar markör olan TNF- α

salınımının dinamik ve DMS koşullarında karşılaştırılmasıyla, her iki koşulda da silika varlığının TNF- α salınımını indüklediği gözlenmiştir. DMS koşullarında dinamik koşullara kıyasla daha az TNF- α salınımı olduğu görülmüştür. Donkers ve diğerlerinin (2022) çalışmasında, akciğer epitel hücrelerinin partiküllere karşı oluşturduğu proinflamatuvar yanıt, TNF- α 'ya benzer şekilde bir proinflamatuvar sitokin olan IL-6 sekresyonu üzerinden analiz edilmiş ve partikül türüne göre varyasyonlu olmakla beraber, naylon partiküllerinin varlığında yaklaşık 200 pg/mL konsantrasyonda IL-6 salınımı olduğu görülmüştür. Ricard ve diğerlerinin (2001), yüksek miktarda mekanik esneme sırasında akciğerlerdeki proinflamatuvar sitokin üretimini *in vivo* olarak inceledikleri çalışmada ise, yüksek miktarda mekanik ventilasyonun kendi başına, izole edilmiş sıçan akciğerlerinin hava boşluklarına proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ve IL-1 β) salınımına neden olmadığını belirtmiştir. Yüksek ventilasyon koşulları ile birlikte pulmoner ödem oluşumu durumunda da hayvanların akciğerlerindeki hava boşluklarında veya sistemik dolaşımında TNF- α sitokini üretimi görülmediği bildirilmiştir. Bu durumda, mekanik stres varlığının proinflamatuvar yanıtı indükleyici özellik taşımadığını söylemek mümkündür.

6. ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, daha önce hücre kültürü sistemlerinde kullanılmamış olan PHI20 jel membranları ile oluşturulmuş olan bir çip üstü alveol platformu geliştirilmiş ve bu platformda, nefes alıp verme mekanizması nedeniyle hava-sıvı arayüzeyinde bulunan akciğer epitel hücrelerinin maruz kaldığı mekanik stresin taklit edilebilmesini sağlamak amacıyla Arduino tabanlı bir sistem geliştirilmiştir. Çevresel kirleticilerin epitelyal bariyer disfonksiyonu üzerindeki etkisinin çipte oluşturulabilmesi için, Calu-3 hücreleri, PM2.5 temsilen 800 µg/mL konsantrasyonda silika partiküllerine maruz bırakılmıştır. Epitelyal bariyer disfonksiyonunun daha iyi incelenmesi için sistemin, alveolar epitel hücreler (tip 1, tip 2), makrofajlar ve kılcal damarı temsilen vasküler endotelyal hücreler ile oluşturulması daha etkili olacaktır. Hala geliştirilmesi gereken birçok yönü olsa da alınan sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda geliştirilen sistemin daha farklı uygulamalara adapte edilmesi sağlanabilir. Örneğin, pre-klinik uygulamalarda kullanılmak üzere akciğere spesifik bir ilaç etken maddesinin hastalıklı ve sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi ve oluşan immünolojik yanıt gerçek zamanlı olarak çalışılabilir. Çip üstü insan platformlarına entegre edilmesiyle birlikte çoklu organ etkileşimlerinin gözlemlenmesi için bir araç olabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agmon, G., & Christman, K. L.** (2016). Controlling stem cell behavior with decellularized extracellular matrix scaffolds. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 20(4), 193-201.
- Airways and Lungs,** Erişim Adresi: https://www.amboss.com/us/knowledge/Airways_and_lungs , Erişim Tarihi: 7 Aralık 2022
- Alraiyes, A. H., Thompson, P., & Thammasitboon, S.** (2011). Biot's Respiration In A Chronic Opioid User: Improved With Adaptive-Servo Ventilation. In C76. CONTROL OF VENTILATION AND RESPIRATORY MUSCLES (pp. A5279-A5279). American Thoracic Society.
- Avci, H., Dogan Güzel, F., Erol, S., & Akpek, A.,** 2018a, Recent advances in organ-on-a-chip technologies and future challenges: a review. *Turkish Journal of Chemistry*, 42(3).
- Benam, K. H., Villenave, R., Lucchesi, C., Varone, A., Hubeau, C., Lee, H. H., ... & Ingber, D. E.** (2016). Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro. *Nature methods*, 13(2), 151-157.
- Bhatia, S. N., & Ingber, D. E.** (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology*, 32(8), 760-772.
- Casquillasorgans, G. V., Mauriac, H., Pannetier, C.,** 2017, Organs On Chip 2017, Erişim adresi: <https://www.elveflow.com/organs-on-chip/organs-chip-review/> (Erişim Tarihi: 21.11.2022)
- Chambers, R. C., & Mercer, P. F.** (2015). Mechanisms of alveolar epithelial injury, repair, and fibrosis. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(Supplement 1), S16-S20.
- Cooper, D. M., & Loxham, M.** (2019). Particulate matter and the airway epithelium: the special case of the underground?. *European Respiratory Review*, 28(153).
- Çipte Organlar,** 2016, Makina Mühendisleri Odası, Mühendis ve Makina Dergisi, Cilt: 57, Sayı: 680, Erişim Adresi: http://www1.mmo.org.tr/resimler/dosya_ekler/812c81e9e709a24_ek.pdf?dergi=1715
- de Mello, C. P. P., Carmona-Moran, C., McAleer, C. W., Perez, J., Coln, E. A., Long, C. J., ... & Hickman, J. J.** (2020). Microphysiological heart–liver body-on-a-chip system with a skin mimic for evaluating topical drug delivery. *Lab on a Chip*, 20(4), 749-759.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Dellaquila, A.**, 2017, Comparison Between Organ-on-chip and standard in vitro and in vivo systems for drug testing. Erişim adresi: <https://www.elveflow.com/organs-on-chip/organs-chip-review/organ-on-chip-in-vitro-and-in-vivo-systems-drug-testing/> (Erişim Tarihi: 8 Kasım 2022)
- Devamoglu, U., Duman, I., Saygili, E., & Yesil-Celiktas, O.** (2021). Development of an integrated optical sensor for determination of β -hydroxybutyrate within the microplatform. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(9), 2759-2768.
- Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J., & Whitesides, G. M.** (1998). Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Analytical chemistry*, 70(23), 4974-4984.
- Donkers, J. M., Höppener, E. M., Grigoriev, I., Will, L., Melgert, B. N., van der Zaan, B., ... & Kooter, I. M.** (2022). Advanced epithelial lung and gut barrier models demonstrate passage of microplastic particles. *Microplastics and Nanoplastics*, 2(1), 1-18.
- Egawa, G., & Kabashima, K.** (2018). Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allergy international*, 67(1), 3-11.
- Functions of the Respiratory Portion.** <https://www.histology.leeds.ac.uk/respiratory/respiratory.php>. Erişim Tarihi: 5 Aralık 2022.
- Georas, S. N., & Rezaee, F.** (2014). Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *Journal of allergy and clinical immunology*, 134(3), 509-520.
- Ghio, A. J., Carraway, M. S., & Madden, M. C.** (2012). Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 15(1), 1-21.
- Guillot, L., Nathan, N., Tabary, O., Thouvenin, G., Le Rouzic, P., Corvol, H., ... & Clement, A.** (2013). Alveolar epithelial cells: master regulators of lung homeostasis. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(11), 2568-2573.
- Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E.** (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology*, 21(12), 745-754.
- Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., & Ingber, D. E.** (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 328(5986), 1662-1668.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ingber, D. E.** (2018). From mechanobiology to developmentally inspired engineering. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1759), 20170323.
- Jain, A., Barrile, R., van der Meer, A. D., Mammoto, A., Mammoto, T., De Ceunynck, K., ... & Ingber, D. E.** (2018). Primary human lung alveolus-on-a-chip model of intravascular thrombosis for assessment of therapeutics. *Clinical pharmacology & therapeutics*, 103(2), 332-340.
- Kim, S. Y., & Moon, A.** (2012). Drug-induced nephrotoxicity and its biomarkers. *Biomolecules & therapeutics*, 20(3), 268.
- Knudsen, L., & Ochs, M.** (2018). The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochemistry and cell biology*, 150(6), 661-676.
- Lai, W. Y., Wang, J. W., Huang, B. T., Lin, E. P., & Yang, P. C.** (2019). A Novel TNF- α -Targeting Aptamer for TNF- α -Mediated Acute Lung Injury and Acute Liver Failure. *Theranostics*, 9(6), 1741–1751. <https://doi.org/10.7150/thno.30972>
- Latvala, S., Hedberg, J., Möller, L., Odnevall Wallinder, I., Karlsson, H. L., & Elihn, K.** (2016). Optimization of an air–liquid interface exposure system for assessing toxicity of airborne nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 36(10), 1294-1301.
- Liu, Y. W., Wang, P., Wang, J., Xu, B., Xu, J., Yuan, J. G., ... & Wang, Q.** (2020). Transparent and tough poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels prepared in water/IL mixtures. *New Journal of Chemistry*, 44(10), 4092-4098.
- Loxham, M., & Davies, D. E.** (2017). Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(6), 1736-1751.
- Maschmeyer, I., Lorenz, A. K., Schimek, K., Hasenberg, T., Ramme, A. P., Hübner, J., ... & Marx, U.** (2015). A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab on a Chip*, 15(12), 2688-2699.
- Miller, P. G., & Shuler, M. L.** (2016). Design and demonstration of a pumpless 14 compartment microphysiological system. *Biotechnology and bioengineering*, 113(10), 2213-2227.
- Moens, E., & Veldhoen, M.** (2012). Epithelial barrier biology: good fences make good neighbours. *Immunology*, 135(1), 1-8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Mortalite Verileri 1999-2020**, CDC WONDER (2021). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi. Ulusal Hayati İstatistik Sistemi, <http://wonder.cdc.gov/ucd-icd10.html> Erişim Tarihi: 10 Aralık 2022
- Mousavi, S. J., & Hamdy Doweidar, M.** (2015). Role of mechanical cues in cell differentiation and proliferation: a 3D numerical model. *PloS one*, 10(5), e0124529.
- Nalayanda, D. D., Puleo, C., Fulton, W. B., Sharpe, L. M., Wang, T. H., & Abdullah, F.** (2009). An open-access microfluidic model for lung-specific functional studies at an air-liquid interface. *Biomedical microdevices*, 11, 1081-1089.
- Notter, R. H.** (2000). *Lung surfactants: basic science and clinical applications*. CRC Press.
- Rehman, S., & Bacha, D.** (2019). *Embryology, pulmonary*.
- Reid, A. T., Sutanto, E. N., Chander-Veerati, P., Looi, K., Li, N. F., & Iosifidis, T.** (2019). Chapter 3: Ground Zero—the Airway Epithelium. *Rhinovirus Infections*.
- Reuter, S., Moser, C., & Baack, M.** (2014). Respiratory distress in the newborn. *Pediatrics in review*, 35(10), 417.
- Ricard, J. D., DREYFUSS, D., & Saumon, G.** (2001). Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 163(5), 1176-1180.
- Roan, E., & Waters, C. M.** (2011). What do we know about mechanical strain in lung alveoli?. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(5), L625-L635.
- Sayed, M. M., Mousa, H. M., El-Aassar, M. R., El-Deeb, N. M., Ghazaly, N. M., Dewidar, M. M., & Abdal-hay, A.** (2019). Enhancing mechanical and biodegradation properties of polyvinyl alcohol/silk fibroin nanofibers composite patches for Cardiac Tissue Engineering. *Materials Letters*, 255, 126510.
- Saygili, E., Kaya, E., Ilhan-Ayisigi, E., Saglam-Metiner, P., Alarcin, E., Kazan, A., ... & Yesil-Celiktas, O.** (2021). An alginate-poly (acrylamide) hydrogel with TGF- β 3 loaded nanoparticles for cartilage repair: Biodegradability, biocompatibility and protein adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, 381-393.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Sellgren, K. L., Butala, E. J., Gilmour, B. P., Randell, S. H., & Grego, S. (2014).** A biomimetic multicellular model of the airways using primary human cells. *Lab on a Chip*, 14(17), 3349-3358.
- Sözener, Z. C., Cevhertas, L., Nadeau, K., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2020).** Environmental factors in epithelial barrier dysfunction. *Journal of allergy and clinical immunology*, 145(6), 1517-1528.
- Stucki, A. O., Stucki, J. D., Hall, S. R., Felder, M., Mermoud, Y., Schmid, R. A., ... & Guenat, O. T. (2015).** A lung-on-a-chip array with an integrated bio-inspired respiration mechanism. *Lab on a Chip*, 15(5), 1302-1310.
- Sung, J. H., Kam, C., Shuler, M. L., 2010,** A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip. *Lab on a Chip* 10(4): 446-455.
- Yeşil-Çeliktaş, Ö. (Ed.), 2016),** Mikroakışkan Teknolojilerin Temelleri ve Uygulamaları, Ege Üniversitesi Yayınları, 177-180.
- Zamprogn, P., Wüthrich, S., Achenbach, S., Thoma, G., Stucki, J. D., Hobi, N., ... & Guenat, O. T. (2021).** Second-generation lung-on-a-chip with an array of stretchable alveoli made with a biological membrane. *Communications biology*, 4(1), 1-10.
- Weibel, D. B., & Whitesides, G. M. (2006).** Applications of microfluidics in chemical biology. *Current opinion in chemical biology*, 10(6), 584-591.
- Whitesides, G. M. (2006).** The origins and the future of microfluidics. *nature*, 442(7101), 368-373.
- Whitsett, J. A., & Weaver, T. E. (2015).** Alveolar development and disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 53(1), 1-7.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimi tamamlarken, başta, lisans hayatımdan beri bir parçası olduğum Biyomimetik Mikrosistemler Laboratuvarı içerisinde geçen 5 yılım boyunca hem akademik hem de manevi anlamda bana yol gösterici olan, beni dinleyen, fırsat tanıyan değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a, 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı'na dahil olma fırsatını vererek yüksek lisans eğitimimi destekleyen TÜBİTAK'a, üniversiteye adım attığım ilk günden beri hep yoldaşım olan, desteğini benden hiç esirgemeyen can dostum Utku DEVAMOĞLU'na, ne zaman ve hangi konuda olursa olsun danıştığımda özveriyle yanımda olan sevgili arkadaşım Dr. Ecem SAYGILI'ya, Biyomimetik Mikrosistemler Laboratuvarı içerisinde hep birlikte uyum içinde çalışmış olmaktan mutluluk duyduğum başta Göze BECEREN ve Sena YANAŞIK olmak üzere tüm sevgili ekip arkadaşlarıma, varlığıyla bana güç veren, beni hep motive eden ve en önemli manevi destekçilerimden olan Suat ÖZYEŞİLOVA'ya, bu hayattaki en büyük şansım ve güç kaynağım olan, ne olursa olsun yanımda olup maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

31/01/2023

İmzası

Bilgesu KAYA

ÖZGEÇMİŞ

Bilgesu KAYA

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans (2019 – 2023)	Ege Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü - Biyomühendislik Anabilim Dalı (İzmir, Türkiye)
Lisans (2015 - 2019)	Ege Üniversitesi - Mühendislik Fakültesi - Biyomühendislik Bölümü (İzmir, Türkiye)
Lise (2011 - 2015)	Bursa Erkek Anadolu Lisesi (Bursa, Türkiye)

PROFESYONEL DENEYİM

Kasım 2021 - Aralık 2022	Klinik Araştırma Saha Koordinatörü/ATLAS CRO LTD. ŞTİ. (İzmir, Türkiye)
Mayıs 2019 - Mayıs 2022 (İzmir, Türkiye)	Kurucu Ortak/SPECTRON LTD. ŞTİ.

STAJ DENEYİMİ

Temmuz - Eylül 2018	Zorunlu Staj/Teesside University, School of Health and Social Care (İzmir, Türkiye)
Temmuz - Eylül 2017	Gönüllü Stajyer/Ege Üniversitesi, Doğal Ürün Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı (İzmir, Türkiye)

ARAŞTIRMA DENEYİMİ

Lisans Bitirme Tezi	Çip-Üstü-Akciğer Sistemleri İçin Platform Tasarımlarının Geliştirilmesi
----------------------------	--

PROJELER, ÖDÜLLER & YARIŞMALAR

Nisan 2020	Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı (TÜBİTAK 2210-C)
Haziran 2019	Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Yarışması/Bölge Sergileri (TÜBİTAK 2242)

Mayıs 2019

Giriřimcilik Destek Programı (TÜBİTAK
1512)

Mart 2019

Avrupa BEST Mühendislik Yarışması
(EBEC)/Bölge İkinciliğı

