



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**İLAC PERMEABİLİTESİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO* KAN BEYİN BARIYERİ MODELLERİNDE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Barış GÜLİÇLİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

**İzmir
2023**

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**İLAC PERMEABİLİTESİNİN *IN VITRO* VE *IN*
SILICO KAN BEYİN BARIYERİ MODELLERİNDE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Barış GÜLİÇLİ

Danışman: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Barış GÜLİÇLİ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “İlaç Permeabilitesinin *in vitro* ve *in silico* Kan Beyin Bariyeri Modellerinde Karşılaştırılması” 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 vetarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :
Raportör Üye :
Üye :

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “İlaç Permeabilitesinin *in vitro* ve *in silico* Kan Beyin Bariyeri Modellerinde Karşılaştırılması” 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 / 03 / 2023

İmzası

Barış GÜLİÇLİ

ÖZET**İLAÇ PERMEABİLİTESİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO* KAN BEYİN BARIYERİ MODELLERİNDE KARŞILAŞTIRILMASI****GÜLİÇLİ, Barış****Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı****Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR****Ocak 2023, 109 sayfa****Anahtar sözcükler:** Kan Beyin Bariyeri, *in silico* model, *in vitro* model, geçirgenlik

Kan beyin bariyeri (KBB), beyni potansiyel olarak toksik metabolitlere karşı koruyan, beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin kılcal damarlarda oluşturduğu sıkı ve aderens bağlantılardan oluşan koruyucu bir yapıdır. Bu yapı ilaçların merkezi sinir sistemine (CNS) taşınmasında da büyük bir engel teşkil etmektedir. Merkezi sinir sistemi, uyku indükleyiciler, sedatifler, anti-psikotikler ve epileptikler gibi birçok ilaç sınıfının yanı sıra anti-inflamatuar ve nöro-rejeneratif ilaçlar için önemli bir hedeftir. Bu nedenle, KBB geçirgenliğini klinik çalışmalara geçmeden önce tahmin etmek için güvenilir deneysel modeller geliştirmeye ihtiyaç vardır. KBB'yi modellemek ve ilaç geçirgenliğini belirlemek için kullanılan *in vivo* hayvan modelleri altın standart olarak kabul edilse de, hayvan modellerinde başarılı ilaç adaylarının %80'i klinik deneylerde başarısız olur. Bunun, hayvan modellerinin insan fizyolojisine tam olarak uymamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, insan hücrelerine dayalı güvenilir *in vitro* ve *in silico* KBB modellerine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada, insan beyin endotel hücreleri (HBEC-5i) ile *in vitro* KBB modeli geliştirilmiştir. Ayrıca, makine öğrenimi bazlı *in silico* KBB modelleri geliştirilmiştir. Modeller birbirleri ile permeabilite tahminlemesi üzerinden karşılaştırılarak avantaj ve dezavantajları ortaya koyulmuştur. *In vitro* ve *in silico* modellerinin birlikte kullanımının *in vivo* denemelere karşı iyi bir alternatif olacağı önerilmektedir. Elde edilen permeabilite deney prosedürü ile klinik deneylerde başarı oranının arttırılması öngörülmüştür.

ABSTRACT
COMPARISON OF DRUG PERMEABILITY IN *IN VITRO* AND *IN SILICO* BLOOD BRAIN BARRIER MODELS

GÜLİÇLİ, Barış

MSc in Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aylin ŞENDEMİR

January 2023, 109 pages

Keywords: Blood Brain Barrier, *in silico* model, *in vitro* model, permeability

The blood brain barrier (BBB) is a protective structure that shields the brain against potentially toxic metabolites, which is composed of tight and adherens junctions formed by the brain microvascular endothelial cells in the capillaries. This structure poses a major obstacle for delivery of drugs to the central nervous system (CNS). The central nervous system is an important target for many classes of drugs, such as sleep inducers, sedatives, anti-psychotics, and epileptics, as well as anti-inflammatory and neuro-regenerative medications. Therefore, there is a need to develop reliable experimental models for predicting BBB permeability. Although *in vivo* animal models used to model BBB and determine drug permeability are considered the gold standard, 80% of successful drug candidates in animal models fail in clinical trials. This is thought to be due to the inability of animal models to fully match human physiology. Thus, there is an imminent need for reliable *in vitro* and *in silico* BBB models based on human cells.

In this study, an *in vitro* BBB model was developed with human brain endothelial cells (HBEC-5i). In addition, machine learning-based *in silico* KBB models have been developed. The advantages and disadvantages are revealed by comparing the models with each other on the basis of permeability prediction. The combined use of the two models is presented as a good alternative to *in vivo* trials. With the obtained permeability test procedure, it is anticipated to increase the success rate in clinical trials.

ÖNSÖZ

Kan Beyin Bariyeri merkezi sinir sistemini diğer dokulardan ayıran ve homeostazını koruyan seçici bir bariyerdir. Bu bariyer birçok merkezi sinir sistemi hastalığı ile ilişkilendirilmiş, kritik öneme sahip en özelleşmiş dokularımızdan biridir. Ayrıca merkezi sinir sistemini hedefleyen ilaç için geçilmesi gereken bir bariyerdir. Kan Beyin Bariyeri *in vivo*, *in vitro* ve *in silico* modellenerek çeşitli ilaçların geçişi, doku fizyolojisinin anlaşılması, beyin metastazı vb. alanlarında çalışmalar yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasının başarılı bir şekilde sonuçlanması ile kan beyin bariyeri permeabilitesinin geliştirilen dinamik *in vitro* ve makine öğrenimi temelli *in silico* modellerin birlikte kullanımıyla yüksek doğrulukta düşük maliyetlerle belirlenmesi esas amacım olmuştur. Özellikle *in silico* modelin bize getirdiği yüksek hız ve düşük maliyet ve dinamik *in vitro* modelin permeabilite tahminlemesi dışında fizyolojik koşulları en iyi şekilde modelleyerek merkezi sinir sistemi hastalıklarını da birlikte modelleme imkânı sunup tam bir hastalık fizyolojisi modeline ulaşabilme kapasitesi bu çalışmayı yaparkenki motivasyonum olmuştur.

İZMİR

31/03/2023

BARIŞ GÜLİÇLİ

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| İÇİNDEKİLER | xiii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xvi |
| TABLolar DİZİNİ | xxi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xxiv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Kan Beyin Bariyeri..... | 3 |
| 2.2. KBB Geçiş Mekanizmaları | 5 |
| 2.3. <i>in vivo</i> KBB Modelleri..... | 9 |
| 2.4. <i>In vitro</i> KBB modelleri | 11 |
| 2.4.1. Statik KBB modelleri | 11 |
| 2.4.2. Dinamik KBB modelleri | 12 |
| 2.5. Membranlı Mikroakışkan Sistemler | 13 |
| 2.5.1. PDMS..... | 14 |
| 2.5.2. Bakteriyel Selüloz Membranlar | 15 |
| 2.5.3. Elektroğirilmiş Membranlar | 16 |
| 2.6. <i>In silico</i> KBB Modelleri | 17 |
| 2.6.1. Hesaplamalı Modeller | 17 |
| 2.6.2. Makine Öğrenimli KBB modelleri..... | 17 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 22 |
| 3.1. Çalışma Tasarımı | 22 |
| 3.2. Gereç..... | 22 |
| 3.3. Yöntem | 24 |
| 3.3.1 Hücre kültürü | 24 |
| 3.3.2 Doku iskelesinin üretimi | 27 |
| 3.3.3 Statik <i>in vitro</i> KBB modelinin geliştirilmesi..... | 31 |
| 3.3.4 Bilgisayarlı akışkanlar dinamiği ile fizyolojik koşullara uygun mikroakışkan platformun modellenmesi, simülasyonu ve üretimi | 32 |
| 3.3.5 Dinamik <i>in vitro</i> KBB modelinin geliştirilmesi..... | 36 |
| 3.3.6 <i>in silico</i> KBB modelinin geliştirilmesi..... | 37 |

| | |
|---|----|
| 3.3.7. Geliştirilen Modellerin Karşılaştırılması..... | 39 |
| 4. BULGULAR..... | 40 |
| 4.1. Hücre kültürü..... | 40 |
| 4.2. Doku İskelesi Üretimi | 40 |
| 4.2.1. Elektroēgrilmiş PCL membran üretimi ve por optimizasyonu | 40 |
| 4.2.2. Bakteriyel selüloz membran üretimi ve por optimizasyonu | 45 |
| 4.3. Statik <i>in vitro</i> KBB modelinin Geliştirilmesi | 50 |
| 4.4. Bilgisayarlı Akışkanlar Dinamiēi ile Fizyolojik Koşulara Uygun Mikroakışkan Platformun Modellenmesi ve Üretimi | 51 |
| 4.4.1. Mikroakışkan platformun modellenmesi ve tasarımı..... | 51 |
| 4.4.2. Comsol multiphysics yazılımı ile akışın simülasyonu, optimum çip-üstü platform boyutların belirlenmesi ve dinamik akış modelinin optimizasyonu | 52 |
| 4.4.3. Geometri optimizasyonu için gerçekleştirilen simülasyon | 53 |
| 4.4.4. Akış parametrelerinin optimizasyonu için gerçekleştirilen simülasyon | 57 |
| 4.5. 2B Simulasyonda Belirlenen Parametrelerin 3B Simülasyonda Deēerlendirilmesi..... | 59 |
| 4.6. Mikroakışkan Platformun Üretimi | 61 |
| 4.7. <i>In silico</i> KBB modelinin Geliştirilmesi..... | 64 |
| 4.7.1. Verilerin elde edilmesi ve işlenmesi..... | 64 |
| 4.7.2. Elde edilen verilerin eğitimi | 65 |
| 4.8. Geliştirilen Modellerin Karşılaştırılması..... | 77 |
| 4.8.1. Statik Modelde Monosit Geçişinin İncelenmesi | 77 |
| 5. TARTIŞMA..... | 86 |
| 5.1. Hücre Kültürü..... | 86 |
| 5.2. Doku İskelesi Üretimi | 87 |
| 5.3. Statik <i>in vitro</i> KBB Modelinin Geliştirilmesi..... | 88 |
| 5.5. Bilgisayarlı Akışkanlar Dinamiēi ile Fizyolojik Koşulara Uygun Mikroakışkan Platformun Modellenmesi ve Üretimi | 92 |
| 5.5.1. Mikroakışkan Platformun Modellenmesi..... | 92 |
| 5.5.2. Mikroakışkan Platformun Üretimi | 92 |
| 5.6. Dinamik <i>in vitro</i> KBB modelinin Geliştirilmesi | 92 |

| | |
|---|------------|
| 5.7. <i>In silico</i> KBB modelinin Geliştirilmesi | 93 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 94 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ | 95 |
| TEŞEKKÜR | 105 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 106 |
| EKLER..... | 0 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 1. Kan beyin bariyeri (KBB)'nin yapısı (Biorender ile oluşturulmuştur) | 4 |
| Şekil 2. KBB yüzey belirteçleri ve sıkı bağlantı proteinleri. (Biorender ile oluşturulmuştur)..... | 6 |
| Şekil 3. Bakteriyel selüloz membran görüntüsü | 16 |
| Şekil 4. Çalışma Akış Şeması..... | 22 |
| Şekil 5. Monosit geçişi deneysel prosedürünün grafiksel gösterimi | 26 |
| Şekil 6. PCL elektroçirme grafiksel gösterimi. | 28 |
| Şekil 7. Porlu PCL elektroçirme grafiksel gösterimi..... | 29 |
| Şekil 8. BS üretiminin grafiksel özeti. Glucanobacter xylinum HS ortamında çalkalayıcı inkübatörde aktifleştirilerek aktif kültür ile 250 mL'lik Erlen Mayer'e inoküle edilmiştir. 5 gün statik olarak kültüre edilerek üretilen membran yapıda BS Alkali yıkama ile bakterilerden arındırılarak otoklav ile sterilize edilmiştir..... | 30 |
| Şekil 9. Por yapıda BS üretiminin grafiksel özeti. Elektrospreyleme ile üretilen PCL mikroküreler hasat edilerek farklı konsantrasyonlarda K.Xylinus bakterisiyle kültive edilerek membranlar statik kültürde üretilmiştir. | 30 |
| Şekil 10. Por yapıda BS yıkama işleminin grafiksel özeti..... | 31 |
| Şekil 11. Statik KBB modeli oluşturulma basamakları | 31 |
| Şekil 12. PDMS bazlı mikroakışkan çip üretiminin gösterimi. 1) Comsol Multyphysics yazılımı kullanılarak akış parametrelerinin simülasyonu ve optimizasyonu ile çip geometrisinin belirlenmesi. Belirlenen geometrinin Cad yazılımları kalıplarının üretilmesi. Elde edilen çizimlerin baskıya hazır hale getirilmesi. 2) Kalıpların Formlabs 3B reçine printeri kullanılarak üretimi. Üretilen kalıpların reçineden uzaklaştırılması için izopropil alkol ile 60 dakika boyunca yıkanması. Son kürleme işlemi için 60 dakika boyunca UV ışık ile kürlenmesi. 3) Üretilen kalıplara PDMS dökülere 80 °C'de ısı olarak tavlama. Üretilen PDMS plakaların membrana ve birbieine yapıştırılması. 4) Elde edilen mikroakışkan platforma akış uygulanması..... | 32 |
| Şekil 13. Comsol Multyphysics ile geometri parametreleri ve optimizasyonu. | 34 |
| Şekil 14. Çiplerin temizlenmesi: çipler sırasıyla isopropil alkol, etanol ve su yıkamalarına maruz bırakılarak kirlilikler ve kalıntılar uzaklaştırılmıştır..... | 36 |

| | |
|--|----|
| Şekil 15. Sızdırmazlık denemesi; 5 gün akışta bırakılan çipte bir sızıntı gözlemlenmemiştir..... | 36 |
| Şekil 16. <i>In silico</i> modelin geliştirilmesinde izlenen adımlar..... | 37 |
| Şekil 17. Elde edilen 3'lü confusion matrix'lerin gösterimi. A) Modelin Tanımsız olarak belirlediği grubun gösterimidir. B) Modelin tanımsız olarak belirlemesi gereken grubun gösterimidir. C) Modelin yaptığı doğru tanımlamaların gösterimidir. D) Modelin yaptığı yanlış tanımlamaların gösterimidir. | 38 |
| Şekil 18. Elde edilen 2'li confusion matrix'lerin gösterimi şekilde mavi alan doğru tahminleri beyaz alan ise yanlış tahminlerin gösterimidir. | 39 |
| Şekil 19. Kullanılan morfolojilerinin ışık mikroskopunda gösterimi. Ölçek çizgisi SHSY-5Y hücrelerinde 200 diğer hücrelerde 100 µm'yi göstermektedir. | 40 |
| Şekil 20. Elektroğırme düzeneği ve membranların iskele tutuculara yerleştirilmesi. | 41 |
| Şekil 21. Elektroğırilmiş PCL membran SEM ile gösterimi..... | 45 |
| Şekil 22. BS üretim aşamaları a. Aşı kültürü b.7 günlük inkübasyon sonrası sıvı-hava arayüzeyinde oluşan bakteriyel selüloz..... | 45 |
| Şekil 23. Saflaştırma ve durulama sonrası BS membran..... | 46 |
| Şekil 24. Mikrokürelerin ışık mikroskopundaki görüntüleri. Mikrokürelerin ortalama çaplarının 15-30 µm arasında olduğu görülmektedir. Ölçek çizgisi 100 µm'yi göstermektedir. | 46 |
| Şekil 25. Mikrokürelerin SEM görüntüleri. Mikrokürelerin ortalama çaplarının 15-30 µm arasında olduğu görülmektedir. | 47 |
| Şekil 26. Elektrosprey yöntemiyle elde edilen mikrokürelerin partikül boyut dağılım grafiği. Mikrokürelerin partikül boyutu dağılımının 15-30 µm aralığında olduğu gösterilmiştir. | 47 |
| Şekil 27. Porlu BC membran üretim aşamaları. Membran halinde BS'lere entegre olmuş PCL mikroküreler görünmektedir. | 48 |
| Şekil 28. PCL mikrokürelili BS membranlar. A) $0,8 \times 10^4$ mikroküre/mL, B) $1,6 \times 10^4$ mikroküre/mL C) $3,2 \times 10^4$ mikroküre/mL. Membran halinde BS'lere entegre olmuş PCL mikroküreler görünmektedir. | 48 |
| Şekil 29. BS membranda PCL mikrokürelerin uzaklaştırılmasıyla oluşturulan por çaplarının dağılımı. Ortalama por çap boyutlarının 1-5 µm arasında olduğu görülmektedir. | 49 |

| | |
|---|----|
| Şekil 30. HUVEC hücreleri kullanılarak oluşturulan KBB modelinin IF görüntü boyamaları. Ölçek çizgisi 100 μm 'yi göstermektedir. | 50 |
| Şekil 31. HBEC-5i hücreleri kullanılarak oluşturulan KBB modelinin IF görüntü boyamaları. Ölçek çizgisi Claudin 4 için 200 Occludin ve Vimentin için 100 μm 'yi göstermektedir. | 51 |
| Şekil 32. Çip üstü platformun tasarımı. | 52 |
| Şekil 33. 2B Modelin tasarımı. Gösterilen değerler parametrik olarak girilerek optimizasyona imkan sağlamıştır. Nihai ürün boyutlarını yansıtmamaktadır. | 53 |
| Şekil 34. 3B modelin tasarımı. Gösterilen değerler parametrik olarak girilerek optimizasyona imkan sağlamıştır. Nihai ürün boyutlarını yansıtmamaktadır. | 53 |
| Şekil 35. Çip geliştirilmesinde kullanılan geometrik özellikler optimizasyon sonuçları (Devamı şekil 36)..... | 55 |
| Şekil 36. Çip geliştirilmesinde kullanılan geometrik özelliklerin optimizasyon sonuçları (Şekil 40'ın devamı) Şekil 39 te verilen tablo Monte Carlo metodu ile taranarak 1000'in üzerinde simülasyon yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar Objective sütununda bulunmaktadır. Diğer sütunlar da bu değere karşılık gelen parametreleri ifade etmektedir. | 56 |
| Şekil 37. Membranda oluşan ortalama basıncın belirlenmesi; hesaplamalar sonucunda ortalama basınç 1901.3 Pa olarak belirlenmiştir. | 59 |
| Şekil 38. Kanalın içerisindeki ortalama akış hızı hesaplamalar sonucunda 6.225 mm/s olarak belirlenmiştir. | 59 |
| Şekil 39. Kanalın içindeki akış hızının gösterimi. | 59 |
| Şekil 40. Kanalın içindeki basıncın gösterimi. | 60 |
| Şekil 41. Kanalın içindeki ve yüzeydeki kayma geriliminin gösterilmesi. | 60 |
| Şekil 42. Solidworks ile elde edilen kanalları içeren ve PDMS'i membran ile birlikte kurlenecek kalıp çizimlerinin gösterimi. | 61 |
| Şekil 43. 3 Boyutlu Baskı sonucu elde edilen kalıp ve ara bağıntıların gösterimi. Şekilde görülen pürüzler baskı sırasında kullanılan desteklerden kalan izlerdir. Kalıbın alt yüzeyinde bulunup çip kalitesini etkilememektedir. | 62 |
| Şekil 44. Kimyasal yapıştırma sürecinde membran sabitlenmesi mıknatıs yardımıyla kalıp ve membranı sıkıştıran parça sıkıştırılarak membranın PDMS'le birlikte kurlenmesine olanak verilmiştir. | 62 |

| | |
|--|----|
| Şekil 45. BS membranın çipe entegrasyonu. Membran kuyucuğun üzerinde görülmektedir; membran bir hasara uğramamıştır..... | 63 |
| Şekil 46. BS membranlı çipin bütün katmanlarının yapıştırılmış hali..... | 63 |
| Şekil 47. PDMS tabaka; kanal girintisi görülmektedir..... | 63 |
| Şekil 48. Ensemble-Subspace KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %94.2 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri..... | 67 |
| Şekil 49. SVM-Fine Gaussian makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %91.3 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri..... | 67 |
| Şekil 50. KNN-Fine KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %91.3 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri..... | 68 |
| Şekil 51. SVM-Fine Gaussian makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %87 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri..... | 70 |
| Şekil 52. SVM-Fine Gaussian makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %87 doğruluk elde etmiş modelin sırasıyla validasyon ve test doğru pozitif ve yanlış negatif matrisleri..... | 70 |
| Şekil 53. KNN-Fine KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %89.9 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri..... | 71 |
| Şekil 54. KNN-Fine KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %89.9 doğruluk elde etmiş modelin sırasıyla validasyon ve test doğru pozitif ve yanlış negatif matrisleri..... | 71 |
| Şekil 55. Ensemble-Subspace KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %95.7 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri..... | 73 |
| Şekil 56. Ensemble-Subspace KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %95.7 doğruluk elde etmiş modelin sırasıyla validasyon ve test doğru pozitif ve yanlış negatif matrisleri..... | 74 |
| Şekil 57. KNN-Weighted KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %97.1 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri..... | 74 |
| Şekil 58. KNN-Weighted KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %97.1 doğruluk elde etmiş modelin sırasıyla validasyon ve test doğru pozitif ve yanlış negatif matrisleri..... | 75 |

| | |
|--|----|
| Şekil 59. THP-1 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü, hücrelerin süspanse monositik yapıda olduğu görülmektedir. Ölçek çizgisi 50 μm 'yi göstermektedir | 77 |
| Şekil 60. Monosit migrasyon miktarının floresan yoğunluk grafiği. Monositlerin porsuz doğal BS membrandan geçmediği, porlu membrandan ise apoptotik hücre varlığında geçtiği, KBB modelinde ise bu geçişin kısmen sınırlandırıldığı görülmektedir. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$) | 80 |
| Şekil 61. Monosit migrasyon miktarının sayım grafiği. Monositlerin KBB oluşturulmuş porlu membrandan geçemediği ancak apoptotik hücre (AH) varlığında geçebildiği görülmektedir. (** $p<0,005$, *** $p<0,001$) | 82 |
| Şekil 62. Monosit migrasyon miktarının sayım grafiği. Monositlerin KBB oluşturulmuş porlu membrandan geçemediği ancak apoptotik hücre varlığında migre edebildiği görülmektedir. (*** $p<0,001$) | 84 |
| Şekil 63. Monosit migrasyon miktarının sayım grafiği. Monositlerin HBEC-5i kullanılarak yapılan KBB modelinde migrasyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir. (*** $p<0,001$) | 85 |
| Şekil 64. Hücre migrasyon testlerinin illüstrasyonu (Rumianek, and Greaves, 2020). | 90 |

TABLOLAR DİZİNİ

| <u>Tablo</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| Tablo 1. <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> KBB modellerinin karşılaştırılması..... | 11 |
| Tablo 2. PCL elektroğirmesinin optimizasyonunda kullanılan parametreler | 42 |
| Tablo 3. PCL por elektroğirme optimizasyonunda kullanılan parametreler..... | 43 |
| Tablo 4. PCL membranların doğal ve por oluşturulduktan sonraki SEM görüntüleri. | 44 |
| Tablo 5. BS membranların doğal ve por oluşturulduktan sonraki SEM görüntüleri. . | 49 |
| Tablo 6. Model optimizasyonunda kullanılan parametreler. v_0 :hız(m/s), eps_p:porozite, Cf:Sürtünme katsayısı, membw:membran kalınlığı(m), membl:membran uzunluğunu, cw:kanal kalınlığı(m), cl:kanal uzunluğu(m), vis: viskozite(Pa*s), memblg:kanal giriş uzunluğu(m), memblc:kanal çıkış uzunluğu'dur. Burada yer alan geometri değerleri optimizasyon sonucunda elde edilen değerleri temsil etmektedir. Ancak viskozite ve akış hızı değerleri nihai değerleri temsil etmemektedir..... | 54 |
| Tablo 7. Model optimizasyonunda kullanılan değişkenler. Amp: Ortalama membran basıncı (average membrane pressure), Ams: ortalama membran kayma gerilimi (Average membrane shear stress), Aah: ortalama akış hızı, Bgopt: optimizasyon formülü. Model optimizasyonunda bgopt değeri minimize edilmeye çalışılmıştır. 0'a yakın olması modelin doğruluğunu gösterir. Buradaki amp değeri kanalın içindeki ortalama basınç değerini, ams ve aah değerleri sırasıyla membran yüzeyindeki ortalama kayma gerilimi ve akış hızını göstermektedir. | 54 |
| Tablo 8. Modeldeki geometrik parametrelerin optimizasyonu. Kontrol değişkenleri ve parametreleri. Değişkenler "Lower bound" ve "Upper bound" arasında yazılımsal olarak değiştirilerek amaç parametresi hesaplanmaktadır. Minimum değer istenilen koşullara en yakın değeri temsil etmektedir. | 55 |
| Tablo 9. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen geometrik parametreler | 57 |
| Tablo 10. Modeldeki akış parametrelerinin optimizasyonu. Kontrol değişkenleri ve parametreleri. Başlangıç hız değeri 10 mm/s; viskozitesi 0.9 Pa*s olarak belirlenmiştir. Amaç fonksiyonu olarak aynı fonksiyon kullanılmıştır. | 58 |

| | |
|---|----|
| Tablo 11. Yapılan simülasyonlara karşılık gelen ortalama akış hızı basınç ve kayma gerilimi değerleri | 58 |
| Tablo 12. Akış parametrelerinin belirlenmesi amaç fonksiyonu sonuçları. Burada yapılan son simülasyon 2B model için optimum olarak belirlenmiştir. | 58 |
| Tablo 13. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda 2B simülasyonda belirlenen akış parametreleri..... | 58 |
| Tablo 14. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda 3B simülasyonda belirlenen parametreler | 60 |
| Tablo 15. PAMPA verileri ile yapılan KBB-, KBB+ ve Tanımsız verilere göre eğitilmiş modeller. Eğitim verisi 690 kimyasal içermekte olup çapraz katlama değeri 10'dur. Belirlenen 5 molekül özelliğine kullanılmıştır..... | 65 |
| Tablo 16. PAMPA verileri ile yapılan KBB- ve KBB+ verilere göre eğitilmiş modeller. Eğitim verisi 690 molekülü içermekte olup çapraz katlama değeri 10'dur. Belirlenen 5 molekül özelliğine kullanılmıştır. | 68 |
| Tablo 17. PAMPA verileri ile yapılan KBB-, KBB+ ve Tanımsız verilere göre eğitilmiş modeller. Eğitim verisi 690 kimyasal içermekte olup çapraz katlama değeri 5'dur. Belirlenen 5 molekül özelliğine kullanılmıştır..... | 71 |
| Tablo 18. PAMPA ve SwissADDme verileri ile yapılan KBB-, ve KBB+ verilere göre eğitilmiş modeller. Eğitim verisi 930 molekülü içermekte olup çapraz katlama değeri 25'tir. Belirlenen 5 molekül özelliğine kullanılmıştır. | 75 |
| Tablo 19. Doğal ve porlu membranlarda monosit geçişi..... | 78 |
| Tablo 20. Porlu BS membranda HBEC-5i hücreleri ile oluşturulan KBB modelinde monosit geçişinin incelenmesi..... | 79 |
| Tablo 21. Porlu PCL membranlardan HBEC-5i hücreleri ile oluşturulan KBB modellerinden ve sadece porlu PCL membrandan monosit geçişinin incelenmesi ve Imagej programı ile sayılması. | 81 |
| Tablo 22. Porlu PCL membranlardan HUVEC hücreleri ile oluşturulan KBB modellerinden monosit geçişinin incelenmesi ve Imagej programı ile sayılması | 83 |
| Tablo 23. Pubchem üzerinden elde edilen PAMPA analizi yapılmış moleküllerin modelde kullanılan fiziksel ve kimyasal özellikler. | 0 |
| Tablo 24. Boiledegg uygulamasının geliştirilmesinde kullanılan moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin Pubchem üzerinden çekilen verileri | 27 |

| | |
|---|----|
| Tablo 25. Boiledegg çalışması ve Pubchem üzerinden elde edilmiş PAMPA analizi yapılmış moleküllerin KBB+ ve KBB- olarak işaretlenmiş fiziksel ve kimyasal özellikleri | 35 |
|---|----|



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| <u>Simgeler</u> | <u>Açıklama</u> |
|-------------------------------|--|
| MSS | Merkezi sinir sistemi |
| KBB | Kan beyin bariyeri |
| TJ | Sıkı bağlantılar |
| AJ | Aderens bağlantılar |
| AH | Alzheimer hastalığı |
| PH | Parkinson hastalığı |
| ALS | Amyotrofik lateral skleroz |
| MS | Multiple skleroz, |
| DMEM HG | Dulbecco's modified Eagle's medium- yüksek glikoz |
| RPMI 1640 | Roswell Park Memorial Institute 1640 |
| FBS | Fetal sığır serumu |
| PCR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RT-PCR | Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu |
| DMSO | Dimetilsülfoksit |
| EDTA | Etilendiamin tetraasetik asit |
| Pen/Strep | Penisilin/Streptomisin |
| H ₂ O ₂ | Hidrojen peroksit |
| MTT bromide | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium |
| PBS | Fosfat tamponlu salin |
| RNA | Ribonükleik asit |
| DNA | Deoksiribo nükleik asit |

1. GİRİŞ

Kan Beyin Bariyeri (KBB), kan dolaşımındaki moleküllerin merkezi sinir sistemine geçişini fiziksel ve metabolik bariyeri aracılığı ile düzenleyen dinamik ve organize bir yapıdır (Phan et al., 2017, Gültürk vd., 2007). Kanda dolaşan toksin ve zararlı maddelerin beyne geçişini engellerken serebral hücre fonksiyonları için gerekli besinlerin geçişine izin verir (Gültürk vd., 2007). Bu sebeple beyin homeostazının korunmasında kan-beyin bariyeri hayati bir rol oynar (Chin et al., 2018). Ayrıca normal şartlarda, lökositler (Monositler, T, B ve NK hücreleri) kan damarları içinde bulunur ve sağlıklı beyin dokusuna erişemezler. Ancak, KBB bir hasar alırsa, bu hücreler beyne girebilir ve orada yaraları iyileştirmeye çalışabilirler. Bu nedenle, KBB hasarı durumunda, lökositler beyne girme yeteneğine sahip olabilirler (Yin et al., 2017). Karmaşık yapısı nedeni ile *in vitro* olarak modellenmesi zordur (Phan et al., 2017, Gültürk vd., 2007, Chin et al., 2018, Brown et al., 2015). Vasküler endotel hücreler madde geçirgenliğinin düzenlenmesini sıkı bağlantılar (tight junctions-TJ) ve adherens bağlantılar (Adherens junctions-AJ) ile gerçekleştirirler. Hücrelerin apikal kısmında yer alan TJ'ler iki hücreyi birbirine sıkıca bağlayarak suda çözünebilir madde geçişini sınırlandırmaktadır. Hücrelerin bazolateral kısmında yer alan AJ'ler ise TJ'ler kadar sıkı olmasa da yine iki hücreyi birbirine bağlayarak madde geçirgenliğinin azaltılmasında TJ'lere destek olmaktadır. TJ yapısında rol alan proteinler, transmembran ve sitoplazmik proteinler olmak üzere ikiye ayrılır. Transmembran proteinler okludin, klaudinler ve bağlantı adhezyon proteinleridir (JAM). Sitoplazmik proteinler; membran-ilişkili guanilat kinazlar (MAGUK) ve zonula okludens 1-2 ve 3 (ZO-1/2/3) proteinleridir (Testa et al., 2001; Campell and Delaney, 2017; Haas et al., 2020; Citi, 2020). Ayrıca aktin de vasküler endotel hücrelerin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar. Kaderin ile aktine bağlı katenin arasındaki bağlantıları oluşturan AJ'lerin yapısı bozulursa bariyer yapısı da bozulmaktadır. TJ ve AJ'lerin en çok görüldüğü sistemlerden biri olan KBB, merkezi sinir sistemi (MSS) homeostazının korunmasında büyük önem taşıyan, beyinde dinamik bir engel olarak görev alan ve beyini kan dolaşımındaki toksik

maddelerden koruyan bir sistemdir (Liu et al., 2013). KBB, temel olarak beyin mikrovasküler endotel hücrelerinden, bu hücreleri çevreleyen devamlı bir bazal laminadan, astrositlerden, perisitlerden ve bunlara komşu nöronlardan oluşur (He et al., 2014). KBB'nin en belirgin özelliği beyin mikrovasküler endoteller arasında bulunan TJ'lerin parasellüler geçirgenliği sınırlandırarak bir çok molekülün geçişini engelleyici rol oynamasıdır (Sharma, 2003; Irudayanathan et al., 2017; Lochhead et al., 2020). Merkezi Sinir Sistemi ile ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların bu bariyeri aşması gerekmektedir. *In vitro* ve *in silico* modelin geliştirilmesi terapötik araştırmalarda kullanılan hayvanların sayısını azaltacak ve fizyolojik farklılıklardan doğan sorunları ortadan kaldıracaktır. Doğru *in vitro* modeller, KBB'nin nasıl oluştuğunun yanında ilaç ve toksin penetrasyonunu değerlendirmek için gereklidir. KBB'yi modellemek ve ilaç dağılımını incelemek için kullanılan *in vivo* hayvan modelleri altın standart olarak kabul edilmesine rağmen hayvan modellerindeki başarılı ilaç adaylarının %80'i klinik denemelerde başarısız olmaktadır (Perrin vd., 2014). Bunun sebebinin hayvan modellerinin insan fizyolojisini tam olarak karşılayamaması olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla insan hücrelerine dayanan güvenilir *in vitro* KBB modellerine ve *in silico* KBB modellerine acilen ihtiyaç vardır.

in vitro KBB modelleri, beyin endotel hücreleri, astrositler ve/veya perisitler, dinamik veya statik sistemler, bazal lamina modeller veya bazal lamina içermeyen sistemler gibi farklı yaklaşımlarla yüksek transendotelial elektrik direnci (TEER) elde etmek için geliştirilmiştir. Tüm bu yaklaşımların avantajları ve dezavantajları vardır ve daha ideal ve gerçekçi modeller henüz keşfedilmemiştir.

In silico modelleri, bileşiklerin geçirgenliği ve fizikokimyasal yapıları ile yapılan korelasyonlara dayanmaktadır. Matematiksel teoriler ve makine öğrenimi destekli yaklaşımlarla yüksek doğrulukta geçirgenlik değerleri elde etmek için geliştirilmiştir. Pasif olarak nüfuz eden bileşikler ve taşıyıcı aracılı taşıma ile iletilen bileşikler için bu modellerin avantajları ve dezavantajları değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kan Beyin Bariyeri

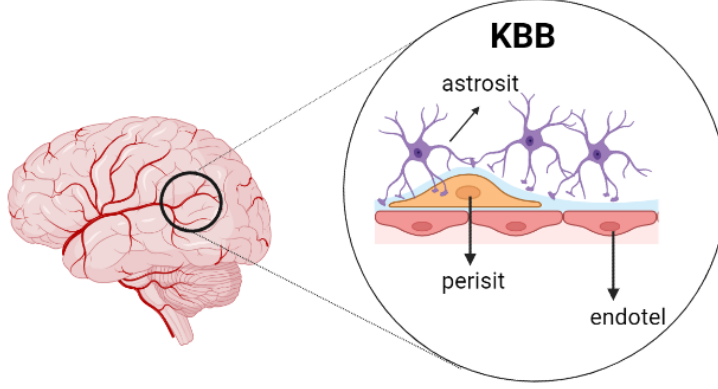
KBB, yapısındaki sıkı bağlantı ve geçiş mekanizmaları ile birçok molekülün alımını kısıtlayan seçici geçirgen bir sistemdir. Bu seçici geçirgenliği terapötik moleküllerin beyne geçişi için de bir kısıtlama yaratır ve beyin hastalıklarında ilaç geliştirmenin önünde zorlu bir engel teşkil eder.

KBB varlığı 1885 yılında Paul Ehrlich tarafından ileri sürülmüştür (Yılmaz, 2006). Paul Ehrlich, oksidatif özelliklerine bağlı olarak renk değiştiren anilin boyaları, memeli hayvanların iç organlarına enjekte ettiğinde, boyaların beyin ve omurilik dışındaki tüm organlara renk bıraktığını keşfetmiştir. Ehrlich'in öğrencilerinden biri olan Edwin Goldmann ise 1913 yılında, bu araştırmanın devamı niteliğinde boyaları doğrudan hayvanların beyin omurilik sıvısına (BOS) enjekte etmiş ve beyin boyandığını, ancak diğer organların boyanmadığını gözlemlemiştir. Ehrlich, bu durumu beyin ve omuriliğin diğer organlardan izole edilmesi olarak yorumlamamıştır, ancak öğrencisi Goldman, beyni ve BOS'u vücudun geri kalanından ayıran bir bölünme şeklinin varlığını açıkça göstermiştir (Chin ve Goh, 2018).

1900'lü yıllarda Max Lewandowsky, beyin kılcal damarlarının belirli molekülleri geçirmediğini ve MSS mikrodolaşımının bu özelliklerini tanımlamak için beyin kılcal damarlarında kan ve beyin arasında bir bariyer olduğunu önermiştir (Bentivoglio, 2014).

KBB'nin ana anatomik ve fonksiyonel yapısı beyin endotelidir. Fizyolojik olarak, beyin kılcal endotel hücrelerine ek olarak, hücre dışı bazal lamina, perisitler, astrositler ve mikroglia, KBB destek sisteminin parçalarıdır. Çevredeki nöronlarla birlikte, bu bileşenler karmaşık ve işlevsel bir "nörovasküler birim" oluştururlar. KBB'nin oldukça kompleks mikroçevresi sistemde yer alan endotel hücrelerin, astrosit ve perisit hücrelerin fiziksel hücre-hücre etkileşimlerinden oluşur. Seçici ve

dinamik olan bu sistem normal nöronal fonksiyonlarının işlevini ve homeostazının korunmasında merkezi bir rol oynar.



Şekil 1. Kan beyin bariyeri (KBB)'nin yapısı (Biorender ile oluşturulmuştur)

Nörovasküler birim, nöronlar, astrositler gibi nöral destek hücreleri, endotelial hücreler, perisitler ve düz kas hücrelerinden oluşan karmaşık ve birbirine bağlı bir sistemdir. Nörovasküler birimdeki her hücre tipi, nöral sinyallerin iletilmesinde ve işlenmesinde veya sağlıklı nöral fonksiyon için uygun mikroçevresel koşulların korunmasında önemli bir rol oynar. *In vitro* nörovasküler modeller, nörovasküler birimi oluşturan hücrelerin farklı rollerini ve işlevlerini anlamak ve aynı zamanda endotel bariyerini geçtikten sonra terapötik bileşiklerin nöral fonksiyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için önemlidir.

KBB'nin çeşitli sebeplerle sızdırması ve disfonksiyonu, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar, inflamasyon ve beyin tümörleri gibi birçok patolojik durumla ilişkilendirilmektedir. KBB zayıflamasının bir dizi nörodejeneratif hastalığa öncülük edebileceğini, hızlandırabileceğini bilinmektedir. Örneğin, hasarlı bir kan-beyin bariyeri, multipl sklerozlu (MS) insanların beyinlerine çok fazla kan kaynaklı makrofaj geçişine izin verir. Beyne giren bu hücreler, sinir hücrelerinin koruyucu tabakası miyeline saldırmakta ve hastalığın yıkıcı semptomlarına yol açmaktadır (Denes ve Lange, 2017; Rosenberg, 2012).

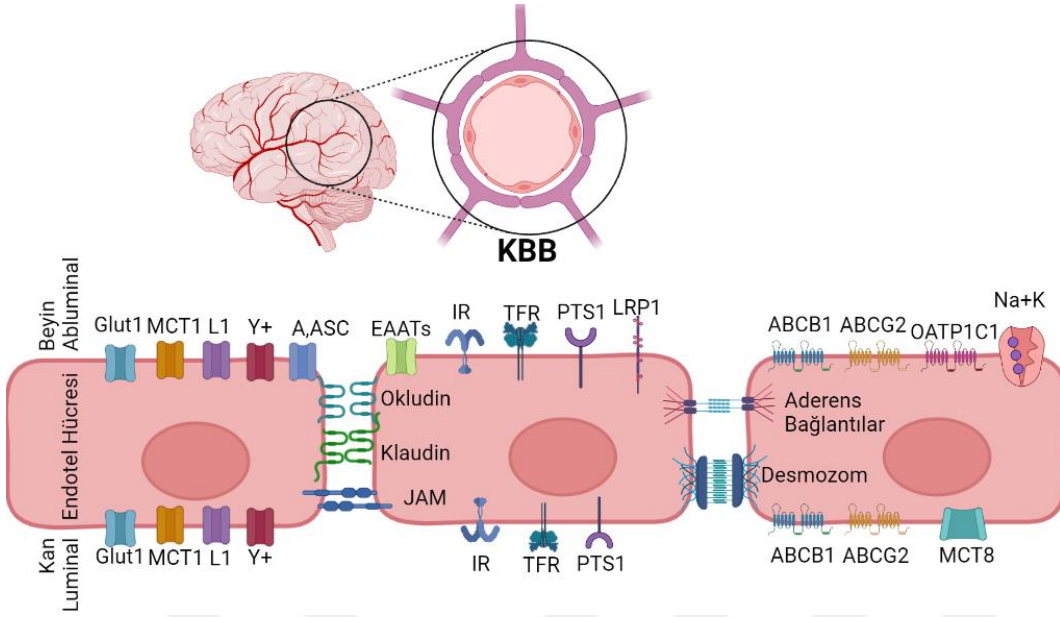
KBB'nin modellenerek fizyolojik özelliklerinin ve fonksiyonel tepkilerinin oluşturulması MSS hastalıklarına geliştirilen terapötiklerin önünü açan ve hızlandıran platformlara imkân sağlayacaktır.

2.2. KBB Geçiş Mekanizmaları

Fiziksel ve metabolik bariyer sayesinde KBB seçici geçirgenlik özelliklerini alır. MSS'ne yönelik geliştirilen ilaç endüstrisinde, moleküler ağırlığı (Ma) 400-500 Da'nın altında olan çok az sayıda küçük molekül KBB'yi geçebileceği ve 7000'den fazla ilaçtan sadece %5'nin KBB'yi geçerek MSS'yi etkileyeceği belirtilmiştir (Aday et al., 2016; Wang et al., 2018). Sadece moleküller açısından değil KBB aynı zamanda immünolojik bir koruma da sağlar; lökositlerin ve doğal immün hücrelerinin alımını da özel olarak düzenleyerek otoimmün hastalıkların oluşumunu engeller.

Fiziksel bariyer, zonula okludens (ZO-1) ve claudin gibi sıkı bağlantı proteinleri ile bağlanan endotel hücreleri tarafından oluşturulur. Bu proteinler, iyonların ve hidrofilik ajanların paraselüler yollardan geçirgenliğini sınırlayan kompleksler oluşturur. Aktif taşıma bariyerini oluşturan mekanizmalar; membran-vezikül yapılar, besin ve hücre atıklarının difüzyonu için P-glikoprotein gibi ilaca dirençli taşıyıcılar ve spesifik membran taşıyıcıların ekspresyonundan kaynaklanır. Metabolik bariyer, hem hücre içi hem de hücre dışı toksik bileşikleri metabolize eden enzimlerden oluşmaktadır.

MSS kapillerini oluşturan endotel hücreler arasında sıkı bağlantı proteinleri (Tight junction (TJ)) denilen sıkı bağlantı bölgeleri bulunur. Bu bağlantılar KBB endotel hücreleri arasında yüksek bir elektrik direnci oluştururlar ve diğer dokularda $333 \Omega/\text{cm}^2$ iken KBB'de $1500-2000 \Omega/\text{cm}^2$ olur. Bunun sonucunda paraselüler permeabilite düşer. İntersellüler aralıklar 200 \AA genişliğindedir. Dokularda çözülmüş olan maddelerin geçişine imkan sağlar. Bir TJ membran proteini olan okludin 65 Kda ağırlığında ve temas bölgelerinin karşısında yer alırlar.



Şekil 2. KBB yüzey belirteçleri ve sıkı bağlantı proteinleri. (Biorender ile oluşturulmuştur)

Klaudinler, 20 izomerden oluşan multigenik bir ailedir. TJ yapılarının komşu hücrelerle temas ettiği bağlamlarda bulunurlar ve birincil yapılardır. ZO-1/2/3, okludin ile etkileşime giren sitoplazmik proteinlerdir. TJ bölgeleri için tanıma proteinleri olarak işlev görürler. MAGUK protein ailesine ait ZO'lar, sitoşelatinler ve kinazlar ile ilişki kurabileceği çok sayıda bölgeye sahiptir. Aderent bağlantıselü molekülü (Junctional adezyon molecule: JAM) ise TJ'da yerleşmiş immunglobulin süper ailesinin bir üyesidir (IgSF).

Endotel hücrenin sitoplazması tek çeşit bir yoğunluktur. Pinositik vezikülleri oldukça az ve fenestralar yoktur. Bu sebeple KBB'ni geçecek olan bir madde

- I- kapiller endoteli,
- II- internal stoplazmik alanı,
- III- Abluminal membran, perisit veya bazal laminayı aşmak zorundadır.

Bu konuda üç ana teori kabul görmektedir. Bunlar veziküler kanallar, birleşme-bölünme , ve transitozis (makromoleküllerin veziküller olarak taşınımı) teorileridir.

Patolojik durumda bazal membran devamlılığı bozulur. Vezikül sayısı artar, iyon ve proteinler beyne geçer. Sıçanların periferik endoteli ile karşılaştırıldığında büyük sayı ve volümdeki mitokondriler besinlerin kandan beyne geçişinde gereklidir.

Mitokondrilerdeki ve dolayısı ile enerji potansiyelindeki bu artış besinlerin kandan beyne aktif transportu sırasında gereklidir. Oldendorf ve Brown sıçan beyin kapillerinin mitokondrileri içeriklerinin iskelet kası kapillerininkinden 5-6 katı fazla olduğunu hesap etmişlerdir. Bu bulgular serebral fizyolojik fonksiyonların enerji bağımlı transkapiller madde taşınımı ile yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bazı nörotransmitterler ve ilaçlar kapiller endotel hücrenin luminal yüzeyinden sitoplazmaya girince, buradaki bazı enzimlerle inaktif formlarına dönüştürülür ve böylece beyne geçişleri engellenir. Bu nedenle serebral endotellerde besin ve ilaçları metabolize edebilen enzimatik bir bariyer vardır. Gama glutamil transpeptidaz (GTP), alkalin fosfataz ve aromatik asit dekarboksilaz gibi enzimler kan ile taşınan maddeleri metabolize ederler. Bu enzimler serebral kılcal damarlarda yüksek konsantrasyonlarda iken nöronal olmayan dokularda çok az veya yoktur. Morfometrik çalışmaların sonuçları, beyin kılcal duvar kalınlığının diğer kılcal damar duvarlarına (kas vb.) göre yaklaşık %39 daha ince olduğunu göstermiştir. Pinositik veziküllerin sayısı yedi kat daha azdır. Duvar kalınlığındaki bu değişikliklerin beyin parankimine girişi belirli sınırlar içinde tutacağı kabul edilmiştir.

Epitel hücrelerinin luminal ve abluminal yüzeyleri farklı özelliklere sahiptir. Bir nükleotit değişim enzimi olan g-GTP lüminal yüzeyde yer alırken, kalsiyuma bağımlı anyonik bir enzim olan alkalin fosfataz abluminal yüzeyde bol miktarda bulunur. Ek olarak, glukoz reseptörleri abluminal yüzeyde dağılmıştır. Ayrıca luminal membran yüzeyinde istenmeyen maddelerin dışarı çıkarılmasını sağlayan PGP'ler bulunur. PGP'ler ile endotel hücreleri saran astrositlerler arasındaki ilişki halen tam olarak anlaşılammıştır. Tüm bu yapılar; luminal ve abluminal yüzeydeki reseptörlerin polarizasyonu, enzimler ve kanallar KBB'yi oluştururlar. Sonuçta KBB beyin homeostazisinin temelini oluşturan hareketli membranlardan meydana gelmiştir (Gültürk vd., 2007).

Sağlıklı KBB modelinde, antidepresanlar, alkol, kokain ve birçok hormon dahil olmak üzere, çok küçük ve / veya yağda çözünen bileşikler, kan-beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerin arasından difuze olabilirler. Buna karşılık, glukoz veya insülin gibi daha büyük moleküller proteinlerle aracılığıyla beyin dokusu içerisine alınır. Beynin kan damarı duvarlarında bulunan bu taşıyıcı proteinler, istenen

molekülleri kandan beyin içine seçici bir şekilde alır. KBB'nin her iki tarafındaki ve içindeki hücreler, hangi moleküllerin ne zaman ve ne kadar geçeceği konusunda sürekli iletişim halindedir. Örneğin, beyin bir bölgesindeki sinir hücreleri özellikle çok çalışıyorsa, besleyici besinlerin kandan geçişini hızlandıracak şekilde kan damarlarının yapısında değişimler meydana gelir. Hücreler arası boşlukların artması vb. KBB bozulduğunda; beyin tümörleri ve beyin enfeksiyonlarında olduğu gibi veya kan damarlarında küçük yırtılmalar meydana geldiğinde, normal olarak beyinden uzak tutulan bazı maddeler giriş yapar ve beyin içerisinde hasara neden olur (Chin ve Goh,2018).

Spesifik maddelerin KBB yoluyla taşınması birincil ve ikincil faktörlere bağlıdır. Moleküler ağırlık, molekülün konformasyonel değişim yeteneği, hücrenin enzimatik stabilitesi, hücresel sekresyon ve akıma (PGP: P-glikoprotein) olan afinite gibi birincil faktörler, birincil ilaç iletimi için önemlidir ve gerektiren ilaçlarla tedaviye başlamadan önce dikkate alınmalıdır. sistem öncesi temizleme. İkincil veya periferik faktörler, sistemik enzimatik stabiliteyi, plazma protein bağlayıcılarının afinitesini, serebral kan akışını ve hastanın genel sağlık durumunu içerir. Taşıma sistemleri genellikle KBB'nin lümen kısmında bulunur. KBB, kan ve beyin arasındaki tek bariyerdir. Sonuç olarak, bu engeli aşan ilaçların düzgün bir şekilde taşınması ve etkili olabilmesi için beyne verimli bir şekilde iletilmesi gerekir. Taşıyıcıların KBB boyunca maddeleri taşımak için kullandıkları basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif taşıma ve veziküler taşıma gibi çeşitli mekanizmalar vardır. Maddenin lipitlerdeki çözünürlüğü, molekül ağırlıkları, yük, seçilen ilaçların beyne verimli bir şekilde iletilmesinde önemli faktörlerdir (Gültürk vd., 2007).

Geçirgenlik, gözenekli bir malzemenin sıvıların ve diğer moleküllerin içinden geçmesine ne kadar kolay izin verdiğinin bir faktörüdür. Bu temelde gözeneklilik ile ilişkilidir. Hücresel bariyerler, pasif lipit çift tabaka geçirgenliği, pasif hücre dışı geçirgenlik ve içeri akış taşıma gibi absorpsiyon mekanizmalarına sahiptir. Geçirgenlik, sıkı bağlantılar ve yapışık bağlantılar nedeniyle vücudun diğer dokularına göre daha düşüktür. Örneğin KBB aktif olduğu beyindeki damar gözenek boyutu 1 nm'den küçükken, kas ve yağ gibi dokuların damarlarında

gözenek çapı yaklaşık 5 nm'dir. Fareler, sıçanlar, sinomolgus maymunları ve insanlar üzerinde yapılan araştırmalar, çeşitli taşıyıcılarda kemirgenler ve primatlar arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Hoshi, Yutaro ve diğerleri, 2013; Aday, S., ve diğerleri, 2016; Uchida, Yasuo ve diğerleri, 2011).

Moleküllerin geçirgenliğini tahmin etmek için *in vivo*, *in silico* ve *in vitro* yöntemler vardır. *In vivo* yöntemler, invaziv ve invaziv olmayan tiplere ayrılır. İnvaziv bir yöntem örneği, Beyin/Plazma Oranı, Kp'dir (log BB). Log BB, beyindeki bir bileşiğin kararlı durum toplam konsantrasyonunun kan/plazmadakine oranının logaritmasıdır, $\log(\text{BB})=\log(\text{C}_{\text{brain}}/\text{C}_{\text{plasma}})$ (Cory Kalvass, J., ve Tristan S Maurer.; 2002, Liu ve diğerleri, 2008). Noninvaziv yöntemlere örnek olarak Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) verilebilir. Bu yöntemlerin her ikisi de beyindeki etiketli moleküllerin non-invaziv tespiti ilkesine dayanmaktadır. *In vitro* yöntemler hücresele ve hücresele olmayan tiplere ayrılır. Hücresele yöntemlere örnek olarak İzole Beyin Kılcal Damarları (Kim et al., 2020), Birincil veya Düşük Geçişli Beyin Kapiller Endotel Hücreleri (Kim et al., 2022), Üç Boyutlu İçi Boş-Fiber KBB Modelleri (Mantecón-Oria et al., 2020), Caco-2 Permeability Assay(Cabrea-Perez et al., 2018), KBB-on-Chip (Mir et al., 2022; Palma-Florez et al., 2022) yöntemleri verilebilir. Hüresiz yöntemlerden ikisi Paralel Yapay Geçirgenlik Testi (PAMPA) (Zhang et al., 2019) ve İmmobilize Yapay Membran Kromatografisidir (IAM) (Tsopelas et al., 2018).

2.3. *in vivo* KBB Modelleri





In vivo KBB modelleri, canlı ve dinamik sistemin kullanıldığı ve beyindeki geçirgenliği doğrudan yansıtan çalışmalardır. Bu modellerde test edilen moleküllerin daha kolay insan çalışmalarına çevrilebileceği ve dolayısıyla moleküllerin KBB'yi geçme davranışını tahmin etmek için en iyi modeller oldukları kabul edilir (Sharma et al., 2019).

Kemirgenler KBB çalışmalarında en çok kullanılan *in vivo* modellerdir. Erişim ve kullanım kolaylığı ile ilaç dağıtımını etkileyebilecek faktörleri değerlendirmek için kullanılan kemirgenler KBB çalışmalarında en çok kullanılan *in vivo* modellerdir (Avdeff, 2011). Sıçan ve fare beyni morfolojik, fizyolojik ve patolojik olarak insan

beynine benzer özellikler sergilemektedir. Kemirgen beyinde insanlardaki GLUT1 reseptörlerine benzer proteinler sentezlendiği için KBB'nin benzer işlevler yerine getirdiği bilinmektedir.

In vivo sistemler, KBB'yi doğal ortamında incelemenin faydasını sağlar ama bunun yanında patolojik süreçlerin incelenmesinde bir dizi zorluk getirir. *In vivo* modeller *in vitro*'nun aksine lokal bir bakış açısı sağlamaz, sistemik bir yanıt sonucu verir. İnsan fizyolojisini modellemek ve ilaç dağıtım etkinliğini incelemek için kullanılan *in vivo* hayvan modelleri altın standart olarak kabul edilse de, hayvan modellerindeki başarılı ilaç adaylarının %80'i klinik deneylerde başarısız olur (Perrin ve diğerleri, 2014). Bunun, hayvan modellerinin insan fizyolojisini tam olarak taklit edememesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, insan hücrelerine dayanan güvenilir *in vitro* modellere acil bir ihtiyaç vardır.

Tablo 1. *in vivo* ve *in vitro* KBB modellerinin karşılaştırılması

| Karakteristik özellikler | <i>In vivo</i> | <i>In vitro</i> | | |
|--|---|---|--|--|
| | <u>Hayvanlar</u>  | <u>Tek tabaka Kültür</u>  | <u>Geçirgen Kuyulu Kültür</u>  | <u>Mikro akışkan Cihazlar</u>  |
| Tekrarlanabilir mikroçevre | ✓ | ✗ | Sınırlı | ✓ |
| Kontrollü mikroçevre | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Organ seviyesinde işlev | ✓ | Sınırlı | Sınırlı | Potansiyel |
| KBB özelliklerinin kantitatif analizi (permabilite, TEER vb) | Sınırlı | Sınırlı | Sınırlı | ✓ |
| Eşzamanlı okumalar | Sınırlı | Sınırlı | Sınırlı | ✓ |
| Yüksek verim ve/veya paralel test | ✗ | ✓ | ✓ | Potansiyel |
| Farmakodinamik ve farmakodinamik testleri | ✓ | ✗ | ✗ | Potansiyel |
| İnsan kaynaklı materyallerin kullanılması | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Kişiyeye özgü tedavilerin geliştirilmesi | ✗ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Maliyet | Yüksek | Düşük | Düşük | Makul |

2.4. *In vitro* KBB modelleri

2.4.1. Statik KBB modelleri

In vitro KBB modelleri temelde bir membran üzerine endotel hücrelerinin ekilmesine dayanan yöntemlerdir. Fizyolojinin en basitleştirilmiş hali oldukları için popüler olarak polikarbonat Transwell plakasına beyin endotel hücrelerinin ekildiği modeller tercih edilmektedir (Hatherell et al., 2011). Bununla birlikte, basitleştirilmiş modeller, KBB'nin dinamik mikroçevresinden ve karmaşık mimarisinden yoksundur.

2.4.2. Dinamik KBB modelleri

Dinamik akışlı KBB'yi modellemek için literatürde pek çok farklı yaklaşım bulunmaktadır.

Fiber tabanlı (hollow fiber) bir yaklaşım olan DIV-KBB modeli sıklıkla kullanılmış fakat hücrelerin görselleştirilmesi noktasında başarılı olamamıştır ve endotel hücrelerdeki morfolojik değişimlerin incelenmesinde yetersiz kalmıştır (Neahaus et al., 2006; Mantecón-Oria et al., 2020).

Son zamanlarda mikro ölçekli mikroakışkan sistemlerde uygulanan KBB modelleri gündeme gelmiştir. Mikroakışkan teknolojilerindeki gelişmeler hem statik hem de dinamik KBB mikroçevresini modellemek için sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Tez çalışmasında da uygulanan mikroakışkan sistemler fizyolojik parametreleri yansıtması açısından avantaj sağlayan sistemlerdir (Oddo et al., 2019; Jiang et al., 2019).

Çip üstü platformlar, numune toplama, hazırlama, işleme ve analiz dahil olmak üzere tüm biyolojik analiz protokollerinin avuç içi büyüklüğünde bir platformda gerçekleştirilmesini sağlamak için tasarlanmıştır. Bu platformlar, küçük miktarlarda (nanolitreden mikrolitreye kadar) numune ve ajanların kullanıldığı 10-100 mikrometre boyutlarındaki mikroakışkan kanallardan oluşur (Burns et al., 1998). 90'lı yılların sonlarına doğru mikroakışkan çipler gündeme gelmeye başlarken, organ-on-chip (çip üstü organ) sistemleri ilk kez 2010 yılında gündeme gelmiştir. Çip üstü organ platformları fizyolojik ortamı taklit edebildikleri için deney hayvanı kullanımını azaltırlar. Bu platformların ortaya çıkmasıyla birlikte, birçok çalışma tasarlanmış platformlarda insan fizyolojisini olabildiğince yakından taklit etmeye çalışılmıştır.

Memeli dokularının gerçek hiyerarşik organizasyonunu taklit eden yapısal bağlantılar ve hücre-hücre etkileşimleri, doku fonksiyonlarını taklit etmek için çok önemlidir. Bu özellikler açısından, yüksek hızlı ve yüksek verimli tarama yeteneklerine sahip mikroakışkan çip üzerinde beyin platformları ve 3B kültür

koşullarını entegre eden sistemler daha *in vivo* benzeri bir yaklaşım sergilemektedir (Bang et al., 2019).

Basit kültür modellerine bir alternatif olarak mikroakışkan sistemler, kontrollü bir mikro ortam sağladıkları, hücresel yapıları taklit ettikleri ve minimum çalışma hacmi gerektirdikleri için doku sulandırması için avantajlı bir platform sağlar (Booth ve Kim, 2019; Oddo et al., 2019; Jiang et al., 2019; Musafargani et al., 2020). Bu ihtiyaç, bariyer fonksiyonlarına sahip dokuları simüle etmek için daha da belirgindir, çünkü hepsi, spesifik geçirgenlik özelliklerine sahip bazal membranlara ve/veya hücre dışı matrislere ve ayrıca doğuştan gelen dokuya özgü geçirgenliklerini, seçiciliklerini ve seçiciliklerini korumada önemli roller oynayan açık mekanik özelliklere sahiptir. taşıma özellikleri.

Xu et al. yaptıkları mikroakışkan KBB modelinde 1 $\mu\text{L}/\text{dak}$ dinamik akışa maruz bırakılan endotel hücrelerinde ZO-1 ve Klaudin-5 sıkı bağlantı proteinlerinin ve VE-Kaderin adezyon proteininin arttığını ve bunlarla birlikte $1300 \Omega \times \text{cm}^2$ TEER değerine ulaşabildiklerini bildirmişlerdir (chen et al.,2016). Yapılan bu çalışma vasküler akışın KBB fizyolojisini modellemek için önemli bir faktör olduğunu vurgulamıştır.

2.5. Membranlı Mikroakışkan Sistemler

Bazal membranlar (BM'ler), endotel ve epitel hücrelerinin altında bulunan kas-yağ hücrelerini ve periferik sınırları çevreleyen esnek ve 40-120 nm kalınlığında ESM'dir. Filtre özelliğiyle dokularda hücresel maddelerin ve metabolik faaliyetleri bölümlendirmede, epitel bütünlüğünün korunmasında, hücre çoğalması ve farklılaşmasında katkı sağlar (Hamill et al. 2009; Kruegel ve Miosge, 2010). KBB'nin geçirgenliğinin düzenlenmesinde BM'ler önemli rol oynamaktadır. KBB'nin seçici özellikleri, beyin parankiminin toksik maddelerden korunmasında, beyin immünolojisinin kontrolünde, nöronal dokuya zarar verebilecek büyük moleküllerin ve dolaşımdaki kan hücrelerinin geçişinin önlenmesinde, su-iyon homeostazı ve glikoz/amino asitlerin taşınmasında aktif rol almaktadır (Abbott, 2013).

Doku bariyerlerindeki iki hücre tabakası arasındaki BM'nin modellenmesi, gerçekçi *in vitro* modellerin oluşturulması için kritik öneme sahiptir. BM'ler, yapısal ve filtre edici rollerinin yanı sıra hücre polaritesini, hücre metabolizmasını, hücre yaşamını, çoğalmasını veya farklılaşmasını etkiler ve hücre göçüne katılır (Alberts et al., 2002; Rayagiri et al., 2018; Kalebic et al., 2020). . Buna göre BM'lerin, vücut sıvılarında belirli bileşiklerin seçici geçişine izin veren gözenekli bariyerler olarak işlev görmesi beklenir. Membran teknolojisi işlev açısından çok yönlüdür ve biyoyumluluk, seçici geçirgenlik, esneklik vb. gibi birçok avantaj sunar.

Bazal membran olarak da adlandırılan dokular arası arayüzün çip üzerinde modellenmesi, çoğunlukla mikroakışkan çip tasarımının sınırlamaları nedeniyle zordur. Çip üzerinde membran içeren mikroakışkan platformların sayısı çok sınırlıdır ve çip üzerinde bariyer modellemesinde bazal membran biyomimetliğini taklit eden bir zarın kullanılması modelin gerçekçiliğini artıracaktır.

Dokular arası arayüzlerin ve doku bariyer modellerinin oluşturulmasına yardımcı olmak için BM'lerin kullanılması gereklidir.

Literatürde mikroakışkan sistemlerde hücrenin tutunabileceği bir iskele görevi gören polikarbonat (PC), polidimetilsilazan (PDMS) veya polietilen tereftalattan (PET) yapılmış gözenekli, kararlı malzemeler kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında ise alternatif olarak bakteriyel selüloz ve polikaprolakton polimerleri kullanılmıştır.

2.5.1. PDMS

Literatürdeki membran çiplerinin çoğu PDMS olmasına rağmen, PDMS membran çip sistemleri doku bariyer fizyolojisinde BM yapısını tam olarak karşılayamamaktadır. PDMS, yüksek gaz geçirgenliği nedeniyle 20 yılı aşkın bir süredir membran teknolojisinde kullanılmaktadır (Ostuni et al., 2000; Chiu et al., 2000; Griscom et al., 2002; Ostrovidov et al., 2004). Otoklavlanabilir ve gaz geçirgen olması, hücrelere toksik olmaması ve optik şeffaflığa sahip olması nedeniyle mikroakışkan platformlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. KBB çalışmalarında doku bariyer çalışmalarının en yaygın uygulaması ilaç geçirgenliği analizleridir. PDMS'nin ilaçlar ve biyoaktif moleküller gibi küçük hidrofobik

molekülleri absorbe ettiği gösterilmiştir (Toepke et al., 2006). Böyle bir absorpsiyon durumunda, analizin yanlış sonuçlar vermesi çok olasıdır. PDMS ayrıca birçok hidrokarbon bazlı çözücüde şişme eğilimindedir. Plazma maruziyeti ile üstesinden gelinebilen ancak uzun sürmeyen hidrofobik bir yapıya sahiptir (Gökaltun vd., 2017). Bu hidrofobiklik protein absorpsiyonunu arttırdığı için biyolojik analizlerde sorun teşkil eder. Ayrıca bazı çalışmalarda bazal membran yapısını yansıtmaması için gereken mekanik esneklik sağlanamamıştır (Heo et al., 2007; Kadyrova et al., 2022).

PDMS yüzeyi içinde elektrot entegrasyonunun zorluğu ve su buharı geçirgenliği diğer önemli dezavantajlardır. Ayrıca düşük sıcaklıklarda veya yüzeyle kısa süreli temasta elastik bir katı gibi davranması tasarım sınırlamalarına yol açmaktadır (Wang et al., 2018). Kullanılan PDMS zarları genellikle hücrelerin zar boyunca hareketini kısıtlayan fizyolojik olmayan gözeneklere sahiptir. PDMS membranları üzerinde büyüyen hücrelerde istenmeyen patolojiler gelişebilir. Bu membranlar boyut ve şekil kısıtlamaları nedeniyle istenilen kalınlık ve esnekliğe sahip olamamaktadır. Vakum uygulamasının bir sonucu olarak, PDMS membranları da deforme olabilir (Lee et al., 2010).

BM çalışmalarında genellikle PDMS tabakaları arasında non-PDMS membranlar kullanılmaktadır. PDMS için oluşturulan yapıştırma teknikleri, termoplastikler gibi alternatif malzemelerle birleştirilebilir. Literatürdeki bazı çalışmalar, PDMS'nin biyoyumluluğunun yanlış olduğunu iddia ederek, PDMS membran formülasyonlarında tüm hücre türlerinin büyümeyeceğini öne sürmektedir (Sackmann et al., 2014).

2.5.2. Bakteriyel Selüloz Membranlar

Bakteriyel selüloz (BS) membranları, bitki selülozları ile aynı molekül formüle sahip fakat BS lignin, hemiselülozlar ve pektin içermeyen yüksek kristaliniteye sahip, ~1000 birim polimerizasyon derecesi ve <100 nm kalınlığındaki nanolifleri, yüksek su tutma kapasitesi esneklik ve gerilme mukavemeti açısından değerlendirilebilir mekanik özelliklere sahip bir biyopolimerdir. Ayrıca biyoyumluluk, düşük immünojenik potansiyeli BS 'nin uygulanabilirliğini arttırmaktadır (Şekil 3.) (Gorgieva ve Trček, 2019). BS'nin bu özellikleri ile birlikte modifiye edilebilir olması doku mühendisliği uygulamalarında yaygın

kullanılmasını sağlamaktadır (Zhong, 2020). KBB'nin *in vitro* modellerinde kullanımı yaygın değildir. Fakat özellikleri sebebiyle KBB modellemede BM olarak kullanımı umut veren bir yaklaşımdır (Gorgieva, 2020).



Şekil 3. Bakteriyel selüloz membran görüntüsü

2.5.3. Elektroğirilmiş Membranlar

Elektroğirme son zamanlarda mikroakışkan çiplere entegre edilecek membranların üretiminde kullanılmıştır. Hedflenen membranlar, polimerin çözücüsü, akış hızı ve eğirme voltajı gibi değişkenleri optimize ederek kontrol edilebilir. Üretilen ince fiberler, yüksek yüzey-hacim oranı ve yüksek gözeneklilik sağlar. Bu nanofiberler, doğal BM'yi taklit etmenin yanı sıra hücre tutunmasını, çoğalmasını ve göçünü sağlar ve ideal bir mikro ortam oluşturur (Sell et al., 2010; Kadyrova et al., 2022; Jain et al., 2022). Kadyrova et al., bir çalışmada elektroğirme ile üretilen nanofiber membranların PDMS'den daha yüksek mekanik güce sahip olduğunu bildirmiştir. Fizyolojik dokularda gereken mekanik kuvvet aralığı, polimerin modifikasyonu veya kompozit polimerlerin kullanılmasıyla elde edilebilir.

Elektroğirilmiş membranların mikroakışkan cihazlara entegrasyonu sırasında sızıntılar oluşabilir, membran yüzeyine bağlı hücre tutunma oranının azalma ve görüntü alınmasında sorunlar yaşanabilir. Ancak elektroğirilmiş membranlar, mikroakışkan cihazlarda kullanılan diğer membran türleri ile karşılaştırıldığında, üretim kolaylığı, nispeten düşük maliyeti ve nanofiber yapıları sayesinde hücrelerin

tutunacağı yüzey alanlarının yüksek olması ve fizyolojik mikroçevreyi modellemesi nedeniyle daha avantajlı görünmektedir.

2.6. *In silico* KBB Modelleri

2.6.1. Hesaplamalı Modeller

Hesaplamalı model, bilgisayarlar kullanılarak incelenebilen bir sistemin, sürecin veya olgunun temsilidir. Modellenen sistemin, sürecin veya olgunun davranışını simüle etmek için tasarlanmış bir dizi matematiksel denklem veya algoritmadır. Hesaplamalı modeller, fiziksel, biyolojik ve sosyal sistemler dahil olmak üzere çok çeşitli sistem ve süreçleri incelemek için kullanılabilir. İncelenen sistemin davranışı hakkında verileri analiz etmek, tahminlerde bulunmak ve hipotezleri test etmek için kullanılabilirler.

Moleküler dinamik (MD), atomların ve moleküllerin fiziksel hareketlerini incelemek için kullanılan bir hesaplama yöntemidir. Bu parçacıkların zaman içindeki hareketini ve etkileşimlerini tahmin etmek için matematiksel denklemlerin ve bilgisayar simülasyonlarının kullanılmasını içerir. MD simülasyonları tipik olarak proteinlerin yapısı ve işlevi, kimyasal reaksiyonların dinamikleri ve malzemelerin farklı koşullar altındaki davranışları gibi atomik ve moleküler düzeyde malzemelerin ve biyolojik sistemlerin özelliklerini incelemek için kullanılır. MD modelleri, dengedeki ve dengeden uzaktaki sistemlerin davranışları, kimyasal reaksiyonlarda entropinin rolü ve faz geçişlerinin mekanizmaları dahil olmak üzere çok çeşitli fenomenleri incelemek için kullanılabilir.

2.6.2. Makine Öğrenimli KBB modelleri

Makine Öğrenimi Algoritmaları

a. Decision Trees (DT)

Decision trees normal bir ağacın taşıdığı gibi kök, dal ve yaprakları içermektedir. DT de öznelilikler düğümleri, bağlantılar dalları ve tahmin edilmesi istenen

değerler DT'nin yapraklarını oluşturmaktadır. DT algoritmasında insanların karar verme sürecine benzer bir yaklaşım vardır (Patel and Prajapati, 2018). Her yeni örnek, içerdiği özniteliklerin özelliklerine göre ağaç üzerinde hareket ettirilir ve sonuçta ait olduğu sınıf tespit edilir.

MR görüntülerinin yönetilmesi (Estella et al., 2012), parkinson hastalığının tedavi sürecinin yönetilmesi, koroner kalp hastalığı risk tahminin (Kim et al., 2015) yapılması gibi çalışmalarda decision trees kullanılmaktadır (Canbay, 2020)

DT yaygın olarak uygulanan bir dizi güçlü ancak aldatıcı basit algoritmalarıdır. Ayrıca en iyi "hazır" makine öğrenimi algoritması olup ve genellikle kullanılması gereken ilk algoritmalar arasındadırlar. DT yöntemi, veriler "uzun" olduğunda, yani birkaç değişken için çok sayıda gözlem olduğunda özellikle yararlıdır. DT, karmaşık, doğrusal olmayan bir model oluşturmak için verilerin farklı alt kümelerini tekrar tekrar kullanır. Klinik bir örnekte, Weng ve ark. (Weng et al., 2017) Birleşik Krallık'ta yaklaşık 380,00 hastadan oluşan bir örnekte kardiyovasküler olay riskini tahmin etmek için bu tekniği kullandı. Bu araştırmacılar, 2 makine öğrenimi algoritmasının, American College of Cardiology ve American Heart Association risk algoritmasından sırasıyla %1,7 ve %3,6 daha iyi performans gösterdiğini buldu (Johnson et al., 2018).

Decision trees basitçe bir soru sorar ve cevaba göre (Evet / Hayır) ağacı alt ağaçlara ayırır. Karar ağaçlarının, diğer sınıflama tekniklerine göre en önemli üstün tarafı, bilgidan çıkarılan kuralın anlaşılır bir şekilde yazılabilesidir (Karal ve Turan, 2021).

b. Random Forest (RF)

Random forest algoritması, sınıflandırma ve regresyon problemlerinde yaygın olarak kullanılan denetimli makine öğrenimi algoritmasıdır. RF, decision trees oluşturmakta ve ortalama sonuç almaktadır. Rastgele seçim yapmakta ve herhangi bir formül seti kullanmamaktadır (Sruthi, 2021). RF da birden çok modelin üretilip ortalamasından elde edilen sonucun değerlendirildiği sınıflandırmadır (Breiman, 2001). Adından da anlaşılacağı üzere random forest modelinde, rastgele decision trees oluşturularak problemlerin yapısına göre bu ağaçların sınıflandırılması veya regresyon analizinde kullanılmasına dayanmaktadır. Tek bir model yerine bir

model topluluğunun ortak görüşüne dayalı bir sonuç üretir. Hastalık risk tahmini, alzheimer hastalığının teşhisi ve sağlık hizmetleri takip sistemi üzerine random forest modeli kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (Canbay, 2020).

Random forest, her bir ağaç için hem önyüklemeyi (bir numune alt kümesinin seçimi) hem de tahmin edici değişkenlerin bir alt kümesinin seçimi içermektedir. Random forest, farklı ağaç türlerine sahip bir toplu decision trees sınıflandırıcısıdır. Bölünmeyi belirlemek için her düğümde rastgele bir özellik dizisi kullanılarak ayrı bir decision trees üretilir. Her ağaç, alınan rastgele bir vektörün değerlerine dayanır. Random forest, girdi özelliklerinden rastgele doğrusal kombinasyonları kullanır. Özelliklerin bir alt kümesini rastgele seçmez, ancak özelliklerin doğrusal bir kombinasyonu olan yeni öznitelikler oluşturur (Karal ve Turan, 2021).

c. Artificial Neural Network (ANN)

Artificial neural network (ANN), biyolojik olarak ilham alan hesaplama ağlarıdır. Yapay sinir ağları, beyin ve sinir sistemi çalışmalarına dayanan bir teknoloji olup beyin ve sinir sisteminin elektriksel aktivitesini simüle etmektedir (Park and Lek, 2016). Birbirine bağlı nöronlara sahip insan beynine benzer şekilde, ANN de ağların çeşitli katmanlarında birbirine bağlı nöronlar bulunmaktadır. ANN algoritması insan beynine benzer yapıyı bilgisayarlarda oluşturarak, bilgisayarlarında bir şeyleri anlama ve insan benzeri bir şekilde kararlar almasını sağlamaktadır. İnsan beynindeki nöronların işleyişi ve birbirleri ile bağlantısı örnek alınarak tasarlanmıştır. ANN yönteminde üretilen modellerin ilk katmanı özniteliklerin değerini alan girdi katmanı, son katmanı ise sınıf veya regresyon değeri tahmini yapan çıktı katmanıdır. M tane özniteliğe sahip örneklerin bulunduğu bir iki sınıflandırmada girdi katmanda M tane nöron, çıktı katmanda ise 1 tane (0 ve 1 değerlerinde çıktı üretebilen) nöron vardır. Nöronlar girdi ve girdi sınırının değerini, belirlenen bir f fonksiyonundan geçirerek bir çıktı değeri hesaplar. Girdi ve çıktı katmanları arasına istenen ölçülerde gizli katmanlar eklenebilmektedir. Bu katmanlar girilen öznitelikler arası etkileşim ve ilişkiye göre nöronlar arası sinir ağlarına atanacak ağırlığın hesaplamalarını detaylandırmaktadır (Canbay, 2020).

d. Support Vektor Machine (SVM):

Support vektor machine algoritması, sınıflandırma ve regresyon problemleri için kullanılmakta olup en popüler denetimli öğrenme algoritmalarından biridir (Oğuz vd, 2021). SVM'nin amacı, veri noktalarını belirgin bir şekilde sınıflandıran N boyutlu bir uzayda bir hiperdüzlem oluşturmaktır. SVM algoritması yüz algılama, görüntü sınıflandırma ve metin sınıflandırma gibi çalışmalar için kullanılmaktadır. SVM, veri kümesindeki sınıfların içerdiği örnekler arası uzaklıkları hesaplayarak sınıfları ayırt etmek için düzlemler kullanan sınıflandırma yöntemidir (Cortes et al., 1995). SVM yöntemi, farklı ön işlemler ile birleştirilerek kanser hastalıklarının sınıflandırılmasında, uzaktan sağlık hizmetleri uygulamaları için anomalilerin tespitinde, karaciğer hastalığının teşhisinde, Hepatit hastalıklarının teşhisinde ve daha birçok sağlık verisi içeren çalışmada yüksek başarı ile kullanılmıştır (Canbay, 2020).

Destek vektör makineleri, sağlık alanında yaygın olarak kullanılan başka bir makine öğrenme algoritmasını içermektedir. Klinisyenler SVM'leri yararlı bulabilirler çünkü nispeten basit olsalar da karmaşık doğrusal olmayan ilişkileri yakalayabilirler. Bir ikili sınıflandırma probleminde, SVM'ler girdi gözlemlerini daha yüksek boyutlu bir uzaya eşler ve ardından 2 sınıfı doğrusal olarak ayıran bir "hiper düzlem" oluşturmaya çalışır. SVM'lerden olasılık sonuçlarını hesaplamak için ikincil yöntemler mevcuttur. İkincisi, lineer regresyona benzer şekilde, çok yüksek boyutlu bir uzayda (yani, birçok değişken olduğunda) girdi gözlemlerinin hesaplanması zor veya imkansız olabilir (Johnson et al., 2018).

e. Convolutional Neural Network (CNN)

Convolutional Neural Network, doğrudan verilerden öğrenen ve manuel özellik çıkarma ihtiyacını ortadan kaldıran derin öğrenmeye yönelik bir ağ mimarisidir (Oğuz vd, 2021). CNN'ler son derece doğru tanıma sonuçları ürettiği için derin öğrenmede kullanımları yaygındır. CNN'ler, görüntü ve zaman serisi verilerindeki temel özellikleri ortaya çıkarmak ve öğrenmek için en uygun mimariyi sağlamaktadır. Tıbbi görüntüleme CNN'ler, görüntülerdeki kanser hücrelerinin varlığını veya yokluğunu görsel olarak tespit etmek için binlerce patoloji raporunu inceleyebilmekte ve diğer başka hastalıkların tespitini de sağlamaktadırlar (Oğuz vd, 2021). Bir CNN, her biri bir görüntünün farklı özelliklerini algılamayı öğrenen

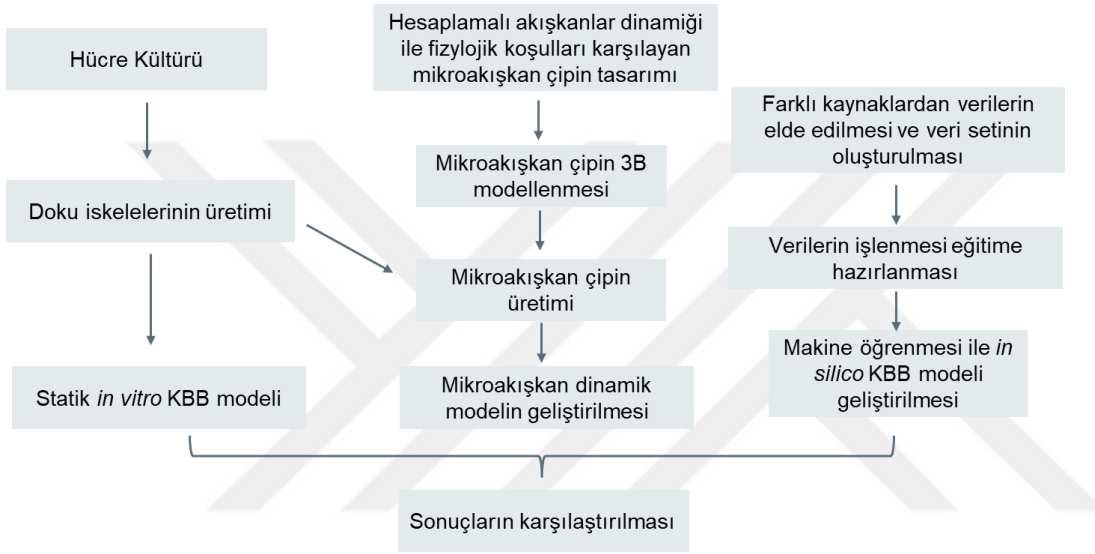
onlarca veya yüzlerce katmana sahiptir. Hatta CNN modeli içerisinde 23 milyondan fazla parametre bulunmaktadır (Canbay, 2020).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Tasarımı

Yapılan tez çalışması Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Biyomalzeme ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı'nda Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR danışmanlığında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. Çalışma Akış Şeması

3.2. Gereç

25 cm², 75 cm² ve 175 cm² yüzey alanına sahip filtreli ve filtresiz kültür kapları (Greiner, Cellstar®, Almanya)

2, 5, 10, 25 ve 50 mL hacimli steril serolojik pipetler (Sarstedt, Almanya)

1 mL ve 2 mL mikrosantrifüj tüpleri (Sarstedt, Almanya)

15 ve 50 mL santrifüj tüpleri (Sarstedt, Almanya)

24 kuyulu kültür kabı (Greiner, Cellstar®, Almanya)

24 kuyulu kültür kabına uygun insertler (Greiner, Almanya)

1.5-mL Eppendorf tüpler (ThermoFisher Scientific, ABD)

Hemositometre (Neubuer, Almanya)

Tripan mavisi solüsyonu (Sigma, ABD)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)

L-glutamin (Capricorne, Almanya)

Tripsin- etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (2,5 g/L tripsin, 0,5 mM EDTA) (Capricorne, Almanya)

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Merck, ABD)

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM HG) 4,5 g/L glikoz, Capricorne, Almanya)

Fetal sığır serumu (FBS) (Capricorne, Almanya)

Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) (Capricorne, Almanya)

Absolut Etil Alkol (Merck, ABD)

Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck, ABD)

Glukoz (Merck, 1083421000, Almanya)

Na_2HPO_4 (Merck, 1065851000, Almanya)

Pepton (Lab M, MC024, Almanya)

Maya özütü (Merck, 1037530500, Almanya)

Sitrik asit (Merck, 1370031000, Almanya)

NaOH (Merck KGaA, Almanya)

3.3. Yöntem

3.3.1 Hücre kültürü

3.3.1.1. İnsan Beyin Mikrovasküler Hücrelerin (HBEC-5i) kültürü

A. Hücre Çözdürme

-196°C sıvı azot tankındaki (Locator, Thermo Scientific, ABD) kriyotüpler çıkarılarak tüp içeriği 37°C'deki su banyosunda üçte ikisi sıvı hale geçinceye kadar çözdürülmüştür. Sınıf II biyogüvenlik kabini (MSC-IIA-120, Metisafe, Türkiye) içerisinde; HBEC-5i'ler 37°C'ye ısıtılmış DMEM:F12 besi ortamı (Capricorn, Almanya) besi ortamı ile toplanarak santrifüj tüpüne (Greiner Bio-One, Almanya) aktarılmıştır. Hücreler 1000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendikten (5810 R, Eppendorf, Almanya) sonra süpernatant dökülerek hücre pelleti besi ortamı ile süspansiyon edilmiştir. Uygun etiketlemeden sonra, %5 CO₂ ve %95 nem içeren bir inkübatörde (HERA Cell 150i, Heraeus, Almanya) 37°C'de inkübe edildi. Besiyeri iki günde bir değiştirilerek hücreler kültür kabı yüzeyinin %80'ini kaplayınca tripsin (%0.25)/EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu (T4049, Sigma Aldrich, ABD) kullanılarak pasajlandı.B. Hücre Pasajlama

Hücreler üzerindeki medyum uzaklaştırıldıktan sonra hücreler Ca²⁺, Mg²⁺ içermeyen 37°C'ye ısıtılmış fosfat tuzu solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Hücrelerin üzerini kapatacak miktarda tripsin (%0,25) - EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37°C'de 3-5 dakika inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı ters fazlı ışık mikroskobu ile gözlemlendi ve hücreler, %10 cenin sığır serumu (FBS, Capricorn, Almanya) içeren besleyici ortam içeren bir santrifüj tüpünde toplandı. Hücreler 1000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant çıkarıldı ve pellet taze besleyici ortamda süspansiyon edildi. Balondan çıkarılan hücre süspansiyonu 3 balona bölündü (1:3 oranında pasajlandı) ve üzerlerine taze medyum eklenerek kültüre devam edildi. Hücre kültürlerinin besi ortamı 2 günde bir taze besi ortamı ile değiştirilmiş ve hücreler istenilen sayıya ulaştıklarında -196°C'de sıvı nitrojen tankında stoklanmıştır.

C. Hücre Dondurma

Hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra hücreler, Ca⁺², Mg⁺² olmayan önceden 37°C'ye ısıtılmış PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerini kapatacak miktarda tripsin (%0,25) - EDTA solüsyonu ilave edildi ve 37°C'de 4-5 dakika inkübatörde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılması ters fazlı ışık mikroskobu ile gözlemlendi ve hücreler, taze besleyici ortam içeren bir santrifüj tüpünde toplandı. Hücreler 1000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant çıkarıldı ve pellet taze besleyici ortamda süspansiyon edildi. Askıya alınan hücreler, %90 FBS + %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (276855, SigmaAldrich, ABD) içeren dondurma ortamı ile homojenleştirildi ve kriyotüplere (Kırgeç, Japonya) aktarıldı. Kriyotüpler -86°C'de köpük kutu içerisine kaldırılmış ve hücreler kontrollü bir şekilde soğutulmuştur. Bir gece -86°C'de bekletilen kriyotüpler -196°C'deki sıvı nitrojen tankına aktarıldı.

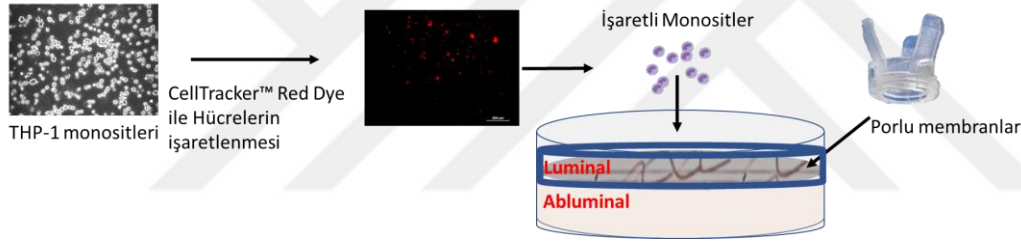
3.3.1.2. Monositlerin (THP-1) Kültürü ve Stoklanması

THP-1 hücreleri, monosit hücre modeli olarak kullanılmıştır. E.Ü. Biyomühendislik Bölümü Biyomateriyal ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı stoklarında bulunan THP-1 hücre hattı %10 FBS ve %0,1 penisilin-streptomisin içeren RPMI besi ortamı ile 37°C'de %5 CO₂, %95 nemli ortamda kültüre edilmiştir. İki günde bir besi ortamı değiştirilen kültürler hücre konsantrasyonu 105 hücre/mL oranına ulaştığında uygun pasaj oranında pasajlanarak kültürün devamı sağlanmıştır. Hücrelerin bir kısmı ise çalışmaların sürdürülebilirliği için dondurulmuştur. THP-1 hücrelerinin dondurma ortamı %90 serumlu besi ortamı ve %10 DMSO'dan oluşmaktadır. Dondurma ortamında süspansiyon edilen hücreler kriyotüplere alınarak 24 saat -86°C'de bekletildikten sonra, uzun süreli saklama koşullarını sağlayacak olan sıvı azot (-196°C) içerisine alınmıştır.

Monositlerin İşaretlenmesi

THP-1 monositleri Cell Tracker Red Dye ile boyanarak cell crown'lara takılmış olan porl optimizeasyonu yapılmış olan PCL ve BS membranlardan geçirilmiştir.

Cell Tracker Red Dye oda sıcaklığına getirildikten sonra liyofilize ürün DMSO ile çözdürülerek 10 mM'lik bir konsantrasyon oluşturulmuştur. 1 mM (1000X) konsantrasyona seyreltilerek çalışma stoğu hazırlanmıştır. Çözeltiden serumsuz besi ortamında 15 µM'lik son çalışma konsantrasyonuna oluşturularak hücrelerin üzerine eklenmiş ve 30 dakika hücreler karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile yıkanarak boya kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Taze besi ortamında süspense edilen hücreler membranların üzerinden geçirilerek saatlik kontroller yapılarak deneme 4 saat süresince incelenmiştir (Şekil 5)



Şekil 5. Monosit geçişi deneysel prosedürünün grafiksel gösterimi

3.3.1.3. Nöron (SHSY5Y) Model Hücrelerin Kültürü

SHSY5Y hücreleri, nöron hücre modeli olarak kullanılmıştır. E.Ü. Biyomühendislik Bölümü Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı stoklarında bulunan SHSY5Y hücre hattı %10 FBS ve %0,1 penisilin-streptomisin içeren DMEM yüksek glikoz besi ortamı ile 37°C' de %5 CO₂, %95 nemli ortamda kültive edilmiştir. İki günde bir besi ortamı değiştirilen kültürler %70 konfluensiye ulaştığında uygun pasaj oranında pasajlanarak kültürün devamı sağlanmıştır. Hücrelerin bir kısmı ise çalışmaların sürdürülebilirliği için dondurulmuştur. SHSY5Y hücrelerinin dondurma ortamı % 90 serumlu besi ortamı ve % 10 DMSO'dan oluşmaktadır. Dondurma ortamında süspense edilen hücreler kriyotüplere alınarak 24 saat -86°C'de bekletildikten sonra, uzun süreli saklama koşullarını sağlayacak olan sıvı azot (-196°C) içerisine alınmıştır.

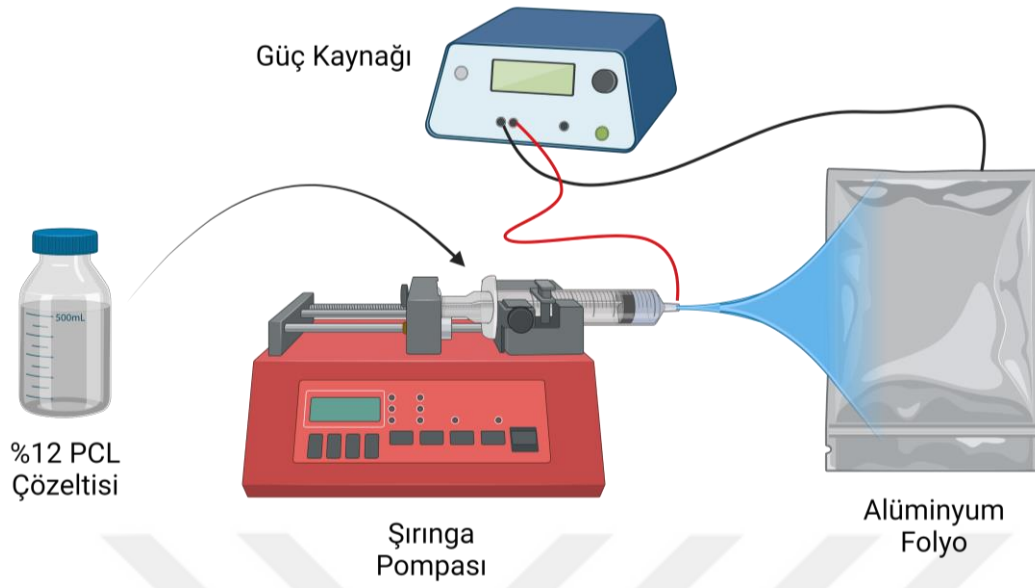
Apoptozun İndüklenmesi (Graney et al., 2020)

Kültürü devam ettirilen SH-SY5Y hücreleri Tripsin/EDTA uygulamasıyla kaldırılıp santrifüj tüplerine toplanarak hemasitometre ile sayılmıştır. Her denemede hücre canlılığının %85 ve üzeri olmasına dikkat edilmiştir. Her hücre için 105 hücre/mL konsantrasyon hesaplanarak 24 kuyulu kültür kaplarına ekilmiştir. Serumsuz besi ortamında 800 µM H₂O₂ (Merck) hücrelerin üzerine eklenerek 1 saat inkübasyon sağlanmıştır. Bütün apoptotik hücreler kullanılmadan önce PBS ile yıkanarak H₂O₂ kalıntıları uzaklaştırılmıştır.

3.3.2 Doku iskelesinin üretimi

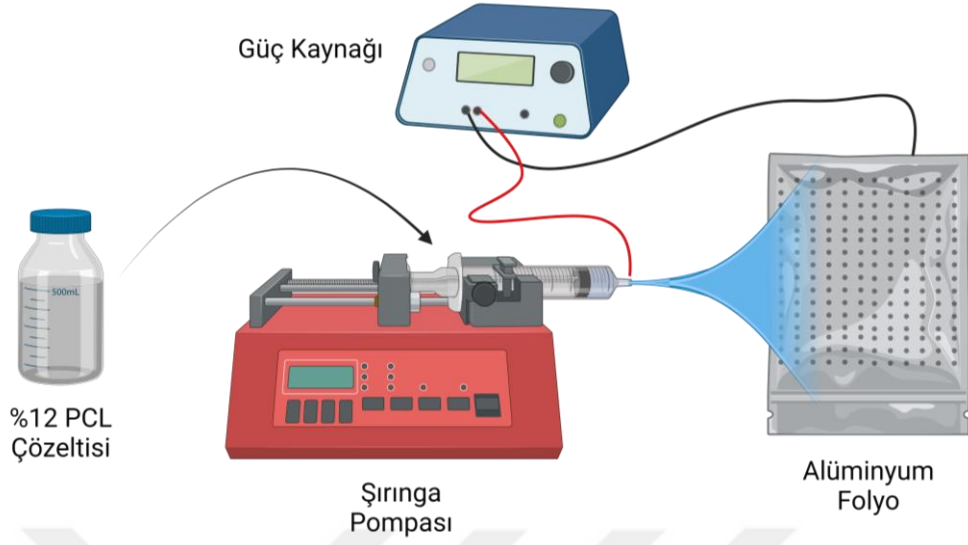
3.3.2.1 Elektroğrılmış PCL membran üretimi ve por optimizasyonu

%12 Polikaprolakton (PCL) 1:1 oranında dichloromethane (DCM) / dimethylformamide (DMF) içeren solüsyon içinde çözdürülerek enjektöre alınmıştır. PCL solüsyonunun eğrilmesi için elektroğirme ön deneyleri sırasında toplayıcı ve polimer çözeltisini içeren şırınga iğnesi ucu arasındaki mesafe 8-15 cm arasında, akış hızı 0,1 – 0,3 mL/sa arasında, uygulanan gerilim (voltaj) ise 10 – 25 kV arasında değiştirilerek, bu parametrelerin oluşan nanofibröz membran üzerindeki etkileri gözlenmiştir. Elektroğirme denemeleri 5x5 alüminyum toplayıcı plaka ve 10 mL şırınga kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 6. PCL elektroğirme grafiksel gösterimi.

PCL elektroğirme Şekil 6'da grafiksel olarak gösterilmektedir. Şırınga ucu ve metal plaka arasında yüksek gerilim oluşturularak elektroğirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde üretilen membranlar eğirme süresinde bağlı olarak $2\ \mu\text{m}$ 'den küçük por çığına sahip olmaktadır. Por çığı nanometre ölçeğine kadar küçültülebilmektedir. İmmün hücrelerin göçünü gösterebilmek için por çapının $6\ \mu\text{m}$ ile $10\ \mu\text{m}$ arasına çekilmesi hedeflenerek toplayıcı plakada lazer ile $50\text{-}100\ \mu\text{m}$ çapında delikler oluşturulmuştur. Eğirme işlemi gerçekleştirilirken bu porlarda iletkenlik olmadığı için kalan bölgelere daha çok fiber isabet ederken bu bölgelere daha az fiber isabet etmektedir. Bu sebeple Şekil 7'de gösterildiği üzere toplayıcıda delikler açılarak eğirme işlemi gerçekleştirilmiştir.



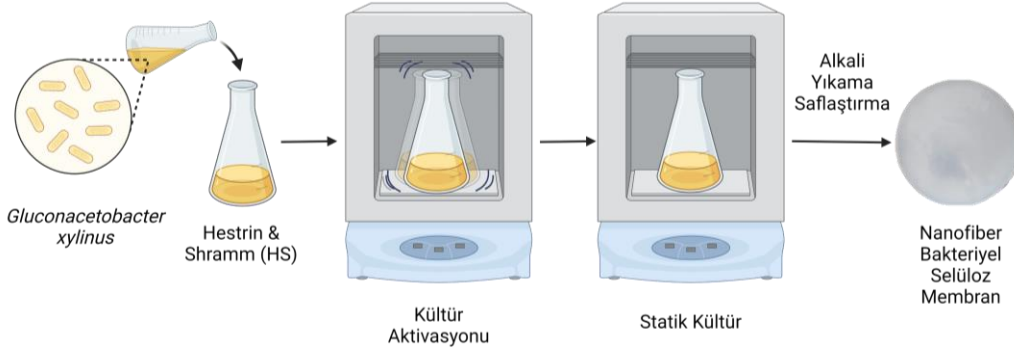
Şekil 7. Porlu PCL elektroğirme grafiksel gösterimi.

3.3.2.2 Bakteriyel selüloz (BS) doku iskelesinin üretimi, saflaştırılması ve por optimizasyonu

BS doku iskelelerinin, *Glucanobacter xylinum* kullanılarak (ATCC 700178, VA, ABD) üretilmiştir. Hestrin&Schramn (Hestrin ve Schramm 1954) besi ortamı (20 g glukoz, 2,7 g Na₂HPO₄, 5 g bakteriyolojik pepton, 5 g maya özütü, 1,15 g sitrik asit, 1 L deiyonize su, pH: 5,0-5,5) hazırlanmış ve 121°C de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Tabaka formunda BS üretmek için, 250 mL'lik Erlen Mayer'lere 100 mL çalışma hacminde %3 v/v oranında bakteri inokulasyonu yapılarak HS besin ortamı ile 28-30°C'de ve 150 rpm çalkalama hızında 24-36 saat inkübe edilerek hazırlanmıştır.

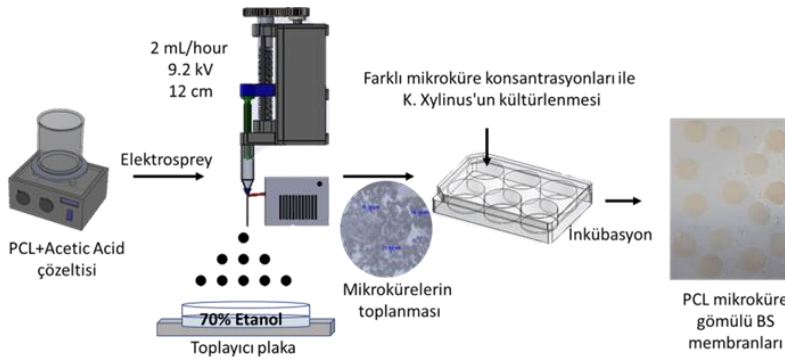
Kültürler 30°C'de 4-7 gün statik inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 5). Hasat edilen BS'ler saflaştırılmak üzere 1 gün boyunca 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde 80°C'de bekletilmiş ve yeni bir 0,1 M NaOH çözeltisine alınarak 20 dk süreyle kaynatılmıştır. Bu işlem distile su ile BS'nin rengi ağarana kadar devam ettirilmiş ve doku iskeleleri 121°C'de 15 dk otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

Membranların mekanik karakterizasyonları için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve dinamik mekanik analizi (DMA) yapılmıştır.

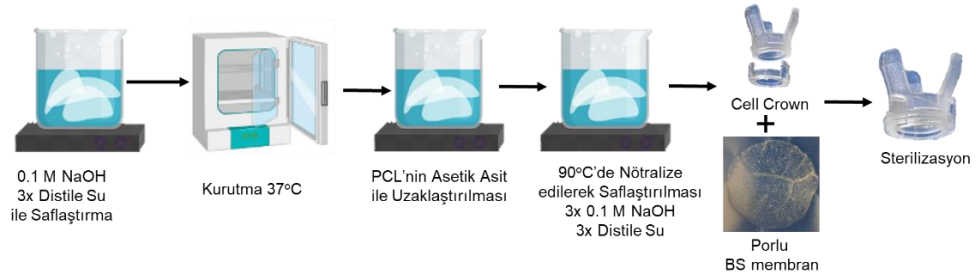


Şekil 8. BS üretiminin grafiksel özeti. *Gluconacetobacter xylinus* HS ortamında çalkalayıcı inkübatörde aktifleştirilerek aktif kültür ile 250 mL'lik Erlen Mayer'e inoküle edilmiştir. 5 gün statik olarak kültüre edilerek üretilen membran yapıda BS Alkali yıkama ile bakterilerden arındırılarak otoklav ile sterilize edilmiştir.

Klasik BS üretimi yöntemi ile 1 μm 'den küçük çaplarda gözenekler oluşmaktadır. İmmün hücrelerin göçünü inceleyebilmek için por çapının artırılması gerekmiştir. Bu sebeple statik kültüre başlanırken elektro püskürtme yöntemi ile elde edilen PCL mikro küreler ortama eklenerek 5 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra membranlara ısıl işlem uygulanmadan alkali yıkama yapılmış membranlar kurutularak PCL mikrokürelerin uzaklaştırılması için asetik asit ile kaynatılmıştır. Daha sonra 3 kez 0.1 NaOH ile 90°C'de alkali yıkama yapılarak bakteri artıklarının uzaklaştırılması ve nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



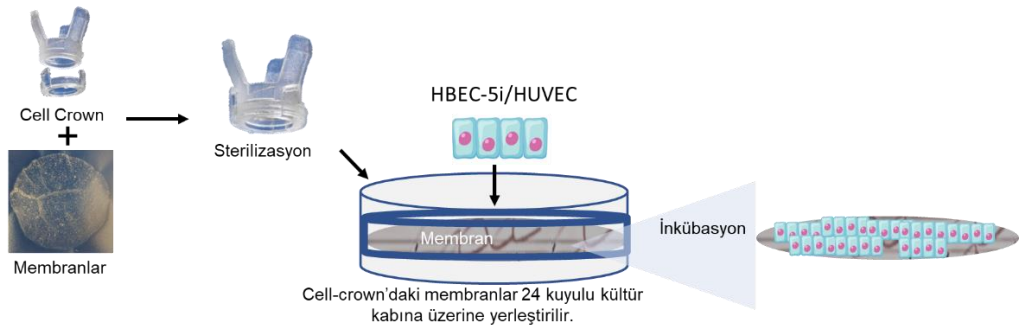
Şekil 9. Por yapıda BS üretiminin grafiksel özeti. Elektrospreyleme ile üretilen PCL mikroküreler hasat edilerek farklı konsantrasyonlarda *K.Xylinus* bakterisiyle kültive edilerek membranlar statik kültürde üretilmiştir.



Şekil 10. Por yapıda BS yıkama işleminin grafiksel özeti.

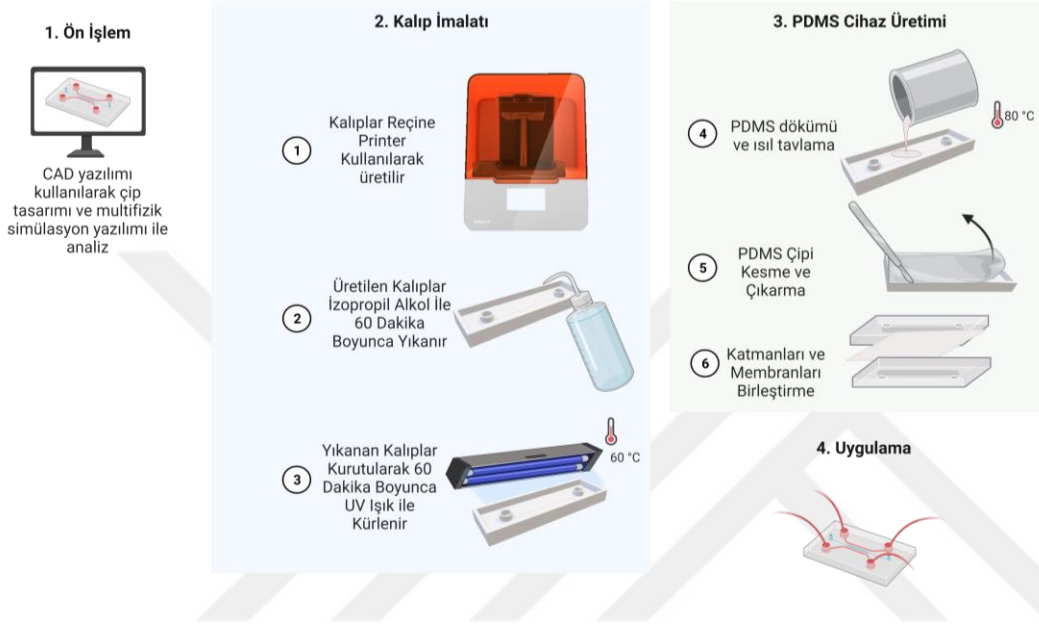
3.3.3 Statik *in vitro* KBB modelinin geliştirilmesi

Üretilen membranlar, membransız CellCrown (Z742380-12EA, Scaffoldex, Finlandiya) insertler üzerine sabitlenerek statik KBB modeli oluşturmak için uygun membranlı insertler oluşturulmuştur. Oluşturulan insertler 24 kuyulu kültür kabına alınarak besi ortamı eklenmiş ve 24 saat şartlandırmaya bırakılmıştır. 24 saat sonrasında besi ortamı çekilerek iskelenin luminal kısmına 105 hücre/iskele konsantrasyonda hücreler ekilerek 5 gün kültür devam ettirilmiştir. 1., 3. ve 5. günlerde TEER analizi yapılmış, 5. günde kültür sonlandırılarak IF analizi yapılmıştır (Şekil 7).



Şekil 11. Statik KBB modeli oluşturulma basamakları

3.3.4 Bilgisayarlı akışkanlar dinamiği ile fizyolojik koşullara uygun mikroakışkan platformun modellenmesi, simülasyonu ve üretimi



Şekil 12. PDMS bazlı mikroakışkan çip üretiminin gösterimi. 1) Comsol Multyphysics yazılımı kullanılarak akış parametrelerinin simülasyonu ve optimizasyonu ile çip geometrisinin belirlenmesi. Belirlenen geometrinin Cad yazılımları kalıplarının üretilmesi. Elde edilen çizimlerin baskıya hazır hale getirilmesi. 2) Kalıpların Formlabs 3B reçine printeri kullanılarak üretimi. Üretilen kalıpların reçineden uzaklaştırılması için izopropil alkol ile 60 dakika boyunca yıkanması. Son kürlenme işlemi için 60 dakika boyunca UV ışık ile kürlenmesi. 3) Üretilen kalıplara PDMS dökümlere 80 °C’de ısı olarak tavllanması. Üretilen PDMS plakaların membrana ve birbine yapıştırılması. 4) Elde edilen mikroakışkan platforma akış uygulanması.

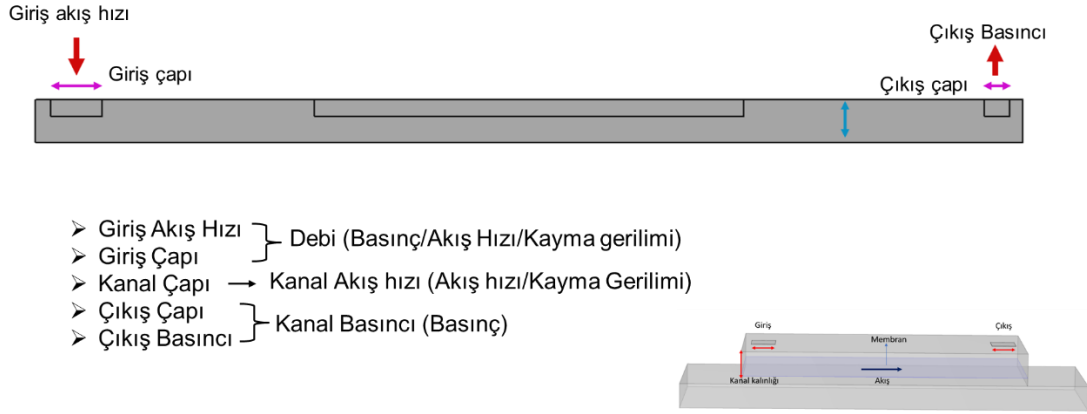
3.3.4.1. Çip üstü platformun tasarımı

Çipin tasarımı 3B olarak Comsol Multyphysics yazılımında oluşturulmuştur (Şekil 34). Tasarım 2 paralel kanaldan oluşmaktadır. Kanallar birbirinden hücre geçişine izin verecek şekilde yerleşmiş olan membranla ayrılmaktadır. Her iki yan kanalda ise kullanım amacına bağlı olarak (statik/dinamik) besiyeri eklenmesine imkan veren kanal giriş-çıkış portları bulunmaktadır. Platform boyut ve geometrisi yeterli hücreyi barındırabilecek görüntü almada kullanılabilir aynı zamanda kullanılan

hücre miktarını minimize edecek ve fizyolojik koşulları en iyi oranda simüle edecek şekilde belirlenmiştir.

3.3.4.2. Comsol multiphysics yazılımı ile akışın simülasyonu, optimum çip-üstü platform boyutların belirlenmesi ve dinamik akış modelinin optimizasyonu

Model öncelikle 3B olarak Comsol Multiphysics yazılımında modellenmiş “Giriş-Çıkış çapı, kanal derinliği, kanal çapı, kanal uzunluğu,viskozite ve akış hızı” parametreleri ile optimum fiziksel koşulların belirlenmesi için çalıştırılmıştır. Ancak bu işlem çok uzun vakit almış ve çözümlenememiştir. Bu sebeple çalışma süresini minimize etmek için 2 boyutlu olarak Comsol Multyphysics yazılımında yeniden modellenmiştir. 2 Boyutlu model belirlenen aralıklarla uygun olarak geometrinin oluşturulması için ayrı, akış hızının ve viskozitenin belirlenmesi için ayrı olarak optimize edilmiştir. Elde edilen geometri, akış ve viskozite değerleri 3 boyutlu modelde denenerek gösterilmiştir. Tüm modeller membran özelliklerinin olduğu ve olmadığı durumlar için değerlendirilmiştir. Membranların porozite özelliklerinin belirlenmesi gerekliliği görülmüştür. Bu sebeple bir sonraki dönemde optimize porlu membranların porozite değerleri belirlenerek akış hızı ve viskozite simülasyonları tekrarlanacaktır. Membran özelliklerinin dikkate alındığı modellerde serbest ve gözenekli ortam akışı ve Darcy’s Law kanunu kullanılmıştır. Membran özelliğinin dikkate alınmadığı modellerde fizik laminer akış olarak modellenmiştir. Optimizasyon için farklı algoritmalar kullanılarak geometri ve fiziksel koşul değer aralıklarında model parametrik olarak güncellenerek optimize edilmiştir. Geometri optimizasyonu için Monte Carlo metodu kullanılırken fiziksel özelliklerin optimizasyonunda MMA (Method of Moving Asymptotes) metodu kullanılmıştır. Geometri optimizasyonu sonucunda elde edilen binin üzerindeki sonuç değerlendirilerek yeterli hücre miktarı ve görüntülemeye uygun olacak şekilde ve belirlenen fiziksel özelliklere en yakın oranları karşılayacak şekilde model geometrisi belirlenmiştir.



30

Şekil 13. Comsol Multyphysics ile geometri parametreleri ve optimizasyonu.

3.3.4.3 3 boyutlu yazıcı ile kalıp üretimi

Çip tasarımı luminal, abluminal ve membran kısmı 3 farklı katmana bölünerek kalıpları Formlabs Form 3B Reçine printer ile üretilmiştir. Kalıpların çiziminde Solidworks programı kullanılmıştır. Çizimler Preform yazılımına yüklenerek baskıya hazırlanmıştır. Kalıp baskısında Formlabs Clear V4 reçine kullanılmıştır. Preform yazılımında bu reçine seçilerek 0.050 mm katman kalınlığı seçilmiştir. Preform yazılımında tasarımlara gerekli destekler atılarak baskıya hazır hale getirilmiştir. 3 Boyutlu yazıcıya Clear V4 reçine ve tankı takılmıştır, Reçinenin üst kapağı açılıp baskı platformu takılarak yazıcı hazır("prime") hale getirilmiştir. Preform yazılımında hazırlanan model yüklenerek baskı alınmıştır. Baskı tamamlandıktan sonra baskı platformu yazıcıdan çıkarılarak baskı spatula yardımı ile platformdan kaldırılmıştır. Elde edilen baskılar desteklerden ayrılarak %99.9 izopropil alkole alınmıştır. 10 dakika alkole muamele edilmiştir. Muamele sonrası elde edilen baskılar 2 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan baskılar Anycubic Wash & Cure 2.0 cihazına alınarak 2 saat boyunca ikincil kütleme ("Post Cure") işlemine tabi tutulmuştur. Bu şekilde kalıplar elde edilmiştir. Hortum ara bağlantıları da aynı yöntem ile ancak biyouyumlu olan Formlabs Biomed Clear Reçine ile basılarak kalıba eklenmiştir.

3.3.4.4. Membranlı çipin üretimi

Sylgard 184; PDMS polimer ve çapraz bağlama bileşenleri 10:1 oranında karıştırılmıştır. Hava kabarcıkları desikatörde vakumlanarak çıkarılmış, ardından karışım reçine kalıplar üzerine dökülmüştür. Desikatörde tekrardan vakumlanarak inkübatöre alınmıştır. 40°C’de 48 saat inkübe edilerek PDMS yapılar kürlenmiştir. Bistüri yardımı ile PDMS yapılar kalıptan çıkarılarak çip için hazırlanmıştır. PDMS yapılar izopropil alkol (IPA), etanol ve distile su ile sırasıyla yıkanarak kurutulmuştur.

Kürlenmemiş PDMS karışımı petrinin ortasına damlatılarak sabit hızda döndürülmüştür. Bu sayede homojen bir PDMS karışımı tabakası elde edilmiştir. Desikatöre alınarak vakumlanmış ve hava kabarcıkları çıkarılmıştır. Sonrasında bu yüzey üzerine PDMS tabakalar yapıştırılacakları yüzeyleri denk gelecek şekilde alınmıştır. Tabakalar önce membrana sonra birbirlerine bu şekilde yapıştırılmıştır. Ancak 4 ayrı tabakanın bir birine yapıştırılmasının güçlüklerinden (bulaş, standardizasyon, yüksek hata oranı) ötürü PDMS’in içinde membran ile birlikte kürlenmesine imkan veren kalıp tasarımı yapılmıştır. Bu sayede 3 katmanda üretim sağlanmıştır. Bu kalıp iki ayrı parçadan oluşmaktadır. Membran kalıp ve ikinci parça arasına mıknatıslar yardımıyla sıkıştırılarak PDMS’in bu alana girişi kısıtlanmıştır. Sonrasında PDMS kalıba dökülerek desikatörde vakumlanmış ve kürlenmiştir. Elde edilen 3 tabaka kimyasal yapıştırma yöntemi ile yapıştırılarak çip oluşturulmuştur.

Bakteriyel selüloz membranlı çipler başarıyla PDMS tabakalara entegre edilerek üretilmiştir.

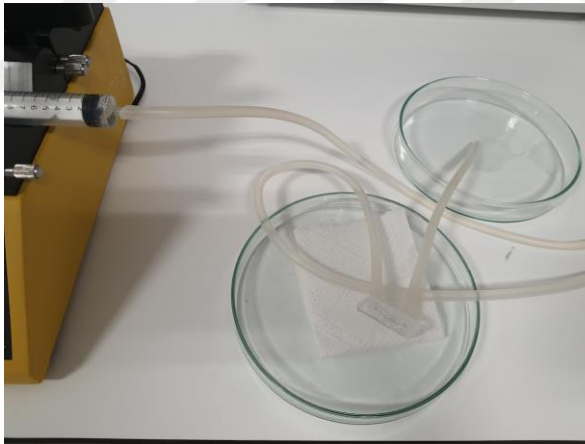
3.3.4.5. Çiplerin yıkama süreci



Şekil 14. Çiplerin temizlenmesi: çipler sırasıyla isopropil alkol, etanol ve su yıkamalarına maruz bırakılarak kirlilikler ve kalıntılar uzaklaştırılmıştır.

3.3.4.6 Sızdırmazlık deneyi

Çip üstü platformda basınç uygulandıktan sonra akış halinde 5 gün gözlemlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 15. Sızdırmazlık denemesi; 5 gün akışta bırakılan çipte bir sızıntı gözlemlenmemiştir.

3.3.5 Dinamik *in vitro* KBB modelinin geliştirilmesi

Elde edilen mikroakışkan platform etilen oksit ile kimyasal olarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında 1 gün havalandırılmıştır. Steril platformlar Biyogüvenlik 2 kabinde aseptik koşullarda açılmıştır. Platformun içine şırınga yardımıyla hazır ortam (DMEM-F12, %10 FBS, %1 L-Glutamin, %0,1 Pen-strep)

eklenerek 1 gece inkübatörde 37°C’de şartlanmaya bırakılmıştır. Ertesi gün şartlanan platformların içindeki şartlanma ortamı çekilerek 10^6 hücre/ml konsantrasyonda ortam eklenmiş hücre tutunmasını sağlamak için 1 gece 37°C CO₂’li inkübatöre bırakılmıştır. Ertesi gün platform şırınga pompasına bağlanarak akış hızı 0.02 mm/sn’den başlanıp 3 saatlik periyotlarla 0.02 mm/sn arttırılarak tablo 8’de belirlenen 2 mm/sn hıza getirilmiştir. Hedef hıza ulaşıldıktan sonra kültür bir gece daha sürdürülmüş, *in vitro* KBB modeli elde edilmiştir.

3.3.6 *in silico* KBB modelinin geliştirilmesi



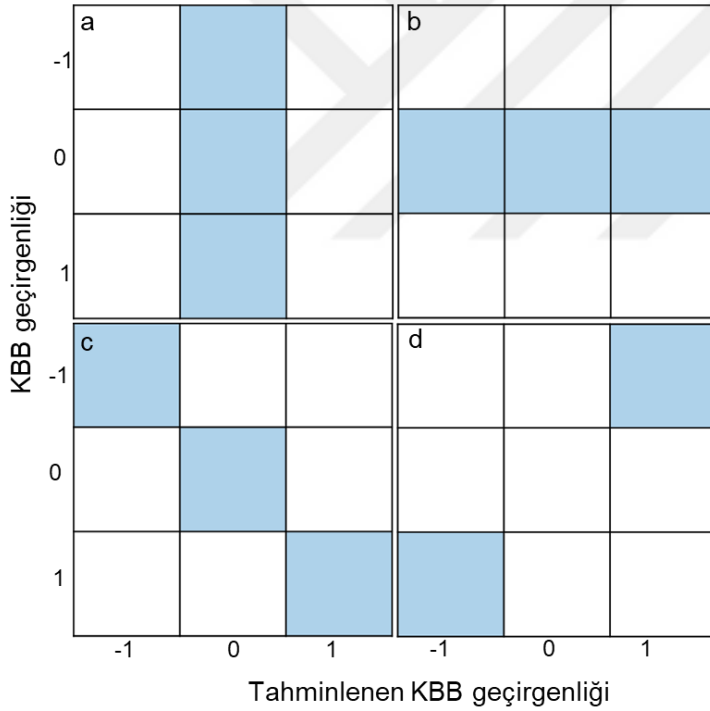
Şekil 16. *In silico* modelin geliştirilmesinde izlenen adımlar.

3.3.6.1 Verilerin elde edilmesi ve işlenmesi

PAMPA analizi yapılmış moleküllerin kimyasal özellikleri ve analiz sonuçları MATLAB programı ile PubChem üzerinden çekilmiştir. Pubchemde yer alan 2400’den fazla molekülü içeren yaklaşık 240 yayın incelenmiştir. Elde edilen verilere veri madenciliği yapılarak “Hidrojen Bağ Alıcısı”, "Hidrojen Bağ Donörü", "XLogP3", "Tam Moleküler Ağırlık" ve "Kutup Yüzey Alanı” verileri ve “Permeabilite” verileri elde edilmiştir. Elde edilen veriler ile gerekli hesaplamalar yapılarak eş birimli ve tüm parametrelerin bilgisi mevcut olacak şekilde veriler işlenmiştir. KBB geçirgenlikleride hedef molekül ile eşleştirilerek veri tablosuna eklenmiştir.

3.3.6.2 Elde edilen verilerin eğitimi

Elde edilen veri tablosu MATLAB programı üzerinden “Classification Learner” uygulaması aracılığı ile “Tree”, “Discriminant”, “Naive Bayes”, “SVM”, “KNN”, “Ensemble”, “Neural Network”, “Kernel” yöntemleri farklı algoritmalar eşliğinde eğitilmiştir. Eğitimler belirlenen 5 parametrenin 5’ine karşılık ve yalnızca “XLogP3” ve “Kutup Yüzey Alanı” parametrelerine karşılık olarak tekrarlanmıştır.



Şekil 17. Elde edilen 3'lü confusion matrix'lerin gösterimi. A) Modelin Tanımsız olarak belirlediği grubun gösterimidir. B) Modelin tanımsız olarak belirlemesi gereken grubun gösterimidir. C) Modelin yaptığı doğru tanımlamaların gösterimidir. D) Modelin yaptığı yanlış tanımlamaların gösterimidir.

| | |
|--|--|
| | |
| | |

Şekil 18. Elde edilen 2'li confusion matrix'lerin gösterimi şekilde mavi alan doğru tahminleri beyaz alan ise yanlış tahminlerin gösterimidir.

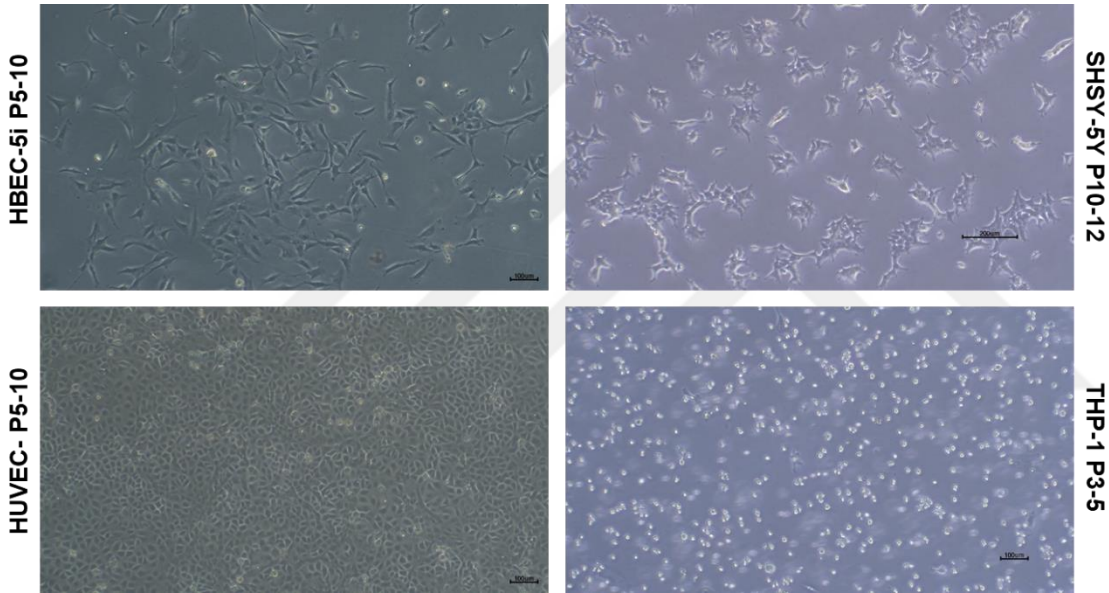
3.3.7. Geliştirilen Modellerin Karşılaştırılması

Geliştirilen *in vitro* ve *in silico* modeller literatürde KBB permeabilitesi bilinen moleküllere karşı analiz edilerek elde edilen sonuçlar literatürle ve modellerin birbirleri ile karşılaştırılmıştır. *In vitro* modeller için inflamasyon varlığında ve yokluğunda monosit geçişi bakılmıştır. Ayrıca Lucifer Yellow, Dextran 70Kda, Aspirin, Laktoz, Kafein ve Euthyrox molekülleri de bu modellere uygulanarak birbirleri ile ve literatür ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre kültürü

Tez çalışmasında insan beyin endotel hücre hattı (HBEC-5i,8-12 pasaj aralığında), ve akut monositik lösemi insan monositik hücre hattı (THP-1) kullanılmıştır. Hücrelerin uygun kültür koşullarındaki morfolojik gözlemleri, ters faz ışık mikroskobu (DMIL LED Fluo Mikroskop, CT90118000, Leica, Almanya) kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 19. Kullanılan morfolojilerinin ışık mikroskobunda gösterimi. Ölçek çizgisi SHSY-5Y hücrelerinde 200 diğer hücrelerde 100 μm 'yi göstermektedir.

4.2. Doku İskelesi Üretimi

4.2.1. Elektroğrılmış PCL membran üretimi ve por optimizasyonu

PCL solüsyonunun eğrilmesi için elektroğirme ön deneyleri sırasında toplayıcı ve polimer çözeltisini içeren şırınga iğnesi ucu arasındaki mesafe 8 – 15 cm arasında, akış hızı 0,1 – 0,3 mL/h arasında, uygulanan gerilim (voltaj) ise 10 – 25 kV arasında

değiştirilerek, bu parametrelerin oluşan nanofibröz membran üzerindeki etkileri gözlenmiştir. Elektroegirme denemeleri 5x5 alüminyum toplayıcı plaka ve 10 mL şırınga kullanılarak yapılmıştır (Şekil 14).



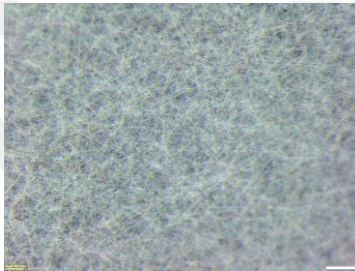
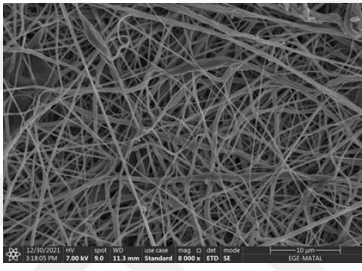
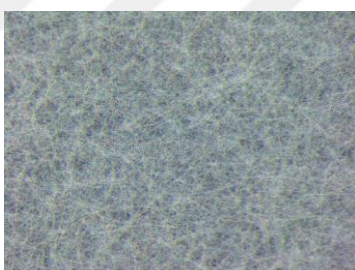
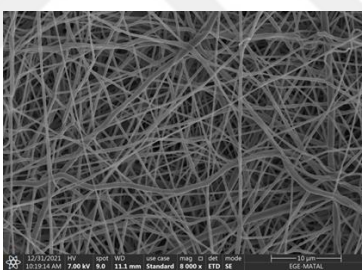
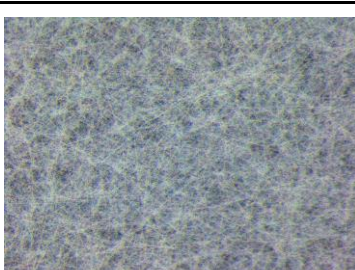
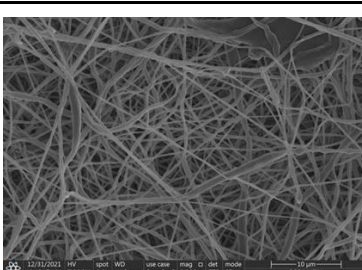
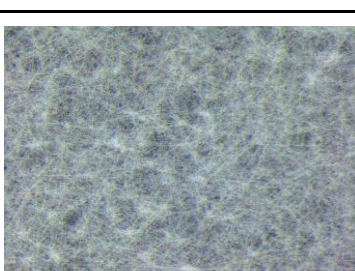
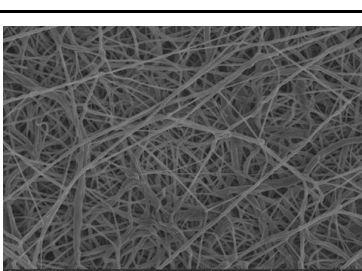


Şekil 20. Elektroegirme düzeneği ve membranların iskele tutuculara yerleştirilmesi.

Stereomikroskopta bütün parametrelerde homojen fiber dağılımı gözlemlenmiş olup çalışılan parametrelerin SEM analizi yapılmıştır. SEM analizinde Tablo 2’de görüldüğü gibi fiber yapıları; fiberlerin kalınlıkları, fiberlerin birbirlerine benzer, boncuk oluşumu olmadan düzgün fiberler elde edilebilme ve yapının homojen oluşu kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Farklı parametreler uygulanarak oluşturulan PCL fiberlerin SEM fotoğraflarının değerlendirilmesi sonucu, oda sıcaklığında, fiber yapısına göre en uygun şartların 0.5 mL/saat hız, 15 kV voltaj farkı ve 15 cm toplayıcı-plaka uzaklığı parametreleri olduğu belirlenmiştir. Bu eğirme şartında fiberlerin homojen çaplara sahip olduğu görülmektedir.

Belirlenen şartta üretilen PCL membranlar mekanik karakterizasyon amacıyla DMA analizine gönderilmiştir.

Tablo 2. PCL elektroğirmesinin optimizasyonunda kullanılan parametreler

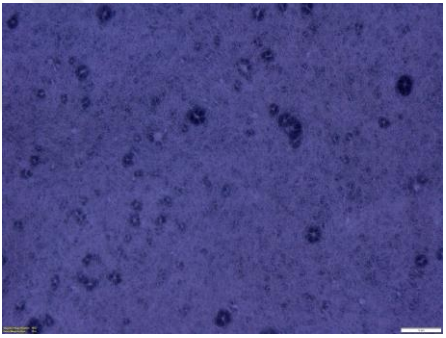
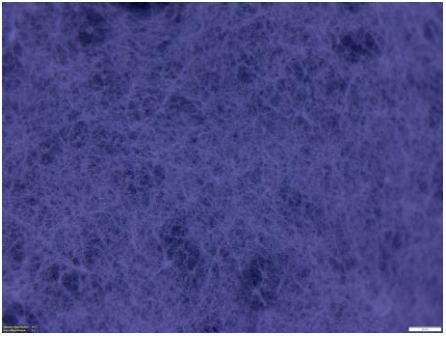
| Malzeme | Eğirme Şartları | Fiber Yapısı | |
|---------|----------------------------|---|--|
| | Uzaklık, Akış Hızı, Voltaj | Steremikroskop | SEM |
| PCL | 15 cm, 1.5 mL/sa, 15 kV |  |  |
| PCL | 15 cm, 3.25 mL/sa, 15 kV |  |  |
| PCL | 15 cm, 2.25 mL/sa, 15 kV |  |  |
| PCL | 15 cm, 3.5 mL/sa, 15 kV |  |  |
| PCL | 15 cm, 3.5 mL/sa, 20 kV |  |  |

PCL membranlarda por çapı optimizasyonu için farklı polimerlerle karışımlarının eğrilmesinin denemeleri yapılmıştır. Ek polimerin seçiminde dikkat edilen parametreler;

- PCL'nin çözündüğü çözümden çözünmemesi
- Seçilen polimerin PCL ile etkileşime girmemesi
- Eğirme sonrasında PCL'den kolayca uzaklaştırılabilmesi
- Uzaklaştırılması sürecinde PCL fiber yapısında bozulmalara sebep olmaması

Bu parametreleri sağlayan PEO, PVA ve Sukroz (tanecik boyutu<100 um) ile PCL karıştırılarak eğrilmiştir.

Tablo 3. PCL por elektroegirme optimizasyonunda kullanılan parametreler

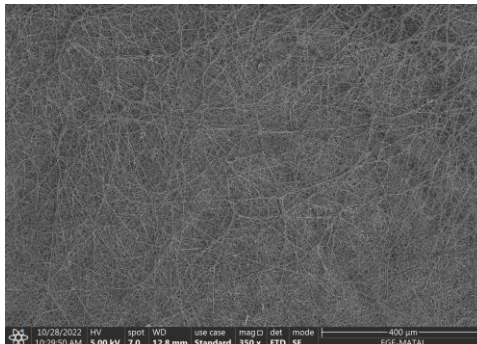
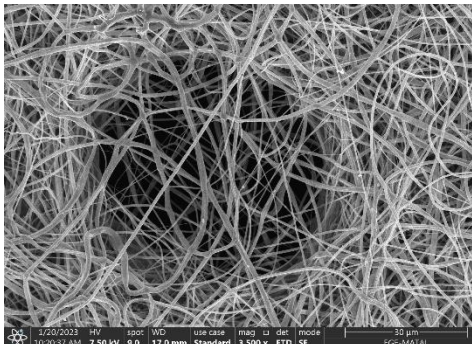
| Malzeme | Çözgen | Eğirme Şartları | Fiber Yapısı |
|---------------------------|-------------|---|--|
| | | Uzaklık, Akış Hızı, Voltaj | |
| PCL(% 12)+ Sukroz(% 1) | Asetik asit | 20 cm, 2.55 mL/sa, 1.4 kV |  <p>Homojen fiberler ve por oluşumları gözlemlenmiştir.</p> |
| PCL(% 12)+ Sukroz(% 1) | Asetik asit | 20 cm, 2.55 mL/sa, 1.3 kV |  <p>Homojen fiberler ve por oluşumları gözlemlenmiştir.</p> |
| PCL(% 12)+ Sukroz(% 1) | Asetik asit | 15-20 cm, 0.5-2.55 mL/sa, 1.5-2.5 kV | Fiber oluşumu gözlemlenmemiş, polimer püskürtme formunda toplayıcı levhaya |

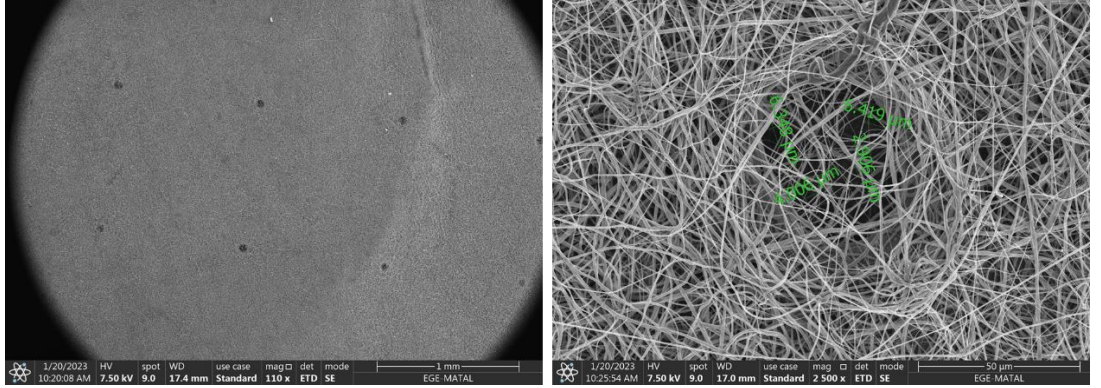
| | | | |
|--|--|--|-------------|
| | | | ulaşmıştır. |
|--|--|--|-------------|

Tablo 3'teki stereomikroskop fotoğrafların membranlarda por oluşumlarının gözlemlendiği görülmektedir. 20 cm uzaklık, 2.55 mL/h akış hızı, 1.4 kV potansiyel farkta eğirilen PCL(%12): Sukroz (%1) karışımında istenilen boyutlara yakın porlar gözlemlendiği için bu parametrelerde üretilen membranlar SEM analizine gönderilmiş ve por boyut dağılımı analiz edilmiştir.

Üretilen membranların por oluşumlarının morfolojik olarak incelenmesi amacıyla SEM analiz yöntemi kullanılmıştır. Membranlar Ege Merkezi Araştırma Laboratuvarı (Ege MATAL)'da SEM analizine götürülmüş, altınla püskürtme-kaplama yapıp SEM cihazında incelenmiştir. Tablo 4'de membranların doğal ve por oluşturulduktan sonraki SEM görüntüleri verilmiştir. SEM analiziyle elde edilen görüntüler Image J görüntü işleme programında işlenerek, membranların ortalama gözenek yapısı ve boyutları belirlenmiştir.

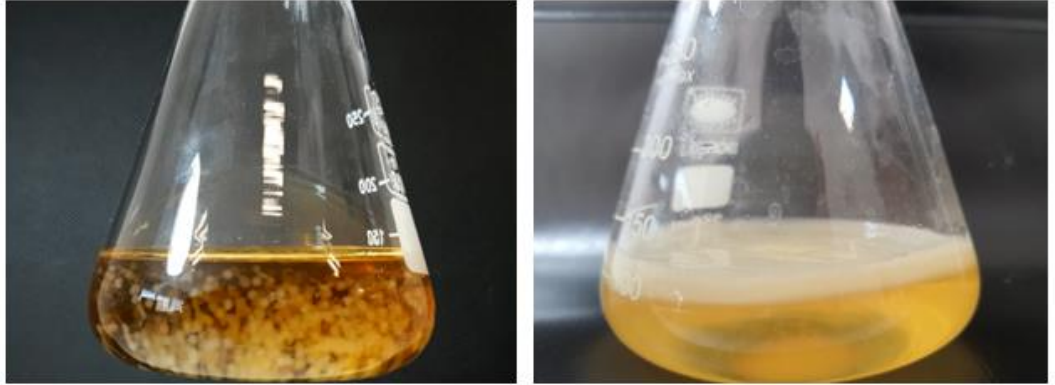
Tablo 4. PCL membranların doğal ve por oluşturulduktan sonraki SEM görüntüleri.

| Malzeme | Doğal | Por Oluşturulan |
|---------|---|--|
| PCL |  |  |



Şekil 21. Elektroğrılmış PCL membran SEM ile gösterimi.

4.2.2. Bakteriyel selüloz membran üretimi ve por optimizasyonu



Şekil 22. BS üretim aşamaları a. Aşı kültürü b.7 günlük inkübasyon sonrası sıvı-hava arayüzeyinde oluşan bakteriyel selüloz

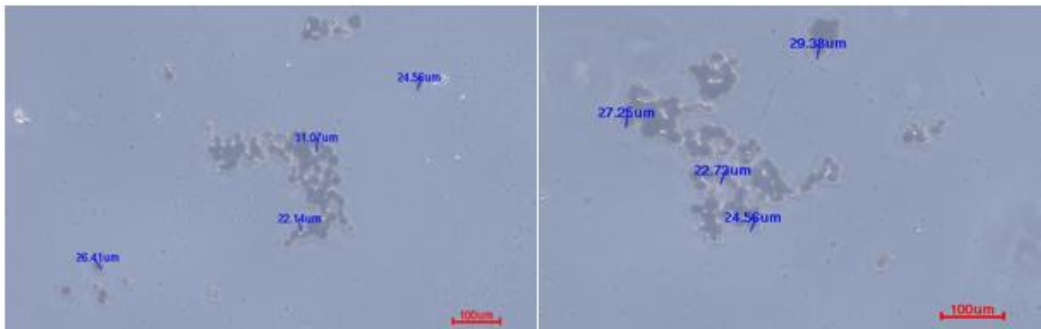
30°C’de 4-7 gün statik inkübasyona bırakılan iskeleler (Şekil 16).



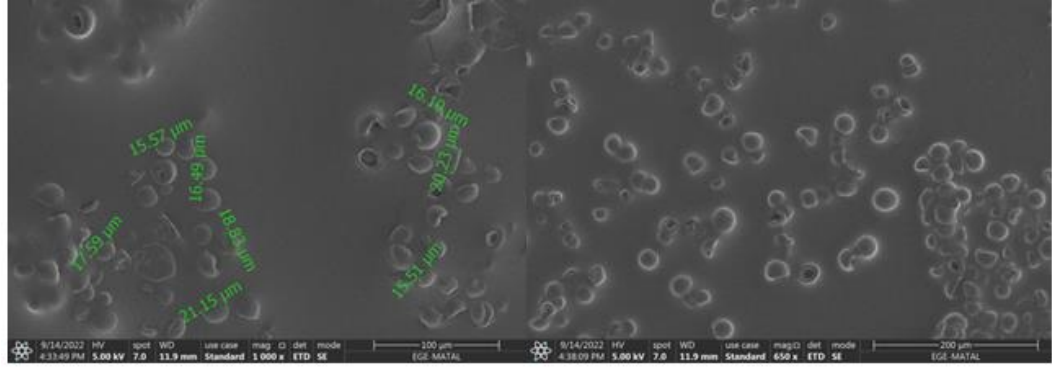
Şekil 23. Saflaştırma ve durulama sonrası BS membran

Membranların mekanik karakterizasyonları için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve dinamik mekanik analizi (DMA) yapılmıştır.

BS membranlarda por oluşturulması üretim aşamalarında PCL mikroküreler kullanılarak sağlanmıştır. PCL polimerinden mikroküre oluşturulmasında elektrosprey tekniği kullanılmıştır. %12 oranında glasiyal asetik asit içerisinde çözdürülen PCL 9.2 kV, 2 mL/h akış hızıyla 12 cm mesafedeki %70 etanol bulunan toplayıcı hazneye gönderilmiş ve kürecikler oluşturulmuştur. Mikroküreler ışık mikroskobu (Şekil 19) ve SEM’de (Tablo 5) incelenmiş ve parçacık boyut dağılım analizi yapılmıştır.

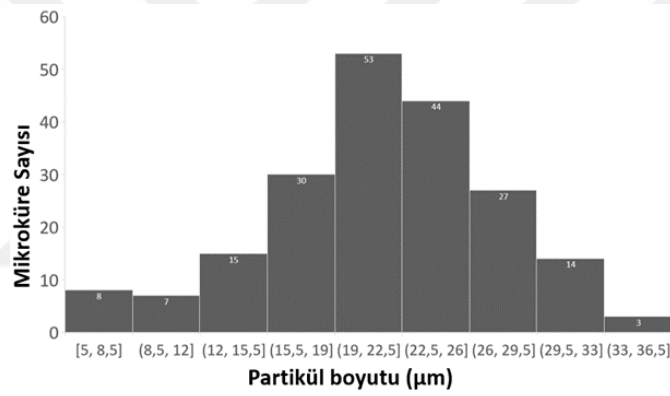


Şekil 24. Mikrokürelerin ışık mikroskobundaki görüntüleri. Mikrokürelerin ortalama çaplarının 15-30 µm arasında olduğu görülmektedir. Ölçek çizgisi 100 µm’yi göstermektedir.



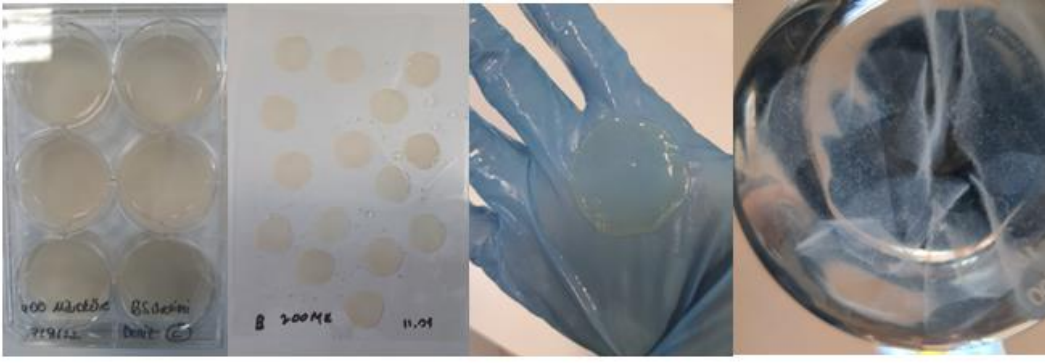
Şekil 25. Mikrokürelerin SEM görüntüleri. Mikrokürelerin ortalama çaplarının 15-30 µm arasında olduğu görülmektedir.

ImageJ programı ile yapılan analizde elektrosprey ile 2 mL/saat, 12 cm mesafe ve 9.2 kV koşullarında üretilen mikrokürelerin partikül boyutu dağılımının 15-30 µm aralığında olduğu gösterilmiştir (Şekil 19).

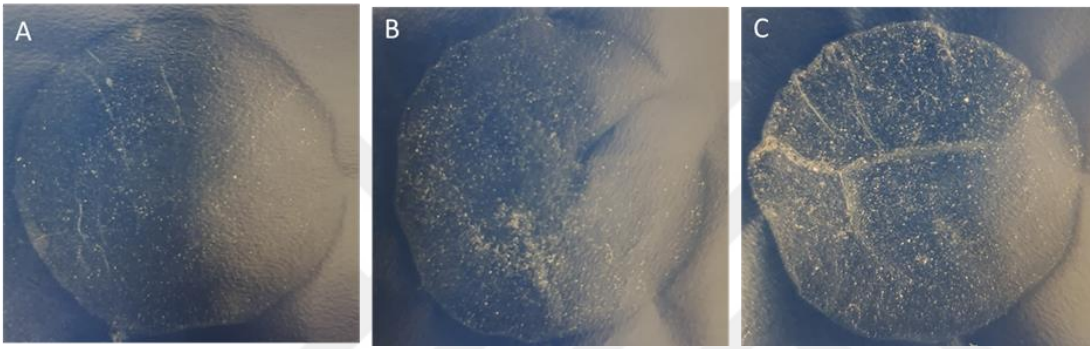


Şekil 26. Elektrosprey yöntemiyle elde edilen mikrokürelerin partikül boyut dağılım grafiği. Mikrokürelerin partikül boyutu dağılımının 15-30 µm aralığında olduğu gösterilmiştir.

BS membranlarda por oluşturulabilmesi için tabaka formunda BS üretim aşamasında HS besin ortamı içerisine partikül boyutu dağılımı 15-30 µm olan mikrokürelerden 3 farklı konsantrasyonda ($0,8 \times 10^4$ mikroküre/mL, $1,6 \times 10^4$ mikroküre/mL, $3,2 \times 10^4$ mikroküre/mL) PCL mikroküreler eklenmiş ve 28-30°C'de, çalkalamasız ortamda 24-36 saat inkübe edilerek hazırlanmıştır (Şekil 21).



Şekil 27. Porlu BC membran üretim aşamaları. Membran halinde BS'lere entegre olmuş PCL mikroküreler görünmektedir.



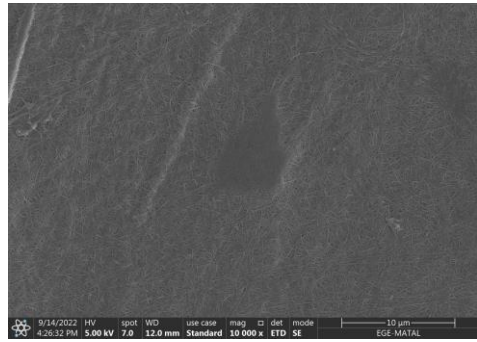
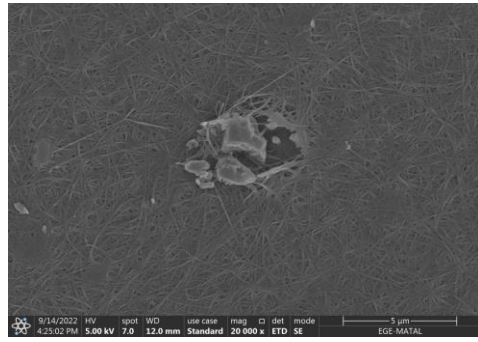
Şekil 28. PCL mikrokürelü BS membranlar. A) $0,8 \times 10^4$ mikroküre/mL, B) $1,6 \times 10^4$ mikroküre/mL C) $3,2 \times 10^4$ mikroküre/mL. Membran halinde BS'lere entegre olmuş PCL mikroküreler görünmektedir.

Hasat edilen BS membranları saflaştırılmak üzere 1 gün boyunca 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde 40°C 'de opak görünüm kazanana kadar bekletilmiştir. BS membranın mikrokürelerin etrafını sararak üretildiği ve mikrokürelerin zara entegre kaldığı görülmektedir (Şekil 22).

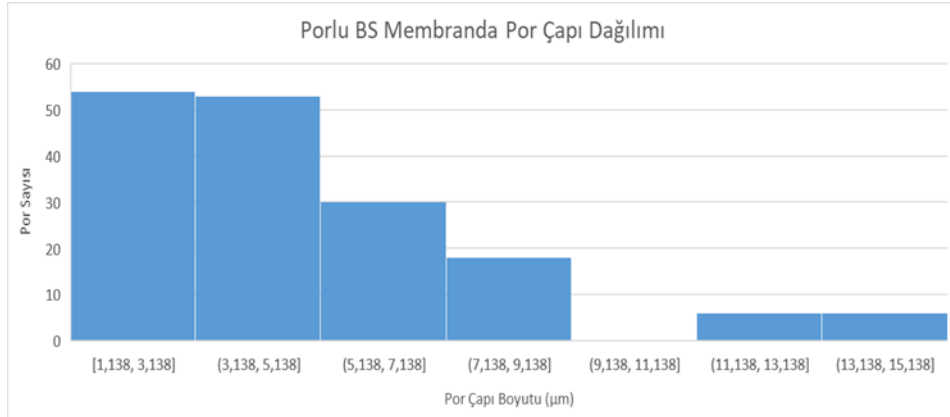
Daha sonra PCL mikrokürelerin uzaklaştırılması için membranlar glasiyal asetik asit içerisinde kaynatılmış ve PCL mikrokürelerin çözünmesi sağlanmıştır. PCL'ler uzaklaştırıldıktan sonra tekrar 2 saat 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde kaynatılmış ve bu şekilde saflaştırma aşaması tamamlanmıştır. Durulama aşamasında ise membranlar ultrasaf su ile yıkanmıştır.

Membranlar kurutulduktan sonra SEM analizi yapılmıştır.

Tablo 5. BS membranların doğal ve por oluşturuldan sonraki SEM görüntüleri.

| Malzeme | Doğal | Por Oluşturulan |
|---------|---|---|
| BS |  |  |

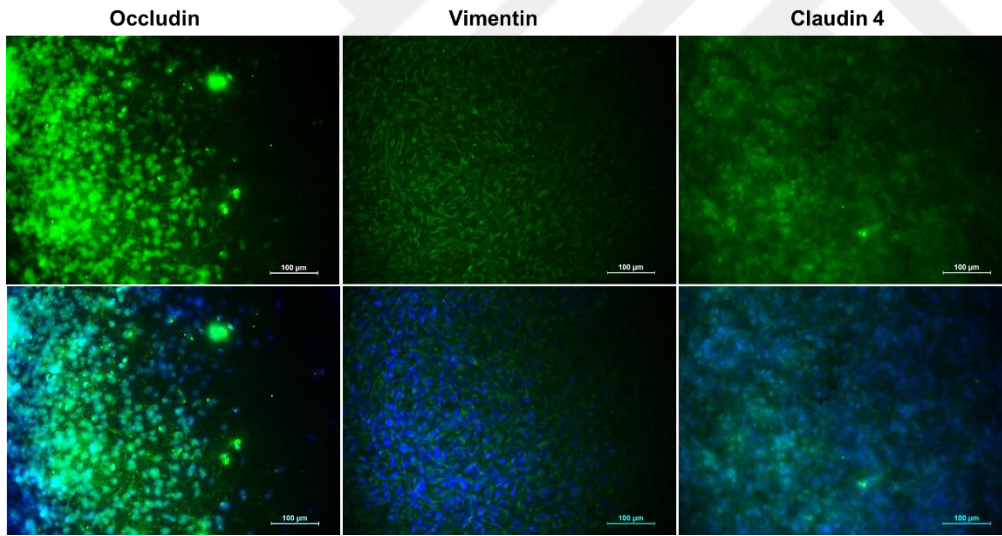
Membranların por boyut dağılımları SEM görüntüleri üzerinden ImageJ programıyla yapılmıştır. PCL mikrokürelerinin uzaklaştırma işleminden sonra Image J ile SEM üzerinde yapılan analizde, üç farklı mikroküre konsantrasyonunda daoluşan por çaplarının ortalama 1-5 μm olduğu görülmüştür. Yoğun porozite KBB yapısını zayıflatabileceği için $0,8 \times 10^4$ mikroküre/mL konsantrasyonda PCL mikroküre kullanılarak üretilen BC membranlarla devam edilmesine karar verilmiştir.



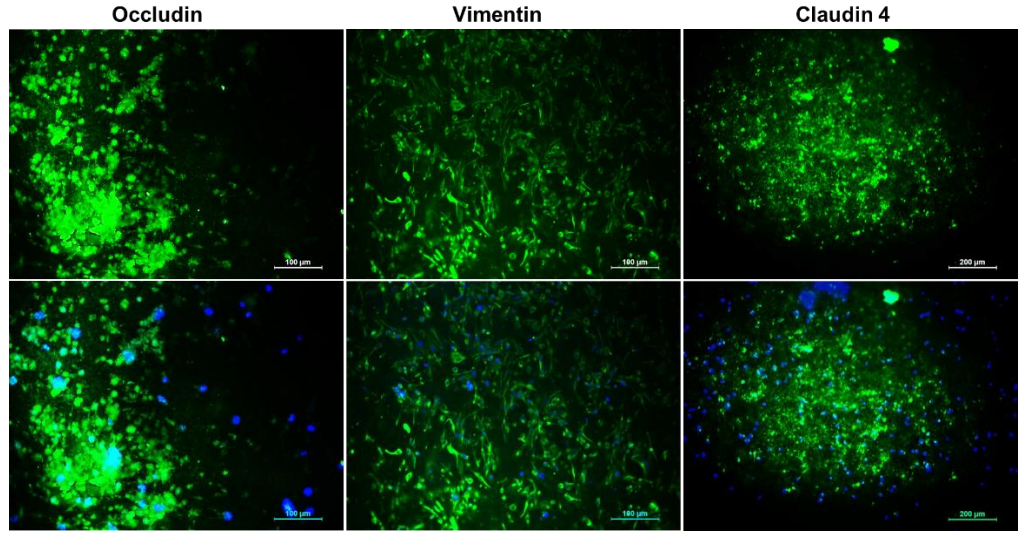
Şekil 29. BS membranda PCL mikrokürelerin uzaklaştırılmasıyla oluşturulan por çaplarının dağılımı. Ortalama por çap boyutlarının 1-5 μm arasında olduğu görülmektedir.

4.3. Statik *in vitro* KBB modelinin Geliştirilmesi

Elde edilen iskeleler Cell Crownlara takılarak etilen oksit sterilizasyonuna maruz bırakılmıştır. Steril crownlar Biyogüvenlik 3 kabinde açılarak 24 kuyucuklu tabakalara yerleştirilmiştir. Cell Crownların olduğu kuyulara ve Cell Crownlar'ın üzerine hazır besi ortamı eklenerek 3 saat şartlanmaya bırakılmıştır. Şartlanan iskelelerin üzerinden şartlanma ortamı çekilerek 10^5 hücre/mL konsantrasyonda hücre ekimi yapılmıştır. Kültür 5 gün devam ettirilerek Occludin, Vimentin ve Claudin 4 sıkı bağlantı belirteçleri ile immünoflorosan boyamalar yapılmıştır. Boyamalar HUVEC ve Hbec-5i hücreleri için ayrı ayrı yapılmıştır. Şekil 30 ve Şekil 31'de hücrelerin sıkı bağlantı proteinlerini eksprese ettiği görülmektedir.



Şekil 30. HUVEC hücreleri kullanılarak oluşturulan KBB modelinin IF görüntü boyamaları. Ölçek çizgisi 100 µm'yi göstermektedir.

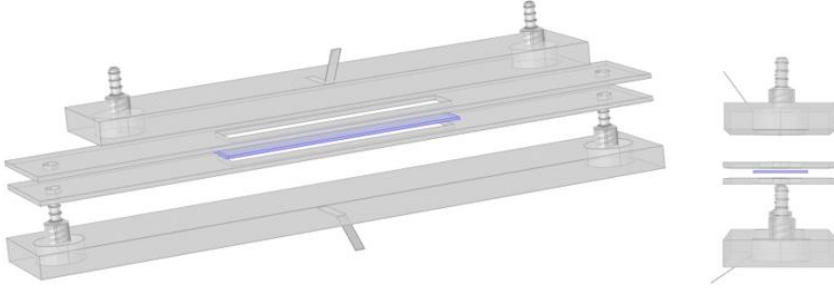


Şekil 31. HBEC-5i hücreleri kullanılarak oluşturulan KBB modelinin IF görüntü boyamaları. Ölçek çizgisi Claudin 4 için 200 Occludin ve Vimentin için 100 µm'yi göstermektedir.

4.4. Bilgisayarlı Akışkanlar Dinamiği ile Fizyolojik Koşullara Uygun Mikroakışkan Platformun Modellenmesi ve Üretimi

4.4.1. Mikroakışkan platformun modellenmesi ve tasarımı

Çipin tasarımı 3B olarak Comsol Multyphysics yazılımında oluşturulmuştur (Şekil 25). Tasarım 2 paralel kanaldan oluşmaktadır. Kanallar birbirinden hücre geçişine izin verecek şekilde yerleşmiş olan membranla ayrılmaktadır. Her iki yan kanalda ise kullanım amacına bağlı olarak (statik/dinamik) besiyeri eklenmesine imkan veren kanal giriş-çıkış portları bulunmaktadır. Platform boyut ve geometrisi yeterli hücreyi barındırabilecek görüntü almada kullanılacak aynı zamanda kullanılan hücre miktarını minimize edecek ve fizyolojik koşulları en iyi oranda simüle edecek şekilde belirlenmiştir.

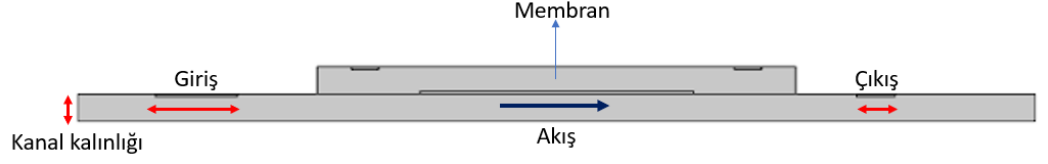


Şekil 32. Çip üstü platformun tasarımı.

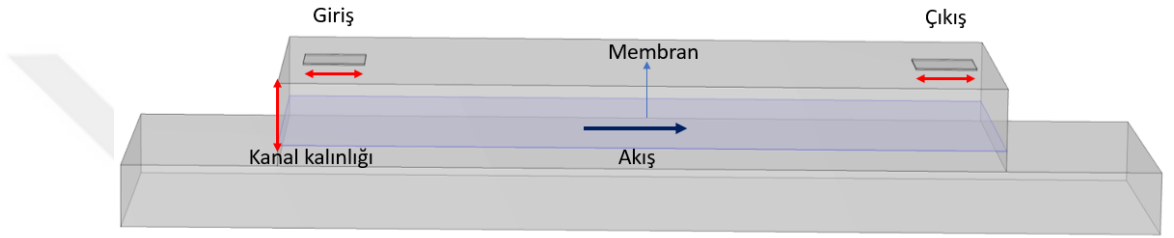
4.4.2. Cmsol multiphysics yazılımı ile akışın simülasyonu, optimum çip-üstü platform boyutların belirlenmesi ve dinamik akış modelinin optimizasyonu

Model öncelikle 3B olarak Cmsol Multiphysics yazılımında modellenmiş “Giriş-Çıkış çapı, kanal derinliği, kanal çapı, kanal uzunluğu, viskozite ve akış hızı” parametreleri ile optimum fiziksel koşulların belirlenmesi için çalıştırılmıştır. Ancak bu işlem çok uzun vakit almış ve çözümlenememiştir. Bu sebeple çalışma süresini minimize etmek için 2 boyutlu olarak Cmsol Multyphysics yazılımında yeniden modellenmiştir. 2 Boyutlu model belirlenen aralıklarla uygun olarak geometrinin oluşturulması için ayrı, akış hızının ve viskozitenin belirlenmesi için ayrı olarak optimize edilmiştir. Elde edilen geometri, akış ve viskozite değerleri 3 boyutlu modelde denenerek gösterilmiştir. Tüm modeller membran özelliklerinin olduğu ve olmadığı durumlar için değerlendirilmiştir. Membranların porozite özelliklerinin belirlenmesi gerekliliği görülmüştür. Bu sebeple bir sonraki dönemde optimize porlu membranların porozite değerleri belirlenerek akış hızı ve viskozite simülasyonları tekrarlanacaktır. Membran özelliklerinin dikkate alındığı modellerde serbest ve gözenekli ortam akışı ve Darcy’s Law kanunu kullanılmıştır. Membran özelliğinin dikkate alınmadığı modellerde fizik laminar akış olarak modellenmiştir. Optimizasyon için farklı algoritmalar kullanılarak geometri ve fiziksel koşul değer aralıklarında model parametrik olarak güncellenerek optimize edilmiştir. Geometri optimizasyonu için Monte Carlo metodu kullanılırken fiziksel özelliklerin optimizasyonunda MMA (Method of Moving Asymptotes) metodu kullanılmıştır. Geometri optimizasyonu sonucunda elde edilen binin üzerindeki sonuç değerlendirilerek yeterli hücre miktarı ve görüntülemeye uygun olacak

şekilde ve belirlenen fiziksel özelliklere en yakın oranları karşılayacak şekilde model geometrisi belirlenmiştir.



Şekil 33. 2B Modelin tasarımı. Gösterilen değerler parametrik olarak girilerek optimizasyona imkan sağlamıştır. Nihai ürün boyutlarını yansıtmamaktadır



Şekil 34. 3B modelin tasarımı. Gösterilen değerler parametrik olarak girilerek optimizasyona imkan sağlamıştır. Nihai ürün boyutlarını yansıtmamaktadır.

4.4.3. Geometri optimizasyonu için gerçekleştirilen simülasyon

Tüm parametrelerin kullanımıyla 1000'in üzerinde simülasyon çalıştırılmıştır. Optimizasyon için amaç fonksiyonu olarak shear, akış hızı ve basıncın fizyolojik değerlerinin simülasyon değerlerinden farkı alınarak karelerinin toplamı minimize edilmiştir. Bu sayede fizyolojik değerlere en yakın sonuçların elde edilmesi amaçlanmıştır. Sayısal olarak farklılık olduğu için shear ve akış hızı parametreleri için 4. kuvveti kullanılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Model optimizasyonunda kullanılan parametreler. v0:hız(m/s), eps_p:porozite, Cf:Sürtünme katsayısı, membw:membran kalınlığı(m), membl:membran uzunluğunu, cw:kanal kalınlığı(m), cl:kanal uzunluğu(m), vis: viskozite(Pa*s), memblg:kanal giriş uzunluğu(m), memblc:kanal çıkış uzunluğu'dur. Burada yer alan geometri değerleri optimizasyon sonucunda elde edilen değerleri temsil etmektedir. Ancak viskozite ve akış hızı değerleri nihai değerleri temsil etmemektedir.

| Parameters | | | |
|------------|----------------------------|-----------|-----------------------------|
| Name | Expression | Value | Description |
| v0 | 0.0025267 | 0.0025267 | Inlet velocity |
| eps_p | 0.1 | 0.1 | Porosity |
| Cf | $1.75/\sqrt{150*eps_p^3}$ | 4.5185 | Friction coefficient |
| fs | 1 | 1 | Switch for Forchheimer t... |
| membw | 0.1e-3[m] | 1E-4 m | |
| membl | 10e-3 | 0.01 | |
| cw | 1e-4 | 1E-4 | |
| cl | 35e-3 | 0.035 | |
| vis | 0.84090 | 0.8409 | |
| memblg | 3e-3 | 0.003 | |
| memblc | 1.4e-3 | 0.0014 | |

Tablo 7. Model optimizasyonunda kullanılan değişkenler. Amp: Ortalama membran basıncı (average membrane pressure), Ams: ortalama membran kayma gerilimi (Average membrane shear stress), Aah: ortalama akış hızı, Bgopt: optimizasyon formülü. Model optimizasyonunda bgopt değeri minimize edilmeye çalışılmıştır. 0'a yakın olması modelin doğruluğunu gösterir. Buradaki amp değeri kanalın içindeki ortalama basınç değerini, ams ve aah değerleri sırasıyla membran yüzeyindeki ortalama kayma gerilimi ve akış hızını göstermektedir.

| Variables | |
|-----------|-------------------------------|
| Name | Expression |
| amp | aveop1(p)[1/Pa]-2000 |
| ams | aveop2(fp.sr*fp.mu)[1/Pa]-1.5 |
| aah | aveop3(fp.U)[s/mm]-1.5 |
| bgopt | $((amp)^2+(ams)^4+(aah)^4)$ |

Tablo 8. Modeldeki geometrik parametrelerin optimizasyonu. Kontrol değişkenleri ve parametreleri. Değişkenler “Lower bound” ve “Upper bound” arasında yazılımsal olarak değiştirilerek amaç parametresi hesaplanmaktadır. Minimum değer istenilen koşullara en yakın değeri temsil etmektedir.

Control Variables and Parameters

| Parameter n: | Initial value | Scale | Lower bound | Upper bound |
|--------------|---------------|-------|-------------|-------------|
| v0 (Inlet v) | 2[mm/s] | 1 | 0.5[mm/s] | 10[mm/s] |
| cw | 1e-3 | 1 | 0.1[mm] | 2[mm] |
| vis | 0.9 | 1 | 0.001 | 0.9 |
| memblg | 1e-3 | 1 | 0.1[mm] | 7[mm] |
| memblc | 1e-3 | 1 | 0.05[mm] | 5[mm] |

| v0 (m/s) | cw (m) | vis | memblg (m) | memblc (m) | Objective |
|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 0.002 | 0.001 | 0.9 | 0.001 | 0.001 | 3153200.1196154356 |
| 0.003599597155674917 | 7.208471928230537E-4 | 0.2150842005676442 | 2.7141026032288584E-4 | 0.00413015839106418 | 3782443.5754378866 |
| 0.0031687673574022643 | 0.0017066530380657674 | 0.314924214059649957 | 0.00521514328440199 | 0.004352830557538999 | 1.3612492814267999E7 |
| 8.145695364238411E-4 | 1.32412708914456662E-4 | 0.7043528855250709 | 0.002880678731650746 | 4.85071871089816E-4 | 8.30569097357522E19 |
| 5.342112491225928E-4 | 1.241798150578326E-4 | 0.1935468906527909 | 0.006521146275215918 | 0.0015213888973662525 | 2.188573449242627E16 |
| 0.007298471022675251 | 4.948890682699057E-4 | 0.07590066223165563 | 9.358723746483222E-4 | 0.0017976897488326672 | 2.7317672840875936E8 |
| 0.001479659412434248 | 0.0011815973287859738 | 0.3239508041627247 | 0.0063926593688931446 | 0.002632606570339065 | 3720264.9312748043 |
| 0.0031131015961180458 | 0.0012256090578936124 | 0.3747623834777673 | 0.004098239802003235 | 0.004048165349284341 | 4.76247873810945E27 |
| 0.006806176946317941 | 0.0017759023594899243 | 0.11532639548884579 | 0.002684841456343272 | 7.28933989464003E-4 | 4.27194772758731E7 |
| 0.005421491124972999 | 7.087862789781396E-4 | 0.658766443301799 | 0.004425899007141331 | 0.0020410507872853 | 3.532019291672179E17 |
| 0.0066589461956879 | 0.0012881864922056232 | 0.3007670658467961 | 0.003470506912442296 | 5.164937284463028E-4 | 8.36962169894464E9 |
| 0.002623401593066195 | 0.001492803738465556 | 0.1438589107852413 | 0.004094027527695547 | 8.61049226358785E-5 | Inf |
| 0.008242179631946777 | 3.6528214326201056E-4 | 0.3086688741721854 | 0.001752779320657977 | 0.00387823032246569 | 9.87322179050166E19 |
| 9.708395641956847E-4 | 9.027466568528397E-4 | 0.2500104068117313 | 0.003970207831048533 | 0.001860231303018282 | 3419785.455908746 |
| 0.0089127780999176 | 6.82666402172918E-4 | 0.1891021759692564 | 6.862483596201157E-4 | 0.004819324420200203 | 3249577.452576447 |
| 0.00701057466833432 | 7.1586046937476788E-4 | 0.7788686778564807 | 0.005326117740405558 | 0.001801712134393446 | 1.587577145738358E20 |
| 0.006771385845515305 | 0.0018551540269173254 | 0.59512956121097446 | 0.003762578203680532 | 5.499038666951506E-4 | 5.401078633760294E9 |
| 0.005144032105471969 | 4.043641468550676E-4 | 0.6761210974456008 | 0.003695028534806354 | 2.63602802373472E-4 | 1.8750054516097855E21 |
| 0.002097781304361095 | 0.0013417523728141117 | 0.1908580893093661 | 0.0015601458784752953 | 0.002759077730643626 | 3878540.324181122 |
| 0.009607440412610248 | 0.0013955046235541858 | 0.45326707663197724 | 0.00648805200354015 | 0.002353832641376995 | 2.52862829749179E15 |
| 0.00325980401169164 | 0.0014889767143772697 | 0.7474001892147588 | 0.0018004150517288734 | 0.002168407328990448 | 3464360.1418878757 |
| 0.004088702047119195 | 4.6379894405957213E-4 | 0.7408155186102176 | 2.699362163159517E-4 | 0.00346274605548265 | 1.329577156526095E27 |
| 0.007252372314111159 | 0.00128278145695836424 | 0.352841059602649 | 0.005476891384624775 | 0.002092266615497303 | 8.58448112655982E12 |
| 0.009815607165746025 | 0.001612253181554613 | 0.4702126660339551 | 0.001050758384960478 | 0.0024175682983794E27 | 3848086.7418423274 |
| 0.006983901486231411 | 0.0010897489326670126 | 0.691485328851969 | 0.006277929013946959 | 0.004072008808088626 | 1.84198512453225504E17 |
| 0.009322443211868649 | 0.0017899197362300783 | 0.758841059602649 | 9.613282559221169E-4 | 0.00203969647712623774 | 4171281.028376861 |
| 9.31424298837247E-4 | 0.0012620807819760737 | 0.0432602624408703886 | 0.0068132175664840546 | 0.0014360382359892575 | 3928431.9059802785 |
| 0.0029837946714682487 | 0.0012749156224250007 | 0.10679375591296117 | 0.006988937348500045 | 0.002469483016449477 | 3.4046118846512804E9 |
| 0.004152159306795799 | 0.0016264015625476859 | 0.893058525752129 | 0.00216966161076693 | 0.003512466611120546 | 5.58512638446794E7 |
| 0.00804668874172185 | 0.0013476088747825586 | 0.03694039730509328 | 0.002355031820794274 | 5.96862680109591E-5 | Inf |
| 8.24427014984882E-4 | 0.001374122745445113 | 0.7133519394512772 | 0.001141928537219155 | 0.00476176797235345 | 3890406.667873159 |
| 0.0025910428174687947 | 0.0013588579973754084 | 0.5014251939451278 | 0.005765172276985992 | 0.00648078744526298 | 4.162091294622312E9 |
| 0.0065043232050328 | 6.343232321405469E-4 | 0.25825628599010785 | 0.006484508752373037 | 6.560792870076187E-4 | 1.3123826878942049E17 |
| 0.00458458153050325 | 8.269020661030916E-4 | 0.1482771996215705 | 0.0040301446657749163 | 3.892162648345894E11 | 3.89110408345894E11 |
| 0.008681523794813999 | 1.7717825861328493E-4 | 0.5235176915799433 | 0.006489138462477493 | 0.003489828047425764 | 1.14019096824249E27 |
| 0.0040191198461867125 | 0.001435224463627196 | 0.1904465468303628 | 0.006495667748246712 | 0.001480902042695947 | 1.89974623823237E10 |
| 0.00493702050569628 | 5.74202703939397E-4 | 0.12472699148533596 | 0.005008987701040682 | 0.004712210852687155 | 3.761144461670282E13 |
| 0.009036286507766961 | 2.4125186925870538E-4 | 0.8460605487228005 | 5.946470584379101E-4 | 0.0013750085407391584 | 4.008878250408174E20 |
| 0.00121959593494945377 | 9.645008697775202E-4 | 0.38927623534777673 | 6.706565086916715E-4 | 5.93386638956515E-4 | 3811400.288041509 |
| 0.004466765343180639 | 0.001704233283455916 | 0.4166575212866604 | 0.004011270485549486 | 0.004880041322018305 | 4.01306408587216E2 |
| 0.00773046052407993 | 8.4690694904646077E-4 | 0.8645250709585345 | 0.003497039704580828 | 0.004114900622251656 | 9.06620706597446E17 |
| 0.006983901486231411 | 4.66640217917875E-4 | 0.8674332011975403 | 0.003470506912442296 | 0.003377091280816184 | 1.62678769686276E22 |
| 0.005636906032509323 | 2.8532059694204597E-4 | 0.1582913907284768 | 0.00349198839411603 | 1.3792077894940032E4 | 4.956005255269934E17 |
| 0.0018617816705832088 | 0.001538670003387036 | 0.122440302743614 | 0.001978309937748344 | 0.00364784836375012 | 39493511.700774922 |
| 0.008966704306161687 | 3.6626789147618038E-4 | 0.601988647114475 | 0.003115894039783059 | 2.124455192724389E-4 | 1.538190107230278E23 |
| 0.001965579121311075 | 0.0014785839841364788 | 0.6478618732261117 | 0.004024747459324087 | 8.594149601733482E-4 | 4244508.503613872 |
| 0.005658940397350994 | 0.0013151951658690991 | 0.8698476821152059 | 0.004731867427854837 | 0.002012355413861258 | 4.112887932870906E14 |
| 0.003923108492011195 | 7.37145908993048E-4 | 0.54445501614947966 | 0.001079939894257543 | 0.0018446392300118787 | 3.414532115031248E9 |
| 0.00411758476516007 | 5.368022748770151E-4 | 0.5344408703878902 | 0.002876467177340584 | 0.004754867060240554 | 6.00389271245631E15 |
| 0.00879387758959912 | 0.001082726523636587 | 0.5974616840118529 | 0.002811529685254165 | 0.0020592798242134 | 8.394029237015047E13 |
| 0.004875807024514644 | 5.798272652363658E-4 | 0.7887464523223734 | 0.001194372386582626 | 0.004482448753345406 | 4.459176417551095E18 |
| 0.00234881130405591 | 0.0013155440524468427 | 0.2258931674550615 | 9.423108613175222E-4 | 6.36892861055321E-4 | 3808385.181892515 |
| 0.00694816668172246 | 0.0013221268349252802 | 0.27308420056764426 | 0.0042949708090456863 | 0.0025805012727997683 | 1.739011710207311E11 |
| 0.00887856850795008 | 0.00150658589434492 | 0.3895061494795695 | 0.0030482116193121125 | 6.918820764789349E-4 | 2.182828073772861E5 |
| 0.00504690694904607 | 1.120609149449141E-4 | 0.2871040611731315 | 0.002455311746574297 | 0.002455311746574297 | 3.46178841172274E24 |
| 0.008281319620349743 | 4.7423627430003632E-4 | 0.35799905392620623 | 0.00559323001678518 | 0.00473170159001435E-4 | 1.0469012741462138E21 |
| 0.005692281868983521 | 0.00121897030549028 | 0.3067484443708609 | 0.0038272255623035367 | 6.0703075170140690329 | 1.1114961853828059E10 |
| 0.002532245916074059 | 7.34957727960776E-4 | 0.5055780510879849 | 0.00669424115726188 | 0.0026761421552171398 | 3.47279388916665E14 |
| 0.0011482741782891325 | 0.0011608386486404005 | 0.5477199621570482 | 0.006376900540177618 | 6.389363997501897E-4 | 1.35404625029999007E7 |
| 0.00291015380102664 | 0.0015466424756614889 | 0.3714701968754967 | 0.00501867475948362 | 0.001186200967345194 | 1.332781127215653E7 |
| 0.0039533127420362 | 0.001423931394390698 | 0.3795089877010407 | 0.0034895669484542375 | 0.000785200317946E8 | 1.010587200317946E8 |

Şekil 35. Çip geliştirilmesinde kullanılan geometrik özellikler optimizasyonu sonuçları (Devamı şekil 36)

| | | | | | |
|------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 0.00149646404622709727 | 8.564405346822461E-4 | 0.0683282876064323 | 0.001207428205204577 | 0.002669948423718986 | 3927778.946999221 |
| 0.0069653423242997005 | 0.0011472121341592977 | 0.15790728476821192 | 0.00336542863246559 | 0.00473295144505142 | 3.38761658380324E10 |
| 0.0022284920804467951 | 0.0017543748283232843 | 0.129017029322828762 | 0.00185600756895908 | 0.0022956663716544087 | 3920265.4382366515 |
| 0.0022340446491714222 | 2.561540574385848E-4 | 0.38598291674550614 | 0.0021355528804284796 | 0.0017309183019501328 | 1.55581536623287E16 |
| 0.0066233811456648455 | 0.001591089595233009 | 0.5732081362346263 | 0.003211496322519608 | 0.0043422559282204655 | 1.272814708034478E10 |
| 0.006535096285897397 | 0.001591182544643232 | 0.2512724692526017 | 0.0054027680288094735 | 0.0024892707439191874 | 2.543302679235579E10 |
| 0.00619008456271248 | 7.7471541489951364E-4 | 0.5652579051769158 | 0.002801080358523545 | 0.0012473540453228431 | 5.376475479235175E14 |
| 0.001511261329996643 | 5.58490378247442E-4 | 0.20150321128827814 | 0.006336890774254588 | 6.8795434440982E-4 | 8.80946299257241E9 |
| 0.007274117252113407 | 0.00104440444312875758 | 0.085256288599810785 | 0.00205500380596288595 | 0.0040032624282662984 | 5.40658935203793E9 |
| 0.004599941303750725 | 4.8583692455720696E-4 | 0.683837275307474 | 0.002434043973204746 | 0.003909601123081149 | 2.6868370037811097E17 |
| 0.00667426069107944 | 0.001554908850399267 | 0.7280377108014191 | 0.0021640827661976985 | 5.3522899995266298E-4 | 3.3198023237213899E9 |
| 5.58362304040631E-4 | 0.001095625780286807 | 0.2439744560078586 | 0.003721094397498087 | 0.0029683050019937036 | 3832067.3597488147 |
| 0.005504394905499494 | 0.001842072811736099 | 0.385723746482222 | 0.00385902279724570 | 0.0029705894161198774 | 7.9846144267055E7 |
| 0.005285515150402652 | 0.001896670430616129E | 0.5197350593777484 | 0.00628900317392469 | 0.004567798394726402 | 1.00287671037593E11 |
| 0.0021763512070070495 | 5.587054352945677E-4 | 0.6617994232857237 | 0.00615064912826566 | 0.0024031851498255054 | 2.031527623864718E17 |
| 0.0021018402661214025 | 9.487136759440962E-4 | 0.37265764427425355 | 1.667581257768467E-4 | 0.002659856414854108 | 3923034.01516247 |
| 0.001760826644123661 | 0.00112372814117858 | 0.324087984828193 | 0.0027239560282827845 | 0.00156836146122624 | 3707618.4003785514 |
| 0.00224709311572411 | 5.257087923825801E-4 | 0.8787644276253548 | 0.00570979023878399 | 0.0019679418317209286 | 9.86563052712676E13 |
| 0.005253234147160253 | 0.0017809994024474012 | 0.32064522232734156 | 8.111209448530534E-4 | 0.0029448896755882446 | 3876060.6070425554 |
| 0.008607166246438344 | 1.86601337107107150E-4 | 0.49512488174077585 | 4.687215796380504E-4 | 0.001138430108340708 | 4.219746697589285E18 |
| 8.59797674674689E-4 | 2.49775689958351E-4 | 0.5680775780510879 | 0.00603320413830989 | 0.0020146214178995054 | 9.38598954108176E18 |
| 0.00968745994456314 | 0.0012357219153416547 | 0.10849476599413424 | 0.003913983581041902 | 2.32796012350648517E-4 | 2.94309826474412E12 |
| 0.005240730002746666 | 0.0011358470412308064 | 0.3571210974456008 | 0.0036560258796960354 | 0.0012704672383800776 | 2.483223743285599E12 |
| 0.009726210007019259 | 0.0019761101107821895 | 0.03167260484115421 | 8.67558772576076E-5 | 0.001128011413922544 | 3977295.137721366 |
| 0.004444440358499947 | 4.408948026978262E-4 | 0.5250992377483444 | 0.002842985320596942 | 0.004191189306314279 | 4.623869289493274E17 |
| 0.005219393862117375 | 0.0010722373119298984 | 0.1861116267076632 | 0.0016867083085421308 | 0.0018052430799279766 | 4045752.8392464545 |
| 0.00372194886016419 | 0.00193138348692281818 | 0.8033899148533889 | 0.004116769920987061 | 0.004678823261827448 | 3.30065436084199E9 |
| 0.005907408624294924 | 5.075707241646001E-4 | 0.2457029328376063 | 0.005238517410809686 | 1.0181885131382189E-4 | 1.282758309466627E17 |
| 0.007613330464939116 | 0.0013746299307246037 | 0.666676064330318 | 0.00471333964049196 | 7.807092501602222E-4 | 1.257129420797514E14 |
| 0.005726102450636311 | 1.7271340067751092E-4 | 0.5479942328572375 | 0.00651180858735006 | 0.00488111066859831 | 2.25030793827778E29 |
| 0.005993911577359288 | 7.55241424702652E-4 | 0.607140775780512 | 0.00610857066608692 | 0.0019529862361522263 | 2.900518880002015E20 |
| 0.0060757754508959 | 0.001319499496444594 | 0.23566225165562317 | 8.111209448530534E-4 | 0.001578492080446791 | 3815687.6036239554 |
| 0.003843424781333956 | 0.0015731711783195059 | 0.4348751182592242 | 2.2815089327677235E-4 | 8.341868343150121E-4 | 3926040.987931337 |
| 0.008236671404986358 | 4.1132326701559495E-4 | 0.05452790917691528 | 0.0025292245246742147 | 0.0030183080583846515 | 3.799188056670294E14 |
| 0.008001831110586559 | 0.001994027527695547 | 0.7351362346263008 | 0.00158120836500137334 | 0.002055107272560808 | 8254685.607213989 |
| 0.0034473860896623807 | 0.0015713156529435102 | 0.46519205298013244 | 0.0026359874263740955 | 0.00232146305734428 | 3518654.025659442 |
| 0.00681508835108494 | 0.0018270918912320324 | 0.3394247871333964 | 0.00582325486739708 | 0.002562715536973175 | 2.983665710272408E12 |
| 0.007288036292434615 | 7.76281014438255E-4 | 0.3758599810785241 | 0.004548243659779657 | 6.896160771507902E-4 | 6.43354863216011E15 |
| 0.004991821039460432 | 0.0012398232603015228 | 0.18067928096391476 | 0.0049287575914792325 | 3.965468206527909E-4 | 2.33926069982986E10 |
| 0.00842036194595224 | 0.001261500903920294 | 0.6291229859921884 | 0.00560471208783094 | 0.0012898037659940693 | 1.182146085480154E16 |
| 0.006598599446622609 | 0.001469323994687054 | 0.6509621570482498 | 0.003666657128421887 | 0.003494923245948668 | 8.760520473918928E11 |
| 0.0014447060902715231 | 0.0014272804956205994 | 0.03746263008514664 | 0.0028040284432508315 | 0.001617467268898887 | 3973011.75978717 |
| 0.007850199896237068 | 0.0014416608173858938 | 0.48544247871333964 | 0.002139866232928495 | 0.004635778374584185 | 4.027775708096087E8 |
| 0.00840889899995941 | 0.0014442752464369E-4 | 0.8992317880794702 | 0.006306988738670003 | 0.0039957090978676745 | 1.6784274149697994E16 |
| 0.008691364638909994 | 5.38251899772149E-4 | 0.3800577105014191 | 0.00392757473911563 | 0.0011260475478737637 | 2.381142958248532E18 |
| 9.479584223939489E-4 | 0.00123273599295115 | 0.28169914833385963 | 0.0013428944591601307 | 0.00342843922238838 | 3912879.564097642 |
| 0.0072671174780114 | 0.0014889187292026293 | 0.5088429517802365 | 0.00106838197973374 | 0.00197868232339374 | 2.766679066761277E10 |
| 0.0032006591998046817 | 0.0010172673726615191 | 0.28909546073792757 | 1.4737998564148562E-4 | 0.00477323323226257 | 3954014.3200090255 |
| 0.007830284917679771 | 0.00178377303085116123 | 0.632387890235544 | 0.00812567522020215 | 6.782586138452959E-5 | Inf |
| 0.0060209112509099186 | 0.00150474868007744653 | 0.29692620624408705 | 0.00462964713348796 | 2.5560167204143193E-4 | 3.22665967404548E10 |
| 0.0034668112094495913 | 3.69689014388439E-4 | 4.42250141911069067 | 0.002276110110782189 | 0.004848631244850001 | 9.028301560945642E15 |
| 0.009056871242408521 | 0.0010582628864406261 | 0.6913207190160893 | 0.0032234992522965178 | 0.00191083864846404002 | 4.48025987283487E15 |
| 0.009636143070772424 | 0.001566967653431807 | 0.2124228949858089 | 0.006113888973662526 | 0.00138572801904355 | 6.684162364798179E13 |
| 0.0060074312570574055 | 0.0011200170903653064 | 0.2730576442762554 | 0.0030617755668813132 | 0.00139177378707451 | 4.816038046358858E9 |
| 0.0014480574968718527 | 0.001988289960361123 | 0.3087511825922422 | 0.0014175847651600698 | 0.0025504547287911925 | 3957507.527539402 |
| 0.00862112704855495 | 0.0016417096496008455 | 0.7002100283822138 | 0.002249577318643757 | 4.906613261003449E-4 | 2.327316890967083E10 |
| 0.001389465529434547 | 4.621175959254484817 | 0.718070955545317 | 0.003984279100924711 | 0.003984279100924711 | 3499588.1956200766 |
| 0.00660322888580256 | 0.001219113742484817 | 0.623690638649418 | 0.005736323129978332 | 0.0042259462393527025 | 2.1662597734900012E15 |
| 0.006599597760045106 | 8.6841944639442381E-4 | 0.17383383159896472 | 0.002998860744041287 | 2.0529648791955998E-4 | 2.2615769993979727E13 |
| 0.00823678278731014 | 0.00109192844707031269 | 0.018918518610217957 | 0.005786661203985199 | 0.0042624643018475906 | 1.291398899817012E14 |
| 0.00946638464435957 | 2.447309793399691E-4 | 0.1380940397309994 | 0.006167796868000930 | 9.77851191747799E-4 | 1.118184152562134E22 |
| 0.002692251350444044 | 9.385520197994018E-4 | 0.5499148528393619 | 0.005294217750480668 | 0.002390864224892482 | 1.497700354773278E12 |
| 0.00589234167912184 | 0.0013430860317682129 | 0.6580132450311125 | 0.00580076268785181 | 0.002352553178502766 | 1.419010020040194E14 |
| 0.005883428997829001 | 7.207312348740445E-4 | 0.207812348740445E-4 | 0.0012013214514603105 | 0.0012013214514603105 | 7937861.615470872 |
| 6.0524307992979769E-4 | 2.0489516891994994E-4 | 0.444782128666036 | 5.636921292764062E-4 | 0.0015150685140837737 | 232265.20714610815 |

Şekil 36. Çip geliştirilmesinde kullanılan geometrik özelliklerin optimizasyon sonuçları (Şekil 40'ın devamı) Şekil 39 te verilen tablo Monte Carlo metodu ile taranarak 1000'in üzerinde simülasyon yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar Objective sütununda bulunmaktadır. Diğer sütunlar da bu değere karşılık gelen parametreleri ifade etmektedir.

Geometri optimizasyonunda elde edilen değerler Tablo 9 ve Tablo 10'da verilmiştir. Şekildeki tablodaki objective sütunu modelde kullanılan amaç fonksiyonudur (Şekil 29). Objective parametrelerinin minimum olduğu durumlar incelenerek ve hücre kültürünün gerektirdiği fiziksel koşullar göz önünde bulundurularak model geometrisi belirlenmiştir. Model optimizasyonu sonucunda giriş-çıkış çapı, kanal derinliği, kanal çapı, kanal uzunluğu, parametrelerine karar verilmiş viskozite ve akış hızı parametreleri için tekrardan optimizasyona gidilmiştir.

Tablo 9. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen geometrik parametreler

| | |
|------------------|--------|
| Kanal Kalınlığı | 0.1 mm |
| Kanal Giriş Çapı | 3 mm |
| Kanal Çıkış Çapı | 1.4 mm |
| Kanal Uzunluğu | 35 mm |

4.4.4. Akış parametrelerinin optimizasyonu için gerçekleştirilen simülasyon

Elde edilen geometrik parametreler doğrultusunda kanal ve membran boyutları sabit tutularak viskozite ve akış hızı için optimizasyon tekrarlanmıştır. Kanal giriş ve çıkışları da bu model için sabit tutulmuştur. Hipertansiyonun modellenmesinde yapılan ara bağlantılar aracılığı ile çıkış boyutları değiştirilerek içerideki basıncın hedeflenen aralığa ulaşması sağlanacaktır. MMA metodu kullanılmıştır.

Tablo 10. Modeldeki akış parametrelerinin optimizasyonu. Kontrol değişkenleri ve parametreleri. Başlangıç hız değeri 10 mm/s; viskozitesi 0.9 Pa*s olarak belirlenmiştir. Amaç fonksiyonu olarak aynı fonksiyon kullanılmıştır.

| Control Variables and Parameters | | | | |
|----------------------------------|---------------|-------|-------------|-------------|
| Parameter nam | Initial value | Scale | Lower bound | Upper bound |
| v0 (Inlet velı) | 2[mm/s] | 1 | 0.5[mm/s] | 10[mm/s] |
| vis | 0.9 | 1 | 0.001 | 0.9 |

Tablo 11. Yapılan simülasyonlara karşılık gelen ortalama akış hızı basınç ve kayma gerilimi değerleri

| Optimization solution | Velocity magnitude (m/s) | Optimization solution | Pressure (Pa) | Optimization solution | fp.sr*fp.mu (Pa) |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|------------------|
| 0.0000 | 0.015428 | 0.0000 | 2.1038E5 | 0.0000 | 317.01 |
| 1.0000 | 0.0081317 | 1.0000 | 1.1123E5 | 1.0000 | 167.61 |
| 2.0000 | 0.0081317 | 2.0000 | 99029 | 2.0000 | 149.22 |
| 3.0000 | 0.0081317 | 3.0000 | 83229 | 3.0000 | 125.41 |
| 4.0000 | 0.0081317 | 4.0000 | 62096 | 4.0000 | 93.569 |
| 5.0000 | 0.0081317 | 5.0000 | 32070 | 5.0000 | 48.325 |
| 6.0000 | 0.0081317 | 6.0000 | 3746.8 | 6.0000 | 5.6449 |
| 7.0000 | 0.0081317 | 7.0000 | 2156.1 | 7.0000 | 3.2481 |
| 8.0000 | 0.0081317 | 8.0000 | 2014.9 | 8.0000 | 3.0352 |
| 9.0000 | 0.0081317 | 9.0000 | 2000.5 | 9.0000 | 3.0135 |

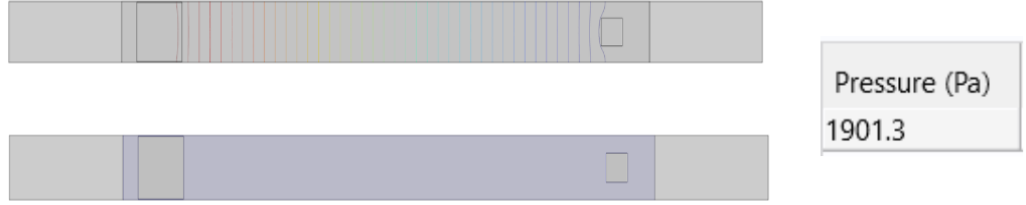
Tablo 12. Akış parametrelerinin belirlenmesi amaç fonksiyonu sonuçları. Burada yapılan son simülasyon 2B model için optimum olarak belirlenmiştir.

| v0 (m/s) | vis | Objective |
|-----------|----------|-----------|
| 0.0020000 | 0.90000 | 4.5200E11 |
| 9.3729E-4 | 0.86972 | 5.3333E10 |
| 5.0000E-4 | 0.86200 | 1.2693E10 |
| 5.0000E-4 | 0.76743 | 9.8908E9 |
| 5.0000E-4 | 0.64499 | 6.8340E9 |
| 5.0000E-4 | 0.48121 | 3.6834E9 |
| 5.0000E-4 | 0.24853 | 9.0903E8 |
| 5.0000E-4 | 0.029031 | 3.0541E6 |
| 5.0000E-4 | 0.016704 | 27022 |
| 5.0000E-4 | 0.015610 | 2858.5 |
| 5.0000E-4 | 0.015498 | 2637.0 |

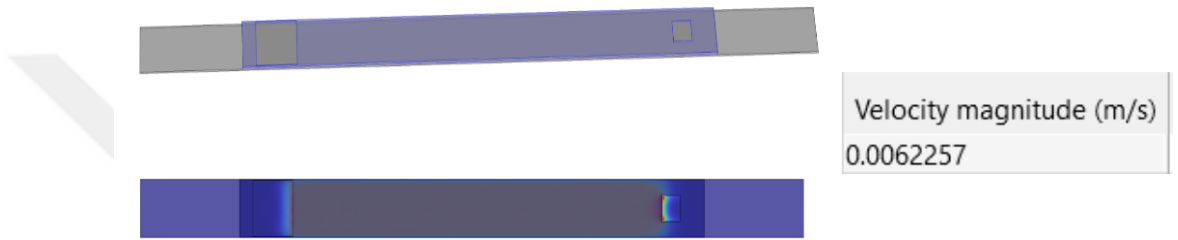
Tablo 13. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda 2B simülasyonda belirlenen akış parametreleri

| | |
|-----------|---------------------------|
| Akış Hızı | 2 mm/s |
| Viskozite | 0.015498044008705546 Pa*s |

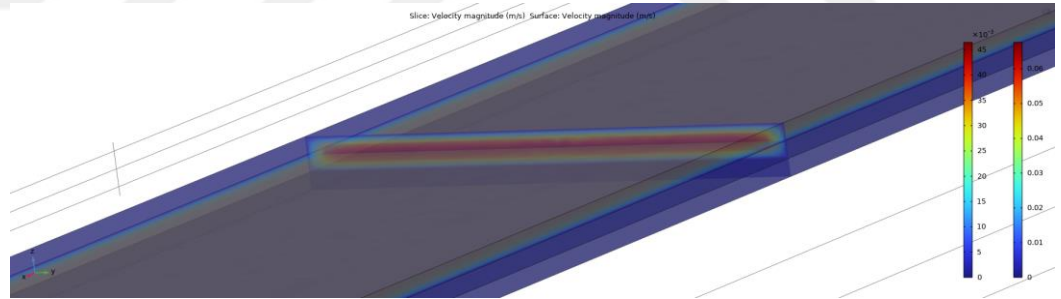
4.5. 2B Simulasyonda Belirlenen Parametrelerin 3B Simülasyonda Değerlendirilmesi



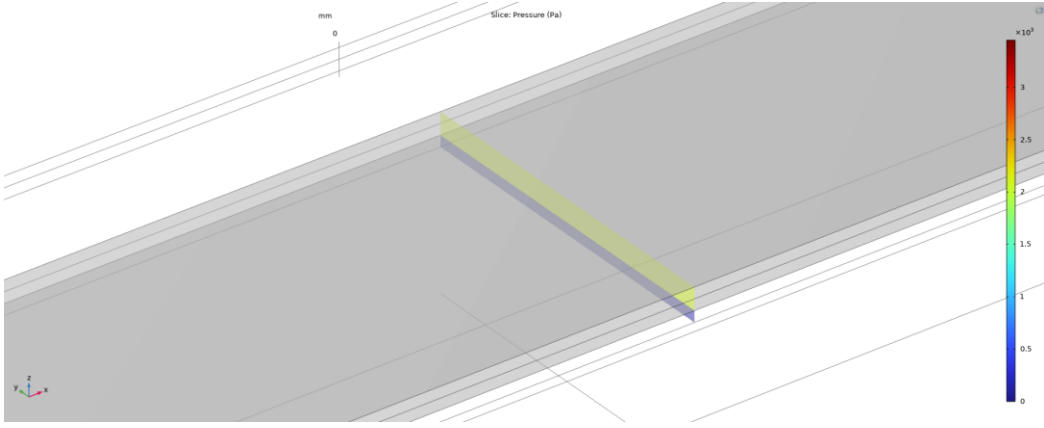
Şekil 37. Membranda oluşan ortalama basıncın belirlenmesi; hesaplamalar sonucunda ortalama basınç 1901.3 Pa olarak belirlenmiştir



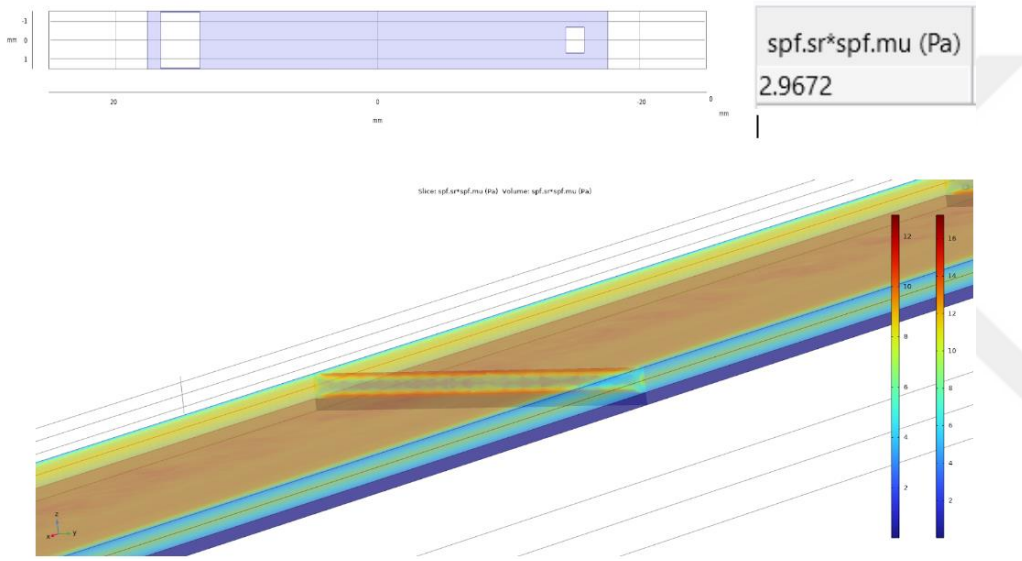
Şekil 38. Kanalın içerisindeki ortalama akış hızı hesaplamalar sonucunda 6.225 mm/s olarak belirlenmiştir.



Şekil 39. Kanalın içindeki akış hızının gösterimi



Şekil 40. Kanalin içindeki basıncın gösterimi



Şekil 41. Kanalin içindeki ve yüzeydeki kayma geriliminin gösterilmesi

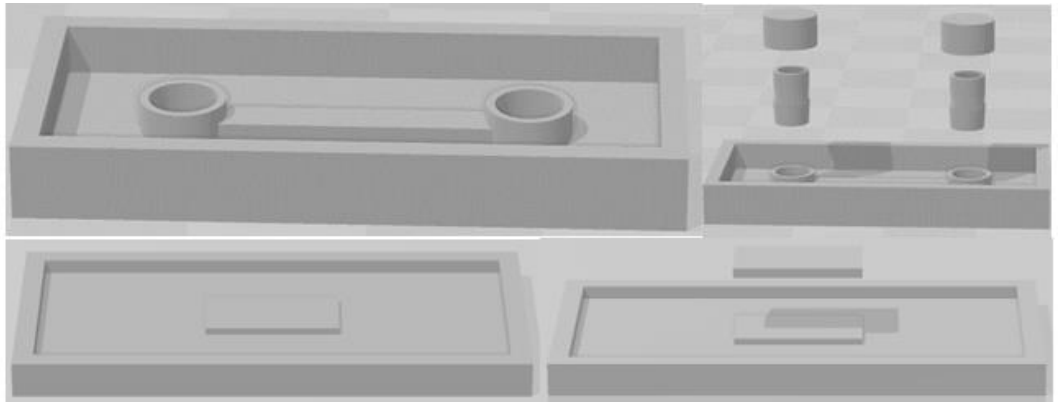
Tablo 14. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda 3B simülasyonda belirlenen parametreler

| | |
|--------------|------------|
| Akış Hızı | 6.225 mm/s |
| Basınç | 1901.3 Pa |
| Shear Stress | 2.9672 Pa |

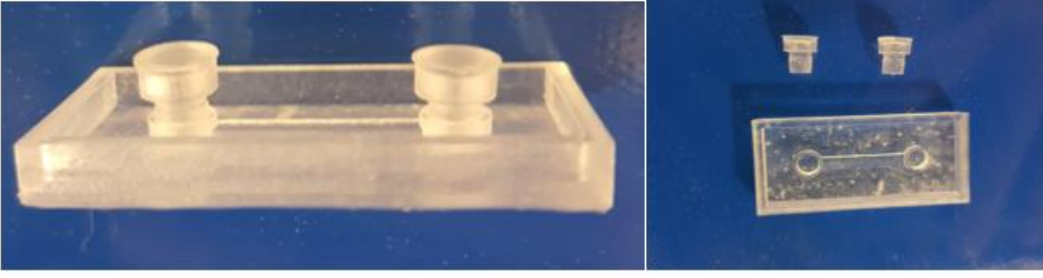
Elde edilen parametreler 3 boyutlu simülasyonda sınıranarak Tablo 10. daki değerler elde edilmiştir. Fizyolojik koşullara en yakın ve *in vitro* uygulamalara elverişli model bu şekilde belirlenmiştir.

4.6. Mikroakışkan Platformun Üretimi

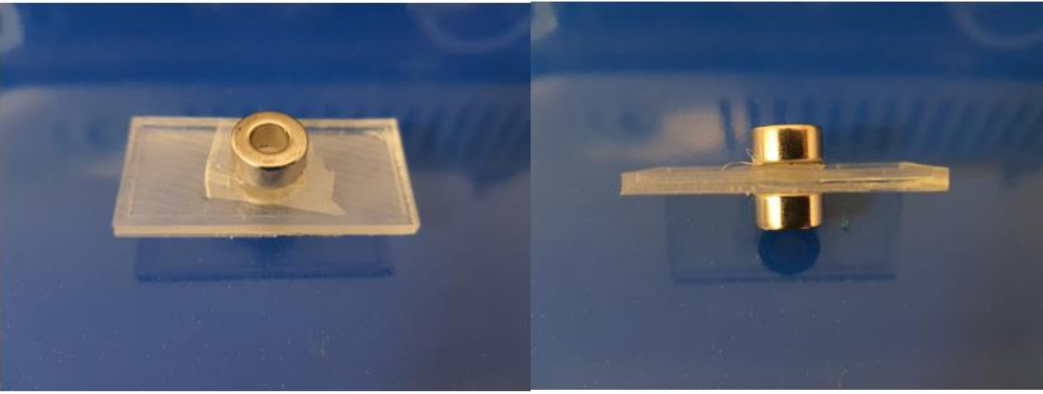
Çip tasarımı luminal, abluminal ve membran kısmı 3 farklı katmana bölünerek kalıpları Formlabs Form 3B Reçine printer ile üretilmiştir. Kalıpların çiziminde Solidworks programı kullanılmıştır. Çizimler Preform yazılımına yüklenerek baskıya hazırlanmıştır. Kalıp baskısında Formlabs Clear V4 reçine kullanılmıştır. Preform yazılımında bu reçine seçilerek 0.050 mm katman kalınlığı seçilmiştir. Preform yazılımında tasarımlara gerekli destekler atılarak baskıya hazır hale getirilmiştir. 3 Boyutlu yazıcıya Clear V4 reçine ve tankı takılmıştır, Reçinenin üst kapağı açılıp baskı platformu takılarak yazıcı hazır(“prime”) hale getirilmiştir. Preform yazılımında hazırlanan model yüklenerek baskı alınmıştır. Baskı tamamlandıktan sonra baskı platformu yazıcıdan çıkarılarak baskı spatula yardımı ile platformdan kaldırılmıştır. Elde edilen baskılar desteklerden ayrılarak %99.9 izopropil alkole alınmıştır. 10 dakika alkolle muamele edilmiştir. Muamele sonrası elde edilen baskılar 2 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan baskılar Anycubic Wash & Cure 2.0 cihazına alınarak 2 saat boyunca ikincil kürleme (“Post Cure”) işlemine tabi tutulmuştur. Bu şekilde kalıplar elde edilmiştir. Hortum ara bağlantıları da aynı yöntem ile ancak biyouyumlu olan Formlabs Biomed Clear Reçine ile basılarak kalıba eklenmiştir. Bakteriyel selüloz membranlı çipler başarıyla PDMS tabakalara entegre edilerek üretilmiştir.



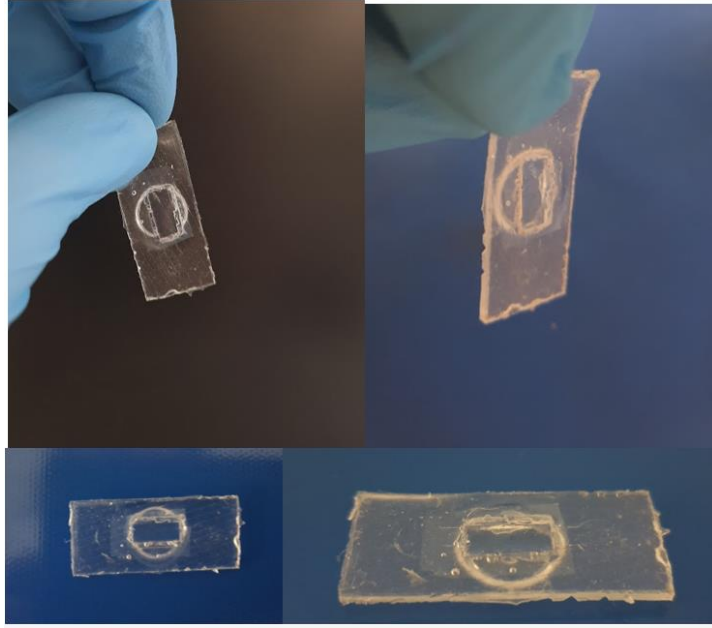
Şekil 42. Solidworks ile elde edilen kanalları içeren ve PDMS’i membran ile birlikte kürleyecek kalıp çizimlerinin gösterimi.



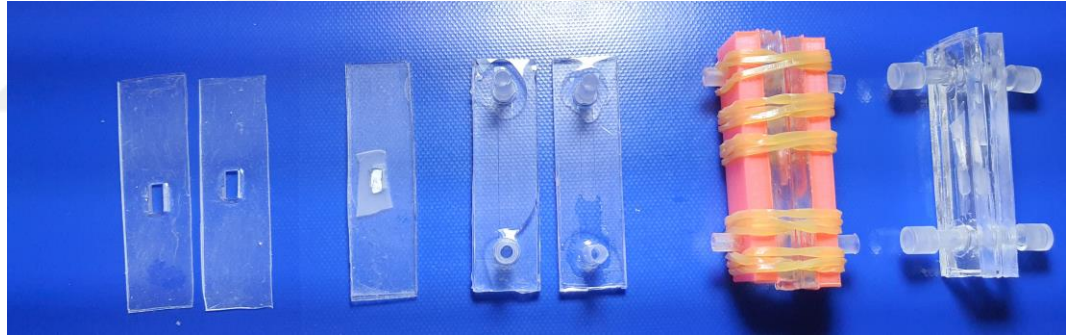
Şekil 43. 3 Boyutlu Baskı sonucu elde edilen kalıp ve ara bağlantıların gösterimi. Şekilde görülen pürüzler baskı sırasında kullanılan desteklerden kalan izlerdir. Kalıbın alt yüzeyinde bulunup çip kalitesini etkilememektedir.



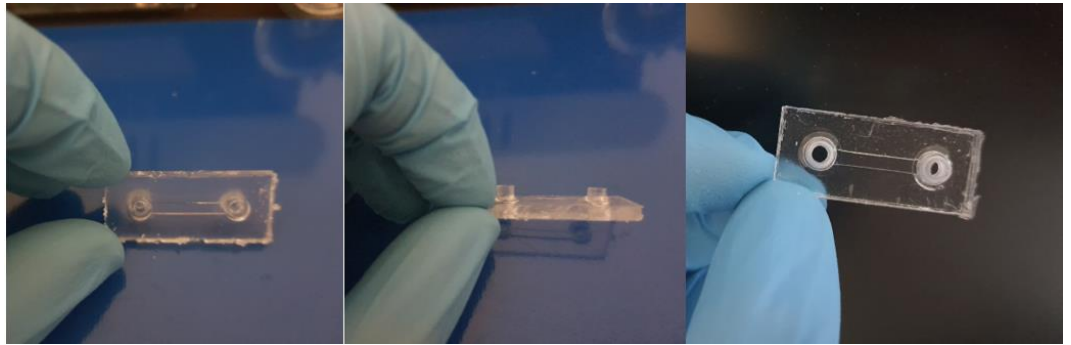
Şekil 44. Kimyasal yapıştırma sürecinde membran sabitlenmesi mıknatıs yardımıyla kalıp ve membranı sıkıştıran parça sıkıştırılarak membranın PDMS'le birlikte kürlenmesine olanak verilmiştir.



Şekil 45. BS membranın çipe entegrasyonu. Membran kuyucuğun üzerinde görülmektedir; membran bir hasara uğramamıştır.



Şekil 46. BS membranlı çipin bütün katmanlarının yapılandırılmış hali.



Şekil 47. PDMS tabaka; kanal girintisi görülmektedir.

Sızdırmazlık Deneyi

Çip üstü platformda basınç uygulandıktan sonra akış halinde 5 gün gözlemlenmiş ve herhangi bir sızdırma gerçekleşmemiştir (Şekil 9. Uygulanan basınç sonrasında >20 mmHg basınç aralığında çip üstü platformunda kalıcı bir deformasyon oluşmamıştır.

4.7. *In silico* KBB modelinin Geliştirilmesi

4.7.1. Verilerin elde edilmesi ve işlenmesi

Elde edilen veriler belirlenen parametreleri ve KBB+ ya da KBB- bilgisini içerecek şekilde tablo haline getirilmiştir. Tabloda “-1” molekülün kan beyin bariyerinden geçmediğini, “1” ise geçtiğini göstermektedir. Elde edilen tablolar ekte verilmiştir (Tablo 21, 22, 23). Veriler iki ayrı kaynaktan alınmış olup Pubchem’de yer alan PAMPA KBB assay sonuçlarına dayanmaktadır. Kan beyin bariyerinden geçip geçmediğini belirlemek için farklı birimlerde belirlenen permeabilite değeri 10^{-6} cm/s birimine dönüştürülerek logaritması alınmış LogBB değerleri elde edilmiştir. Bu değer 0’den küçük olması molekülün KBB’den geçemediğini 0’den büyük olması ise geçebildiğini göstermektedir. Ancak bazı kaynaklarda Log3’den büyük ise geçebildiğini Log1 ve Log3 değerlerinin arasının doğru sonuç vermediği gösterilmiştir. Bu sebeple bu aralık için ayrı bir tablo yapılarak ara değerler ayrıca “0” olarak tabloya eklenmiştir.

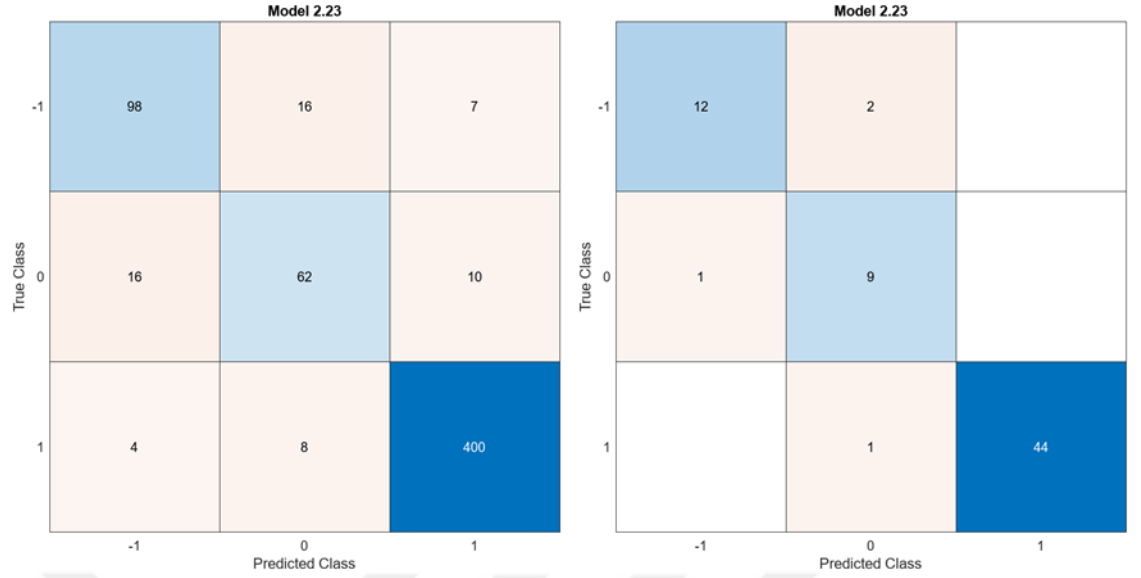
4.7.2. Elde edilen verilerin eğitimi

Veriler işlendikten sonra kaynaklarına göre, tahminlenecek çıktıya göre(KBB-,KBB+, Tanımsız) ve çapraz katlama sayılarına göre ayrı eğitimlere tabi tutulmuş bu eğitimlerin sonucunda elde edilen modeller eğitimde kullanılmayan veriler aracılığı ile test edilerek sonuçlar alınmıştır. Test verisinin büyüklüğü ana veri miktarının %10'u olarak belirlenmiştir. Ancak iki farklı kaynak veri ile eğitilen modeller eğitimde kullanılmayan kaynak tarafından da sınanarak sonuçlar elde edilmiştir.

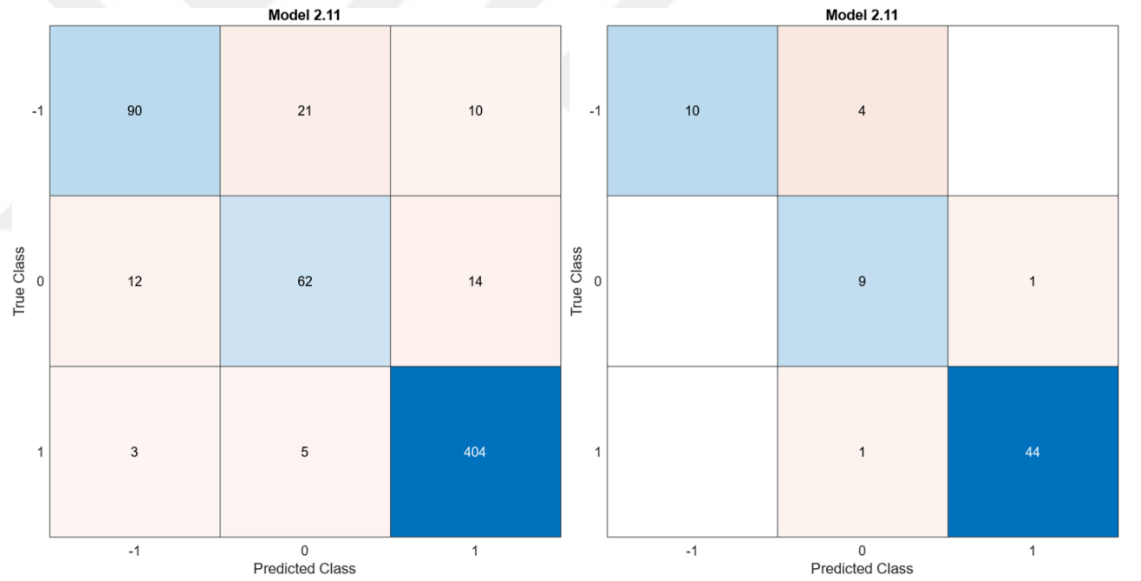
Tablo 15. PAMPA verileri ile yapılan KBB-, KBB+ ve Tanımsız verilere göre eğitilmiş modeller. Eğitim verisi 690 kimyasalı içermekte olup çapraz katlama değeri 10'dur. Belirlenen 5 molekül özelliğine kullanılmıştır.

| Model Number | Model Type | Status | Accuracy % (Validation) | Total Cost (Validation) | Accuracy % (Test) | Total Cost (Test) |
|--------------|--------------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Tree | Tested | 88,4058 | 72 | 92,7536 | 5 |
| 2.1 | Tree | Tested | 88,4058 | 72 | 92,7536 | 5 |
| 2.2 | Tree | Tested | 88,7279 | 70 | 92,7536 | 5 |
| 2.3 | Tree | Tested | 88,8889 | 69 | 89,8551 | 7 |
| 2.4 | Discriminant | Tested | 80,0322 | 124 | 81,1594 | 13 |
| 2.5 | Discriminant | Tested | 87,9227 | 75 | 89,8551 | 7 |
| 2.6 | Naive Bayes | Tested | 83,8969 | 100 | 84,0580 | 11 |
| 2.7 | Naive Bayes | Tested | 87,4396 | 78 | 88,4058 | 8 |
| 2.8 | SVM | Tested | 85,9903 | 87 | 91,3043 | 6 |
| 2.9 | SVM | Tested | 89,2110 | 67 | 89,8551 | 7 |
| 2.10 | SVM | Tested | 89,8551 | 63 | 89,8551 | 7 |
| 2.11 | SVM | Tested | 89,8551 | 63 | 91,3043 | 6 |

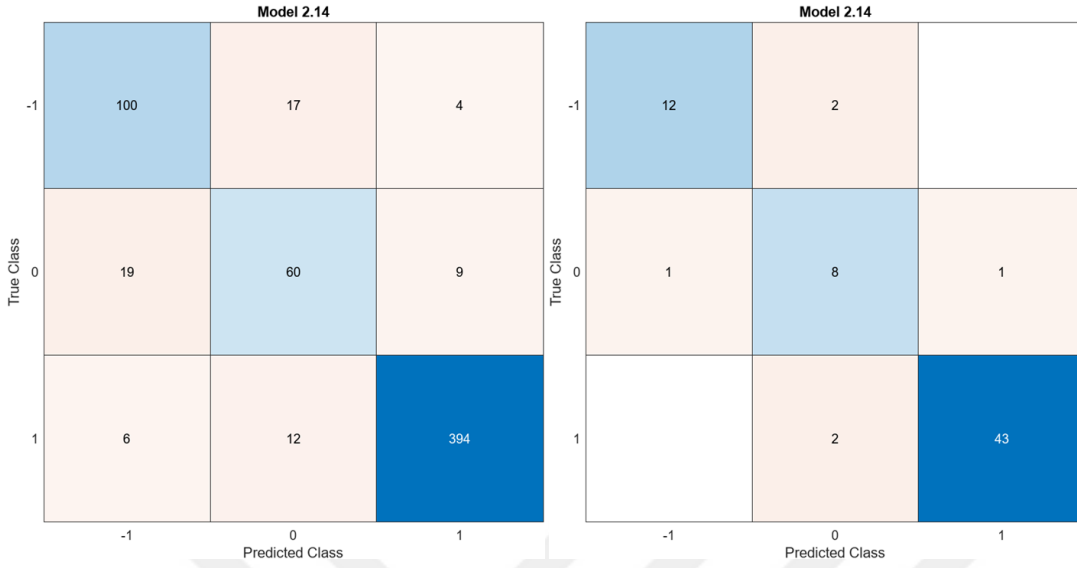
| | | | | | | |
|-------------|-------------------|--------|---------|-----|---------|----|
| 2.12 | SVM | Tested | 89,5330 | 65 | 89,8551 | 7 |
| 2.13 | SVM | Tested | 80,9984 | 118 | 79,7101 | 14 |
| 2.14 | KNN | Tested | 89,2110 | 67 | 91,3043 | 6 |
| 2.15 | KNN | Tested | 89,5330 | 65 | 88,4058 | 8 |
| 2.16 | KNN | Tested | 77,9388 | 137 | 76,8116 | 16 |
| 2.17 | KNN | Tested | 88,7279 | 70 | 85,5072 | 10 |
| 2.18 | KNN | Tested | 88,8889 | 69 | 88,4058 | 8 |
| 2.19 | KNN | Tested | 89,5330 | 65 | 91,3043 | 6 |
| 2.20 | Ensemble | Tested | 89,2110 | 67 | 92,7536 | 5 |
| 2.21 | Ensemble | Tested | 89,0499 | 68 | 92,7536 | 5 |
| 2.22 | Ensemble | Tested | 82,7697 | 107 | 82,6087 | 12 |
| 2.23 | Ensemble | Tested | 90,1771 | 61 | 94,2029 | 4 |
| 2.24 | Ensemble | Tested | 87,6006 | 77 | 91,3043 | 6 |
| 2.25 | Neural Network | Tested | 89,0499 | 68 | 86,9565 | 9 |
| 2.26 | Neural Network | Tested | 88,5668 | 71 | 91,3043 | 6 |
| 2.27 | Neural Network | Tested | 89,0499 | 68 | 89,8551 | 7 |
| 2.28 | Neural Network | Tested | 87,9227 | 75 | 92,7536 | 5 |
| 2.29 | Neural Network | Tested | 87,9227 | 75 | 91,3043 | 6 |
| 2.30 | Kernel | Tested | 88,7279 | 70 | 89,8551 | 7 |
| 2.31 | Kernel | Tested | 88,0837 | 74 | 89,8551 | 7 |



Şekil 48. Ensemble-Subspace KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %94.2 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri.



Şekil 49. SVM-Fine Gaussian makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %91.3 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri.



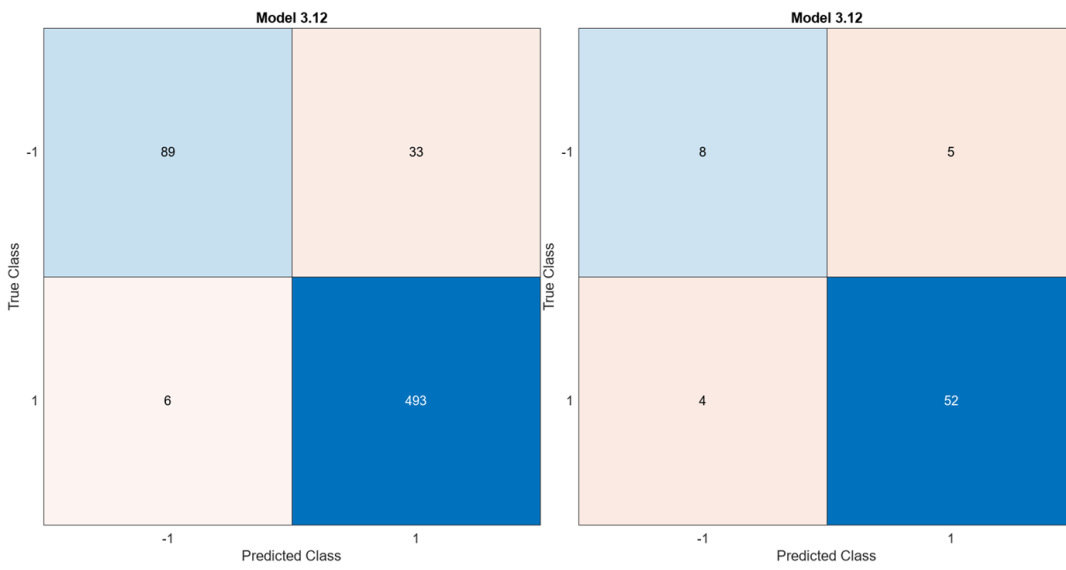
Şekil 50. KNN-Fine KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %91.3 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri.

Tablo 16. PAMPA verileri ile yapılan KBB- ve KBB+ verilere göre eğitilmiş modeller. Eğitim verisi 690 molekülü içermekte olup çapraz katlama değeri 10'dur. Belirlenen 5 molekül özelliğine kullanılmıştır.

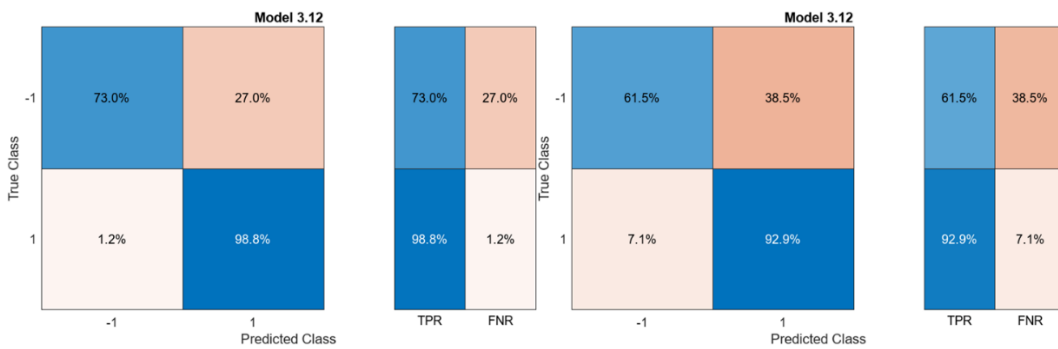
| Model Number | Model Type | Status | Accuracy % (Validation) | Total Cost (Validation) | Accuracy % (Test) | Total Cost (Test) |
|--------------|--------------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Tree | Tested | 93,2367 | 42 | 88,405797 | 8 |
| 3,1 | Tree | Tested | 93,2367 | 42 | 88,405797 | 8 |
| 3,2 | Tree | Tested | 93,2367 | 42 | 86,956522 | 9 |
| 3,3 | Tree | Tested | 93,0757 | 43 | 86,956522 | 9 |
| 3,4 | Discriminant | Tested | 88,7279 | 70 | 84,057971 | 11 |
| 3,5 | Discriminant | Tested | 89,211 | 67 | 81,15942 | 13 |

| | | | | | | |
|-------------|---------------------|--------|---------|----|-----------|----|
| 3,6 | Logistic Regression | Tested | 92,9147 | 44 | 86,956522 | 9 |
| 3,7 | Naive Bayes | Tested | 87,7617 | 76 | 82,608696 | 12 |
| 3,8 | Naive Bayes | Tested | 91,6264 | 52 | 86,956522 | 9 |
| 3,9 | SVM | Tested | 88,2448 | 73 | 82,608696 | 12 |
| 3,1 | SVM | Tested | 92,5926 | 46 | 86,956522 | 9 |
| 3,11 | SVM | Tested | 93,2367 | 42 | 85,507246 | 10 |
| 3,12 | SVM | Tested | 93,7198 | 39 | 86,956522 | 9 |
| 3,13 | SVM | Tested | 92,7536 | 45 | 86,956522 | 9 |
| 3,14 | SVM | Tested | 90,9823 | 56 | 86,956522 | 9 |
| 3,15 | KNN | Tested | 92,7536 | 45 | 89,855072 | 7 |
| 3,16 | KNN | Tested | 93,0757 | 43 | 86,956522 | 9 |
| 3,17 | KNN | Tested | 85,9903 | 87 | 79,710145 | 14 |
| 3,18 | KNN | Tested | 92,4316 | 47 | 85,507246 | 10 |
| 3,19 | KNN | Tested | 92,9147 | 44 | 86,956522 | 9 |
| 3,2 | KNN | Tested | 92,9147 | 44 | 89,855072 | 7 |
| 3,21 | Ensemble | Tested | 93,2367 | 42 | 88,405797 | 8 |
| 3,22 | Ensemble | Tested | 93,3977 | 41 | 88,405797 | 8 |
| 3,23 | Ensemble | Tested | 88,8889 | 69 | 84,057971 | 11 |
| 3,24 | Ensemble | Tested | 93,2367 | 42 | 89,855072 | 7 |
| 3,25 | Ensemble | Tested | 89,533 | 65 | 88,405797 | 8 |
| 3,26 | Neural Network | Tested | 93,5588 | 40 | 88,405797 | 8 |
| 3,27 | Neural Network | Tested | 93,3977 | 41 | 88,405797 | 8 |
| 3,28 | Neural Network | Tested | 93,5588 | 40 | 88,405797 | 8 |

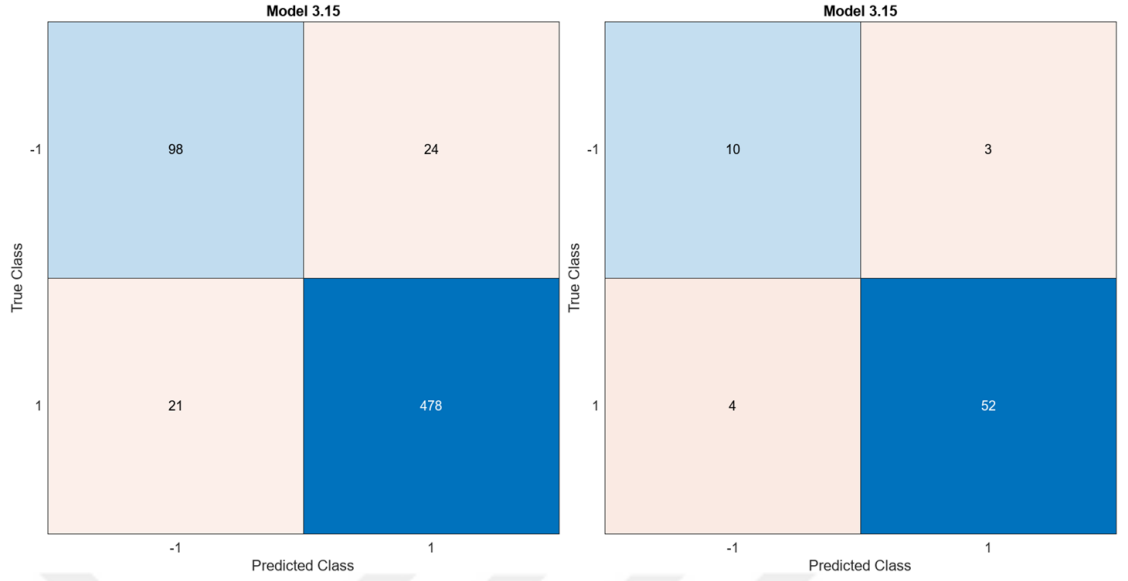
| | | | | | | |
|-------------|----------------|--------|---------|----|-----------|----|
| 3,29 | Neural Network | Tested | 93,2367 | 42 | 88,405797 | 8 |
| 3,3 | Neural Network | Tested | 93,5588 | 40 | 84,057971 | 11 |
| 3,31 | Kernel | Tested | 90,8213 | 57 | 86,956522 | 9 |
| 3,32 | Kernel | Tested | 91,6264 | 52 | 85,507246 | 10 |



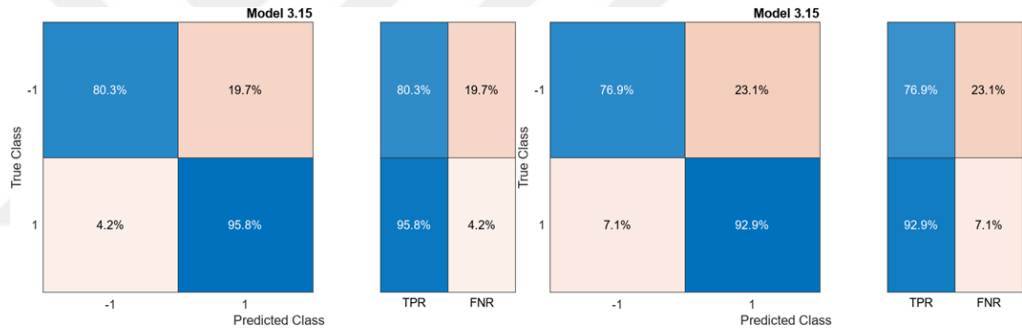
Şekil 51. SVM-Fine Gaussian makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %87 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri.



Şekil 52. SVM-Fine Gaussian makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %87 doğruluk elde etmiş modelin sırasıyla validasyon ve test doğru pozitif ve yanlış negatif matrisleri.



Şekil 53. KNN-Fine KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %89.9 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri.



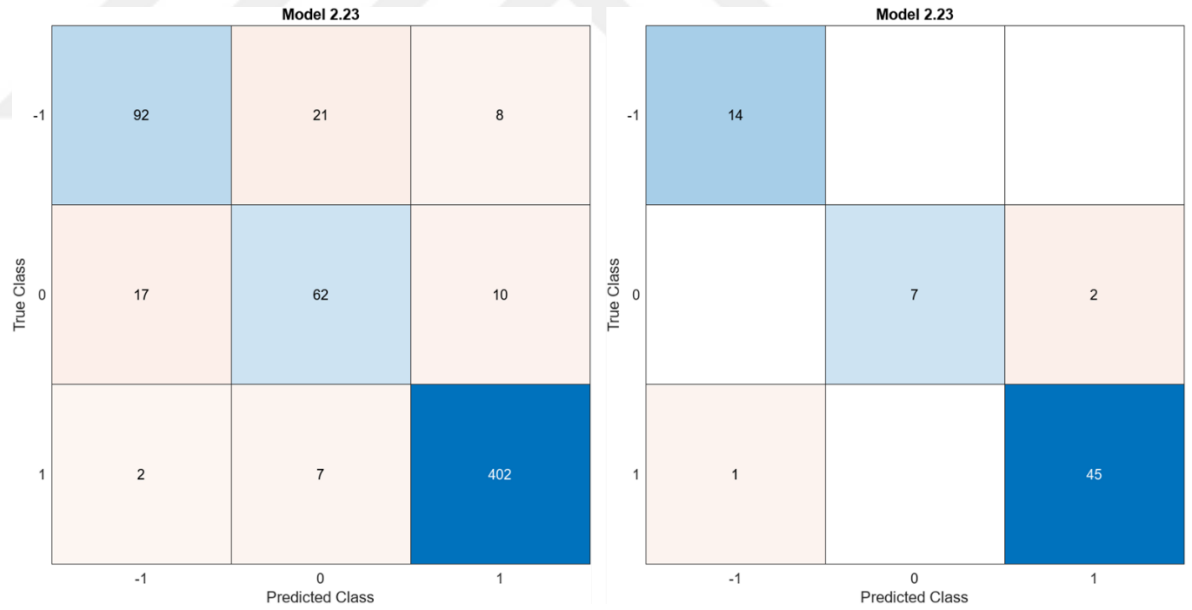
Şekil 54. KNN-Fine KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %89.9 doğruluk elde etmiş modelin sırasıyla validasyon ve test doğru pozitif ve yanlış negatif matrisleri.

Tablo 17. PAMPA verileri ile yapılan KBB-, KBB+ ve Tanımsız verilere göre eğitilmiş modeller. Eğitim verisi 690 kimyasal içermekte olup çapraz katlama değeri 5'dur. Belirlenen 5 molekül özelliğine kullanılmıştır.

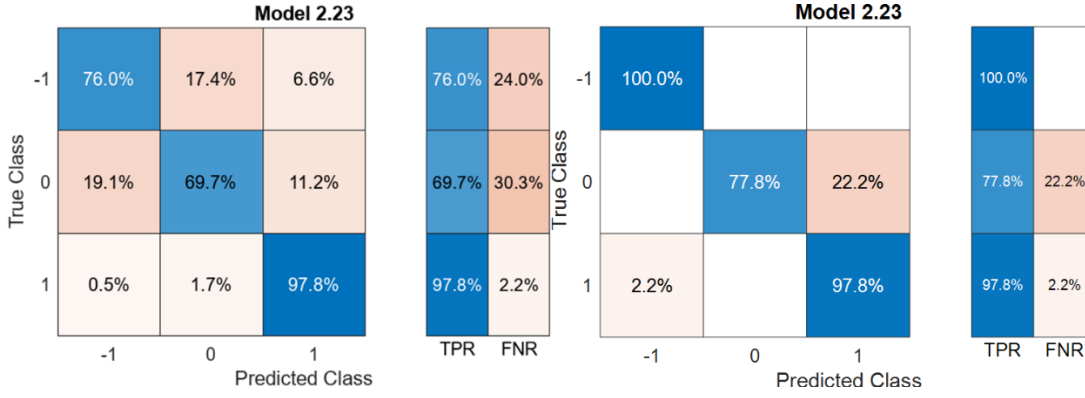
| Model Number | Model Type | Status | Accuracy % (Validation) | Total Cost (Validation) | Accuracy % (Test) | Total Cost (Test) |
|--------------|------------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Tree | Tested | 89,5330 | 65 | 92,7536 | 5 |
| 2,1 | Tree | Tested | 89,5330 | 65 | 92,7536 | 5 |

| | | | | | | |
|-------------|--------------|--------|---------|-----|---------|----|
| 2,2 | Tree | Tested | 89,8551 | 63 | 91,3043 | 6 |
| 2,3 | Tree | Tested | 88,4058 | 72 | 94,2029 | 4 |
| 2,4 | Discriminant | Tested | 80,0322 | 124 | 84,0580 | 11 |
| 2,5 | Discriminant | Tested | 86,4734 | 84 | 94,2029 | 4 |
| 2,6 | Naive Bayes | Tested | 82,4477 | 109 | 86,9565 | 9 |
| 2,7 | Naive Bayes | Tested | 86,1514 | 86 | 94,2029 | 4 |
| 2,8 | SVM | Tested | 81,1594 | 117 | 94,2029 | 4 |
| 2,9 | SVM | Tested | 88,2448 | 73 | 94,2029 | 4 |
| 2,1 | SVM | Tested | 88,7279 | 70 | 92,7536 | 5 |
| 2,11 | SVM | Tested | 90,0161 | 62 | 92,7536 | 5 |
| 2,12 | SVM | Tested | 88,5668 | 71 | 95,6522 | 3 |
| 2,13 | SVM | Tested | 80,0322 | 124 | 84,0580 | 11 |
| 2,14 | KNN | Tested | 87,9227 | 75 | 95,6522 | 3 |
| 2,15 | KNN | Tested | 88,5668 | 71 | 94,2029 | 4 |
| 2,16 | KNN | Tested | 73,2689 | 166 | 81,1594 | 13 |
| 2,17 | KNN | Tested | 87,4396 | 78 | 95,6522 | 3 |
| 2,18 | KNN | Tested | 88,0837 | 74 | 94,2029 | 4 |
| 2,19 | KNN | Tested | 88,7279 | 70 | 97,1014 | 2 |
| 2,2 | Ensemble | Tested | 90,1771 | 61 | 92,7536 | 5 |
| 2,21 | Ensemble | Tested | 88,2448 | 73 | 92,7536 | 5 |
| 2,22 | Ensemble | Tested | 79,5491 | 127 | 84,0580 | 11 |
| 2,23 | Ensemble | Tested | 89,5330 | 65 | 95,6522 | 3 |
| 2,24 | Ensemble | Tested | 87,4396 | 78 | 88,4058 | 8 |

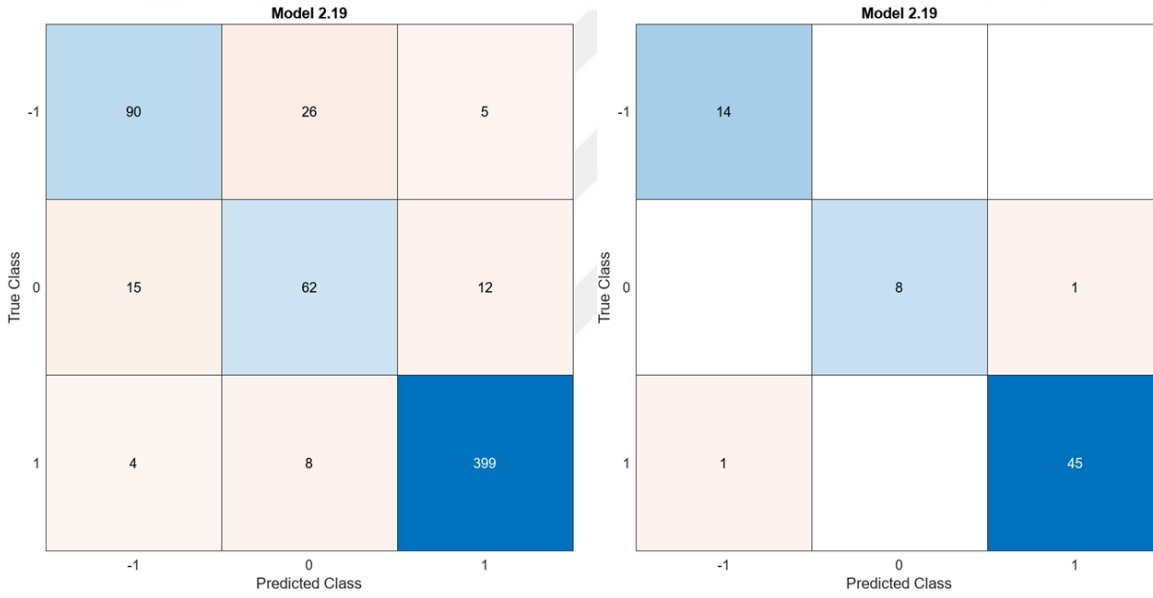
| | | | | | | |
|-------------|----------------|--------|---------|----|---------|---|
| 2,25 | Neural Network | Tested | 88,8889 | 69 | 92,7536 | 5 |
| 2,26 | Neural Network | Tested | 88,7279 | 70 | 88,4058 | 8 |
| 2,27 | Neural Network | Tested | 87,9227 | 75 | 91,3043 | 6 |
| 2,28 | Neural Network | Tested | 89,2110 | 67 | 89,8551 | 7 |
| 2,29 | Neural Network | Tested | 88,7279 | 70 | 89,8551 | 7 |
| 2,3 | Kernel | Tested | 88,8889 | 69 | 92,7536 | 5 |
| 2,31 | Kernel | Tested | 87,7617 | 76 | 92,7536 | 5 |



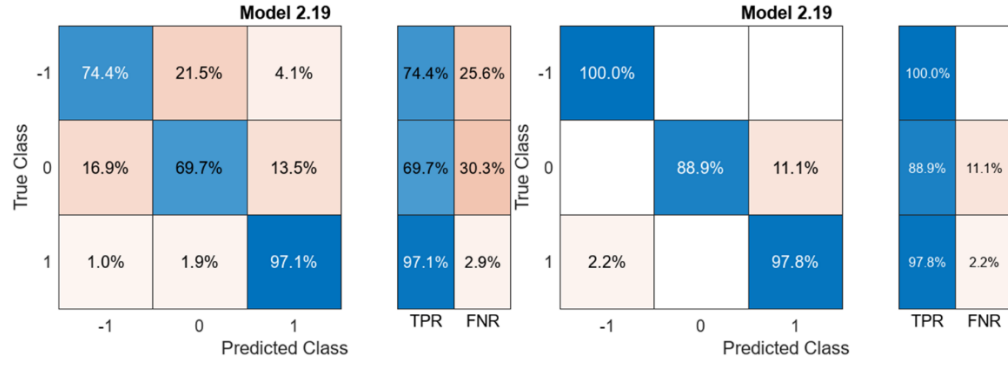
Şekil 55. Ensemble-Subspace KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %95.7 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri.



Şekil 56. Ensemble-Subspace KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %95.7 doğruluk elde etmiş modelin sırasıyla validasyon ve test doğru pozitif ve yanlış negatif matrisleri.



Şekil 57. KNN-Weighted KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %97.1 doğruluk elde etmiş modelin validasyon ve test matrisleri.



Şekil 58. KNN-Weighted KNN makine öğrenimi ile eğitilmiş, eğitime katılmamış verilerde %97.1 doğruluk elde etmiş modelin sırasıyla validasyon ve test doğru pozitif ve yanlış negatif matrisleri.

Tablo 18. PAMPA ve SwissADDme verileri ile yapılan KBB-, ve KBB+ verilere göre eğitilmiş modeller. Eğitim verisi 930 molekülü içermekte olup çapraz katlama değeri 25'tir. Belirlenen 5 molekül özelliğine kullanılmıştır.

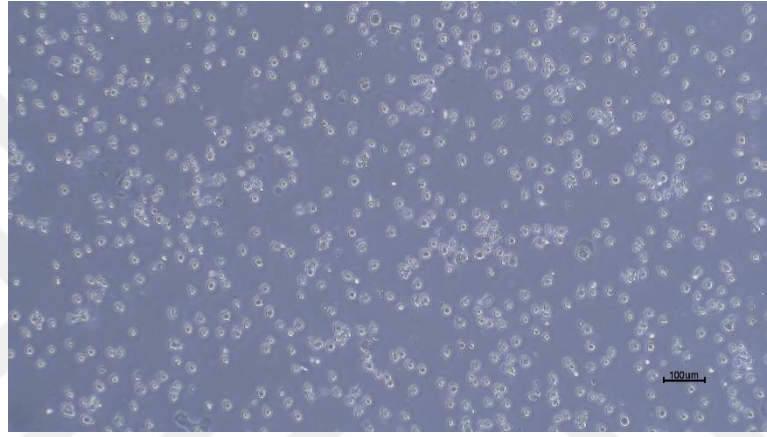
| Model Number | Model Type | Status | Accuracy % (Validation) | Total Cost (Validation) | Accuracy % (Test) | Total Cost (Test) |
|--------------|---------------------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | Tree | Tested | 83,8095 | 136 | 73,1183 | 25 |
| 2,1 | Tree | Tested | 83,8095 | 136 | 73,1183 | 25 |
| 2,2 | Tree | Tested | 86,0714 | 117 | 81,7204 | 17 |
| 2,3 | Tree | Tested | 85,5952 | 121 | 83,8710 | 15 |
| 2,4 | Discriminant | Tested | 82,9762 | 143 | 81,7204 | 17 |
| 2,5 | Discriminant | Tested | 80,9524 | 160 | 77,4194 | 21 |
| 2,6 | Logistic Regression | Tested | 83,0952 | 142 | 81,7204 | 17 |
| 2,7 | Naive Bayes | Tested | 80,5952 | 163 | 77,4194 | 21 |
| 2,8 | Naive Bayes | Tested | 84,5238 | 130 | 83,8710 | 15 |
| 2,9 | SVM | Tested | 82,6190 | 146 | 81,7204 | 17 |
| 2,10 | SVM | Tested | 85,0000 | 126 | 83,8710 | 15 |
| 2,11 | SVM | Tested | 85,4762 | 122 | 77,4194 | 21 |

| | | | | | | |
|-------------|-------------------|--------|---------|-----|---------|----|
| 2,12 | SVM | Tested | 86,6667 | 112 | 81,7204 | 17 |
| 2,13 | SVM | Tested | 85,9524 | 118 | 82,7957 | 16 |
| 2,14 | SVM | Tested | 82,8571 | 144 | 81,7204 | 17 |
| 2,15 | KNN | Tested | 84,1667 | 133 | 76,3441 | 22 |
| 2,16 | KNN | Tested | 85,1190 | 125 | 82,7957 | 16 |
| 2,17 | KNN | Tested | 81,4286 | 156 | 82,7957 | 16 |
| 2,18 | KNN | Tested | 85,3571 | 123 | 81,7204 | 17 |
| 2,19 | KNN | Tested | 85,7143 | 120 | 82,7957 | 16 |
| 2,2 | KNN | Tested | 85,4762 | 122 | 79,5699 | 19 |
| 2,21 | Ensemble | Tested | 86,5476 | 113 | 81,7204 | 17 |
| 2,22 | Ensemble | Tested | 86,0714 | 117 | 77,4194 | 21 |
| 2,23 | Ensemble | Tested | 83,0952 | 142 | 81,7204 | 17 |
| 2,24 | Ensemble | Tested | 84,5238 | 130 | 78,4946 | 20 |
| 2,25 | Ensemble | Tested | 82,6190 | 146 | 72,0430 | 26 |
| 2,26 | Neural Network | Tested | 85,7143 | 120 | 78,4946 | 20 |
| 2,27 | Neural Network | Tested | 82,6190 | 146 | 77,4194 | 21 |
| 2,28 | Neural Network | Tested | 84,8810 | 127 | 76,3441 | 22 |
| 2,29 | Neural Network | Tested | 85,7143 | 120 | 77,4194 | 21 |
| 2,3 | Neural Network | Tested | 85,5952 | 121 | 77,4194 | 21 |
| 2,31 | Kernel | Tested | 85,3571 | 123 | 82,7957 | 16 |
| 2,32 | Kernel | Tested | 85,3571 | 123 | 83,8710 | 15 |

4.8. Geliştirilen Modellerin Karşılaştırılması

4.8.1. Statik Modelde Monosit Geçişinin İncelenmesi

Por oluşturulan ve oluşturulmayan membranlar olmak üzere bütün membranlarından monosit geçişi doğrulanmış ve 5. günde en yüksek TEER değerine sahip BS membranda HBEC-5i hücreleriyle KBB modeli oluşturularak monosit geçişi incelenmiştir.



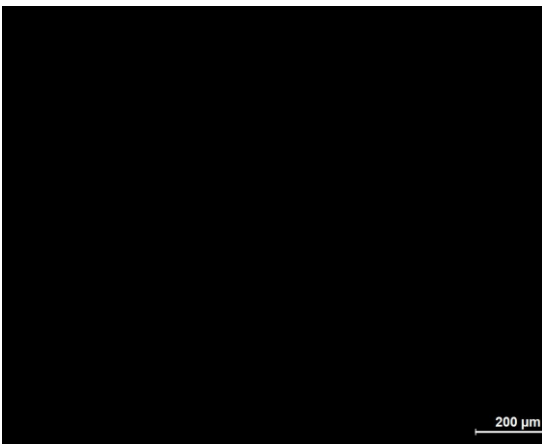
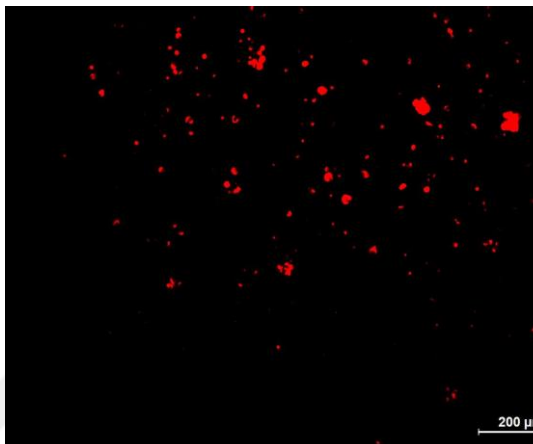
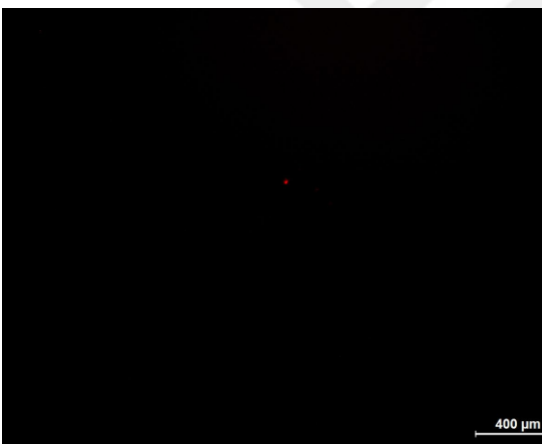
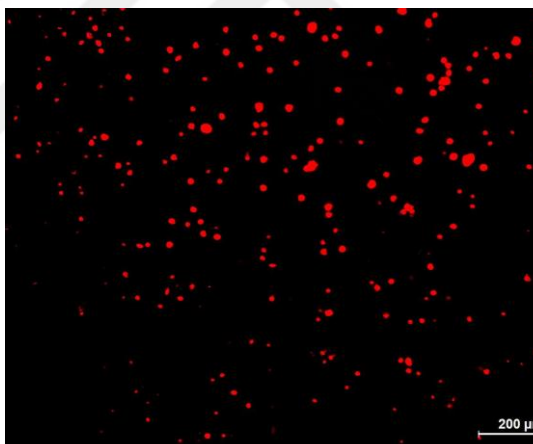
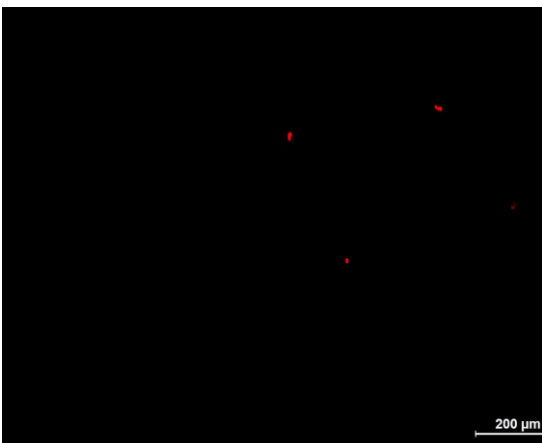
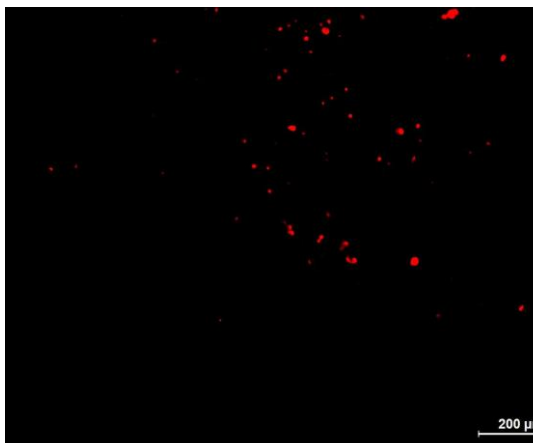
Şekil 59. THP-1 hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü, hücrelerin süspansiyon monositik yapıda olduğu görülmektedir. Ölçek çizgisi 50 μm 'yi göstermektedir

Monosit ve makrofaj fonksiyonlarının modellenmesinde sıklıkla kullanılan THP-1 hücrelerinin Şekil 31'de monositik hücre morfolojisinde olduğu görülmektedir. THP-1 hücrelerinin süspansiyon yapıda olduğu ve tek çekirdekli küçük hücre morfolojisini göstererek monositik özellikleri taşıdığı gözlemlenmektedir (Daigneault et al., 2010, Chanput et al., 2014).

THP-1 monositleri Cell Tracker Red Dye ile boyanarak cell crown'lara takılmış olan por optimizasyonu yapılmış olan PCL ve BS membranlardan geçirilmiştir.

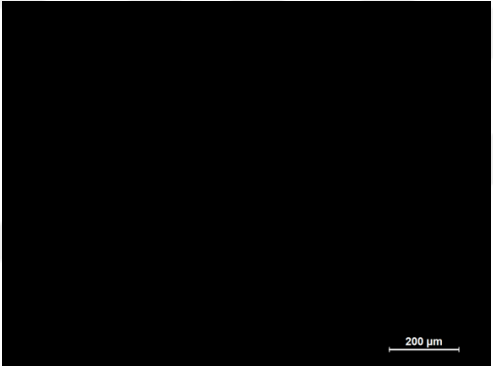
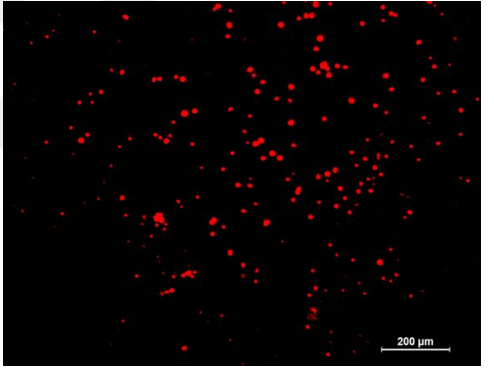

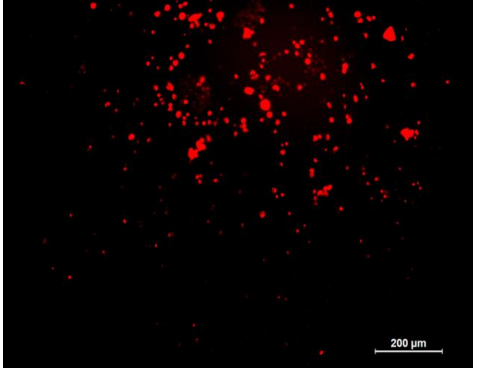
İskelelerde 1. saatten itibaren monosit geçişi gözlemlenmiştir. Tablo 19'da 4. saat sonunda geçen monositlerin fotoğrafları görülmektedir. İskelelerde por optimizasyon öncesi monosit geçişi görülmezken; sonrasındaki monosit geçişi por çapı optimizasyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu noktada porlardan monosit geçişi herhangi bir indükleyici faktör bulundurmadan gerçekleşmiştir.

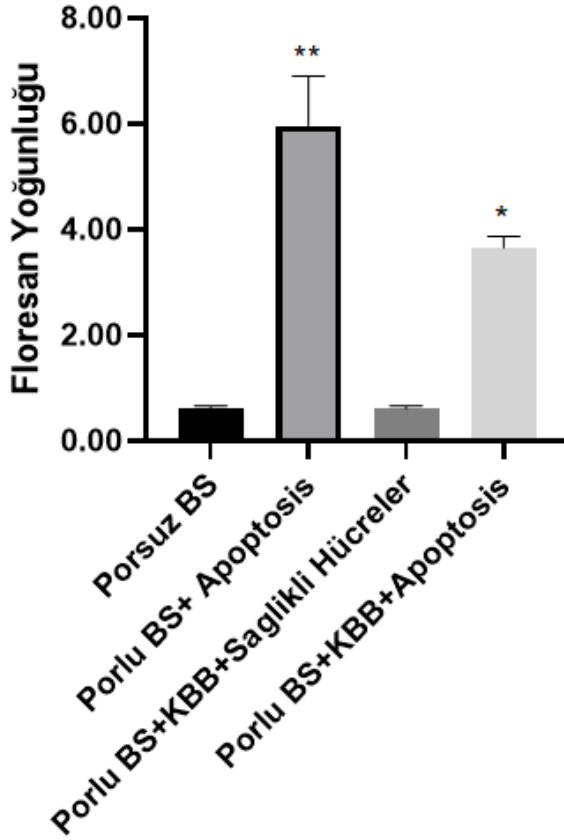
Tablo 19. Doğal ve porlu membranlarda monosit geçişi.

| Doğal BS Membran | Porlu BS Membran |
|---|--|
|  |  |
| Doğal PCL Membran | Porlu PCL Membran |
|  |  |
| Doğal Jelatin Kaplı PCL Membran | Porlu Jelatin Kaplı PCL Membran |
|  |  |

BS membran üzerinde statik KBB modeli oluşturulup en yüksek TEER değerine ulaşılan 5. günde monositler 10^5 hücre/mL olacak şekilde endotel hücrelerin tutunduğu luminal kısımdan kültüre dahil edilmiştir. Abluminal kısımda kemotaksik bir indükleyici olarak apoptosis oluşturulmuştur. Apoptotik hücrelerin bariyerden monosit geçişini tetiklemesi beklenmiştir. 4 saat sonrasında monositlerin geçişi celltracker ile gözlemlenmiş ve KBB modeli boyunca geçen monositlerin ImageJ analiz yöntemi kullanılarak floresan yoğunlukları ölçülmüştür (Rouhiainen et al., 2004; Goetze et al., 2011; Matuszak et al., 2018).

Tablo 20. Porlu BS membranda HBEC-5i hücreleri ile oluşturulan KBB modelinde monosit geçişinin incelenmesi

| | |
|---|--|
| Porsuz BS Membran | Porlu BS Membran ve Apoptotik SHSY5Y Hücreleri |
|  |  |
| Porlu BS Membran+KBB+ Sağlıklı SHSY5Y Hücreleri | Porlu BS Membran+KBB+Apoptotik SHSY5Y Hücreleri |
|  |  |

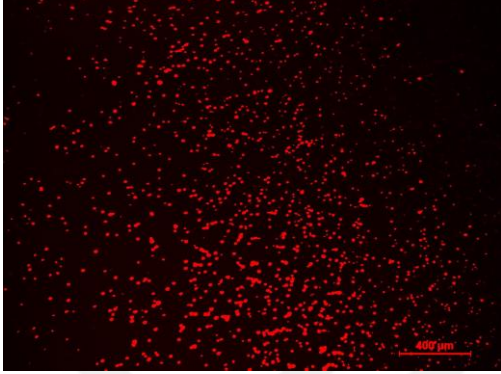
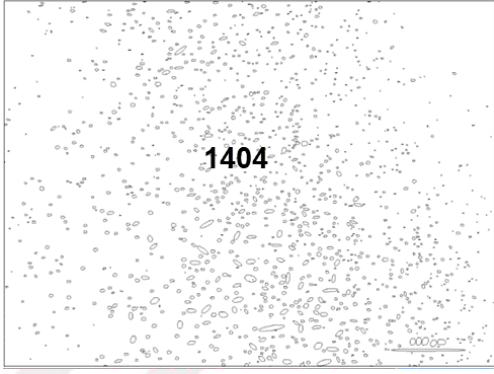

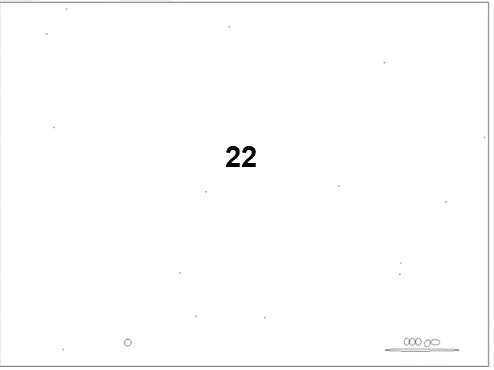

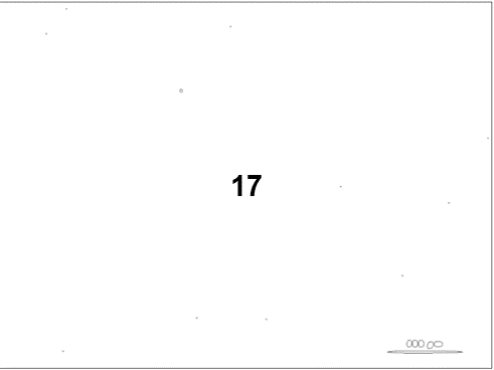


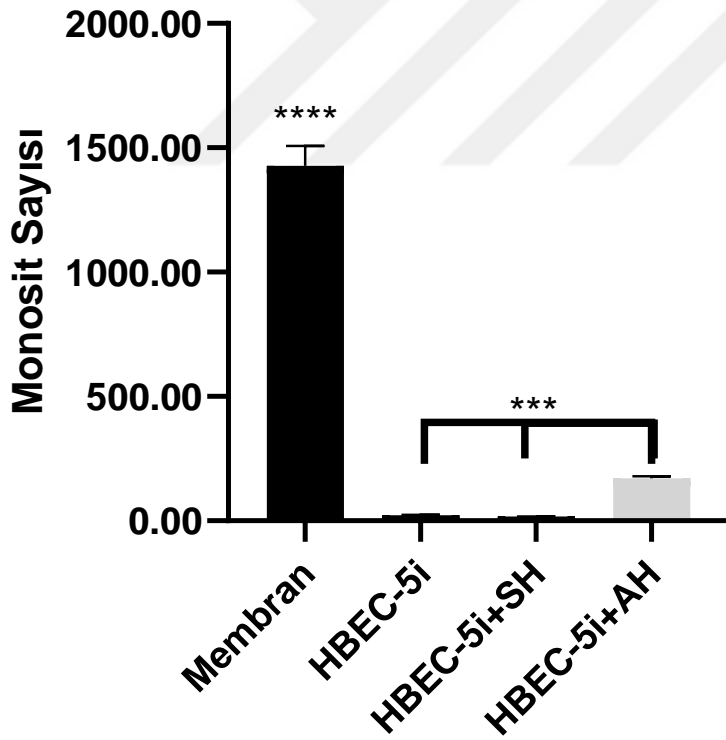
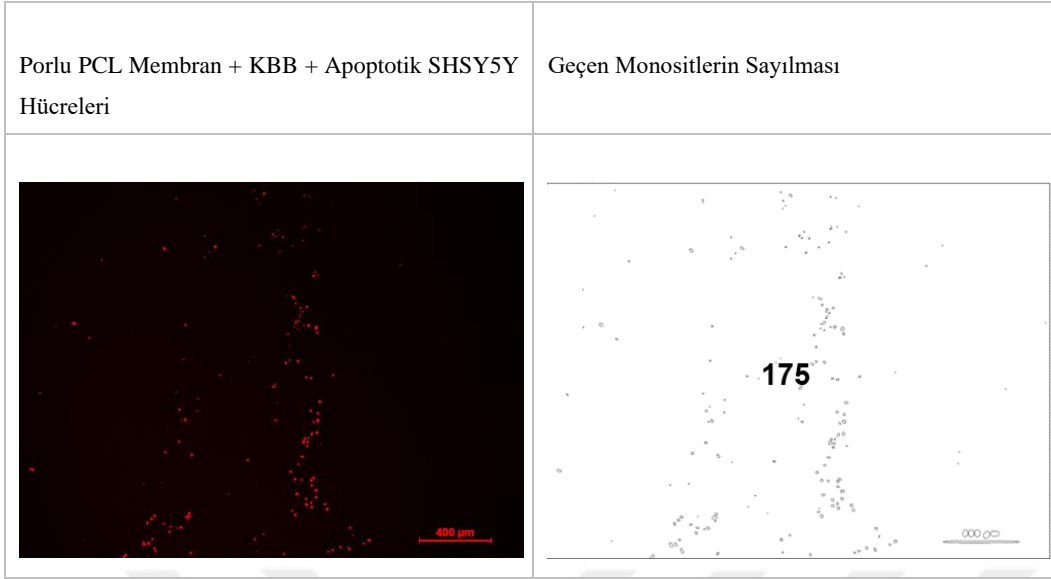
Şekil 60. Monosit migrasyon miktarının floresan yoğunluk grafiği. Monositlerin porsuz doğal BS membrandan geçmediği, porlu membrandan ise apoptotik hücre varlığında geçtiği, KBB modelinde ise bu geçişin kısmen sınırlandırıldığı görülmektedir. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Tablo 20’de doğal porsuz BS membrandan ve porlu membran üzerine HBEC-5i hücreleriyle oluşturulan KBB’den işaretli monositlerin geçmediği görülmektedir. Apoptotik hücre varlığında ise porlu BS membrandan da KBB oluşturulan porlu BS membrandan da apoptotik hücre geçişi gözlemlenmiştir. Görsellerin floresan yoğunluğu ImageJ programı ile analiz edildiğinde apoptotik indükleyici faktör varlığının monosit geçişini anlamlı derecede arttırdığı görülmektedir. İndükleyici faktör bulunmadığında ise monosit geçişinin gerçekleşmediği görülmektedir.

Bu sonuç KBB varlığının monosit migrasyonunu doğrudan etkilediğini göstermektedir.

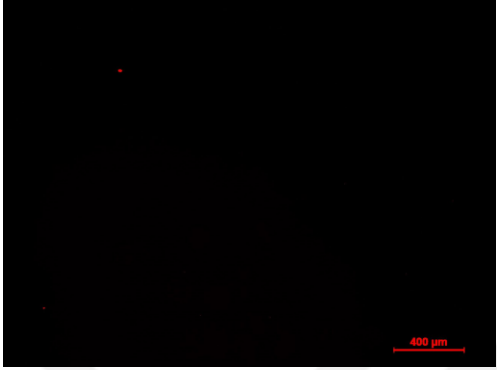
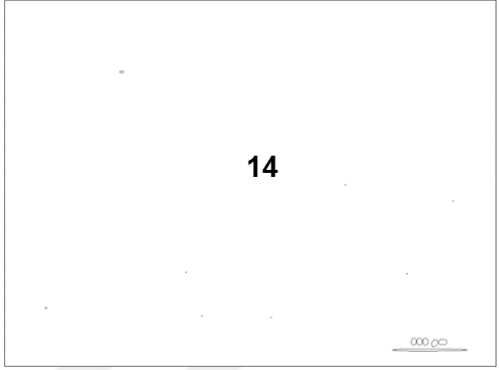
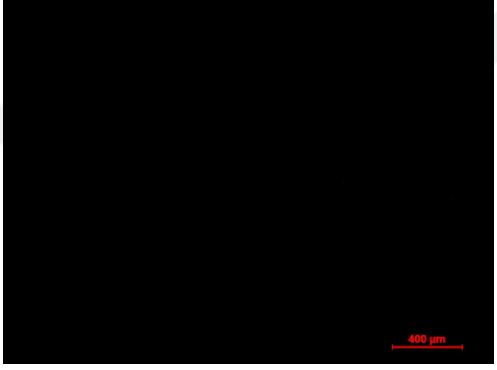
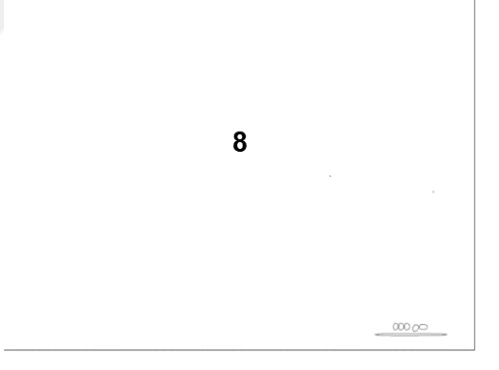

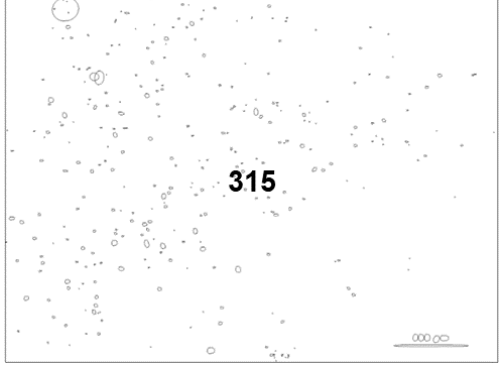
Tablo 21. Porlu PCL membranlardan HBEC-5i hücreleri ile oluşturulan KBB modellerinden ve sadece porlu PCL membrandan monosit geçişinin incelenmesi ve Imagej programı ile sayılması.

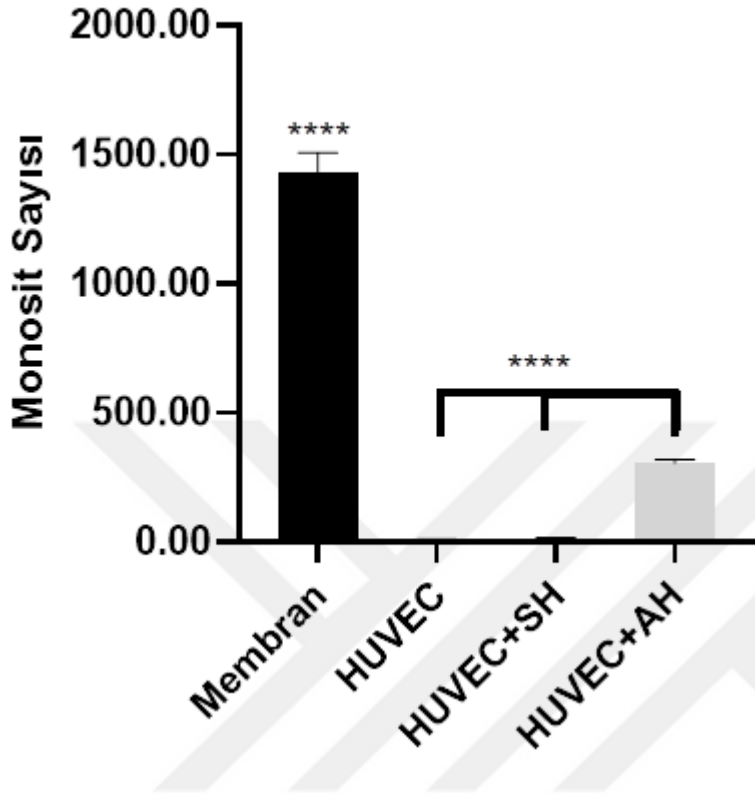
| Porlu PCL Membrandan | Geçen Monositlerin Sayılması |
|---|--|
|  |  |
| Porlu PCL Membran + KBB | Geçen Monositlerin Sayılması |
|  |  |
| Porlu PCL Membran + KBB + Sağlıklı SHSY5Y Hücreleri | Geçen Monositlerin Sayılması |
|  |  |



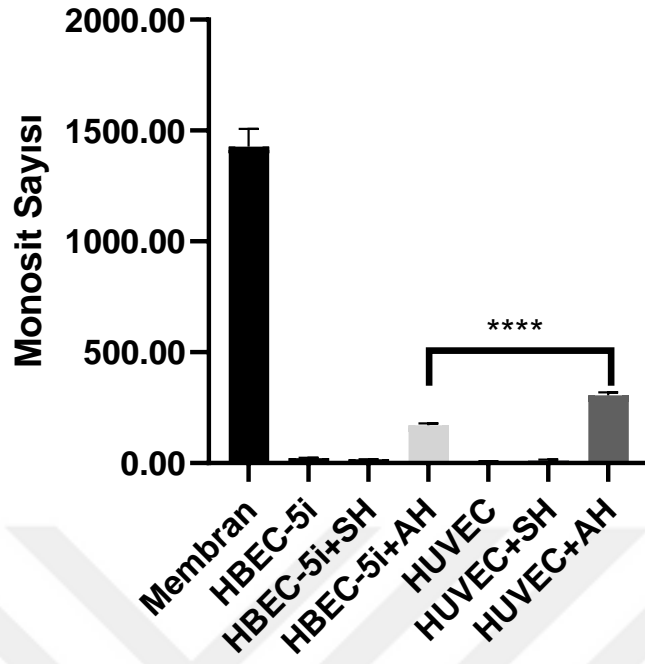
Şekil 61. Monosit migrasyon miktarının sayım grafiği. Monositlerin KBB oluşturulmuş porlu membrandan geçemediği ancak apoptotik hücre (AH) varlığında geçebildiği görülmektedir. (**p<0,005, ****p<0,001)

Tablo 22. Porlu PCL membranlardan HUVEC hücreleri ile oluşturulan KBB modellerinden monosit geçişinin incelenmesi ve Imagej programı ile sayılması

| Porlu PCL Membran + KBB | Geçen Monositlerin Sayılması |
|---|--|
|  |  <p style="text-align: center;">14</p> |
| <p>Porlu PCL Membran + KBB + Sağlıklı SHSY5Y Hücreleri</p> | <p>Geçen Monositlerin Sayılması</p> |
|  |  <p style="text-align: center;">8</p> |
| <p>Porlu PCL Membran + KBB + Apoptotik SHSY5Y Hücreleri</p> | <p>Geçen Monositlerin Sayılması</p> |
|  |  <p style="text-align: center;">315</p> |



Şekil 62. Monosit migrasyon miktarının sayım grafiği. Monositlerin KBB oluşturulmuş porlu membrandan geçemediği ancak apoptotik hücre varlığında migre edebildiği görülmektedir. (****p<0,001)



Şekil 63. Monosit migrasyon miktarının sayım grafiği. Monositlerin HBEC-5i kullanılarak yapılan KBB modelinde migrasyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir.(****p<0,001)

5. TARTIŞMA

5.1. Hücre Kültürü

HBEC-5i hücreleri serebral korteksten izole edilen serebral mikrovasküler damar endoteli hücreleridir. Monolayer halinde büyüyen hücreler, sıkı bağlantı ve adherens proteinlerini ifade etmesi sebebiyle literatürde KBB çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir hücre hattı olmuştur (Puech et al., 2018; Aykar vd., 2023). Kullanılan HBEC-5i hücreleri mekanik hasara duyarlı hücreler olup pasajlama işlemi yaparken mekanik bir stres uygulanmaması gerekmektedir (Avril, 2015). Ayrıca bu çalışmada dondurulmuş hücreyi açarken de aynı sebepten dolayı kriyoprotektan olarak kullanılan DMSO santrifüj yolu ile uzaklaştırılmayıp ortamla konsantrasyonu düşürülmüş bir gece sonra ortam yenilenmiştir. Son olarak hücreler konfluent olmaları durumunda stok olarak kullanılamamaktadır. Hücrelerin morfolojik özellikleri değişerek sonraki pasajlarda yüzeyden kalkmaktadır. Tüm hücre kültürü uygulamaları buna uygun olarak yapılmıştır.

Göbek kordonu toplar damarından izole edilmiş olan HUVEC damar endotel hücreleri HBEC-5i hücrelerinin aksine *in vitro* olarak daha sızdıran bariyerler oluşturur (Oddo et al., 2019). Aslında KBB'yi modellemek için tam olarak uygun değildir yine de sıkı bağlantı proteinlerini ifade etmesi sebebiyle literatürde pek çok çalışmada KBB modelinde kullanılmıştır (Adriani et al., 2017; Kuruca et al., 2017; Singh et al., 2022). Tez çalışmasında HUVEC hücrelerinin literatüre benzer morfolojide olduğu ve endotel hücrelerine karakterize olarak kaldırım taşı yapısında morfoloji sergilediği görülmüştür. Ek olarak floresan boyamalarda Occludin, Vimentin ve Claudin-4 yüzey belirteçlerini gözlemlenmiş, beklenen sıkı bağlantı özelliklerini göstermiştir.

İnsan monosit hücre modeli olarak kullanılan THP-1 hücreleri süspanse şekilde kültive edilen hücrelerin monositik hücre morfolojisinde olduğu görülmüştür. THP-1 hücrelerinde tek çekirdekli küçük hücre morfolojisi gözlemlenmiştir (Daigneault et al., 2010, Chanput at al., 2014; Bosshart et al., 2016).

Nöroblastoma hücre hattı olan SHSY-5Y hücreleri, monolayer kültive edilen ve nörit benzeri yapılar sergileyen nöron model olarak kullanılan hücrelerdir. SHSY-5Y hücrelerinin literatürle paralel doğrultuda nöronal hücre morfolojisi gösterdiği gözlemlenmiştir (Kovalevich and Langford, 2013, Teppola et al., 2016). Çalışmada nöroinflamasyonun modellenmesinde kullanılan bu hücrelerin apoptoz karakterizasyonu daha önce laboratuvarımızda yapılan bir yüksek lisans tezinde tamamlanmıştır (Morçimen, 2020). Benzer protokol tekrarlandığı için tekrar apoptoz karakterizasyonuna gidilmemiştir.

5.2. Doku İskelesi Üretimi

KBB'de bazal membranı taklit eden biyomalzemeler üzerine sınırlı çalışma vardır (Bayır vd., 2019). Bazal membranın özelliği KBB fonksiyonelliği açısından önemlidir. Bazal membranı taklit edecek biyomalzemelerde hücre tutunmasını, çoğalmasını ve migrasyonunu desteklemesi, biyomoleküllerin geçişine imkân tanınması gibi özellikler aranır. Migrasyonu desteklemedeki en temel faktör kullanılan membranın por çapıdır. Bu tez çalışmasında bazal membranı taklit edebilecek iki farklı polimerle çalışılmış ve üretilen bu membranlara monosit migrasyonuna izin verecek boyutta porlar açılmıştır.

Nano ölçekli çaplarda fiberli yapılara sahip elektroğirilmiş membranlar mekanik dayanımı ve geniş yüzey alanı/hacim oranı özellikleri sebebiyle hücre kültüründe ve mikroakışkan platformlarda umut vadeden malzemelerdir. Çalışmada PCL polimeri kullanılarak elektroğirilmiş membranlar elde edilmiştir. Membranda por optimizasyonu için PEO, PVA ve Sukroz (tanecik boyutu<100 µm) ile PCL eğirilmesi ve delikli alüminyum folyo üzerine PCL eğirmesi denemeleri gerçekleştirilmiştir. Delikli alüminyum folyo ile eğirilen membranların monosit geçişine izin verecek olan 4-10 µm çapta porlara sahip oldukları gösterilmiştir. Aynı zamanda elektroğirilmiş PCL membranlar statik kültürde hücre tutunmasını ve çoğalmasını destekleyen sonuçlar vermiştir.

Bakteriyel selüloz membranları başarı ile üretilerek istenen gözeneklerin açılması için PCL mikropartiküller kullanılmıştır. Yin ve arkadaşları gözenek açmak için

parçalanmış agar kullanmıştır. Benzeri bir yöntem denendiğinde por çapının hedeflenenden çok daha az olduğu belirlenmiş(<1µm) bu sebeple bu yöntem kullanılmamıştır. PCL mikrokürelerle yapılan membranların por çapı dağılımı ise 1-7 µm olarak elde edilmiş; monosit migrasyonu sağlayabilecek boyutta olmuştur.

5.3. Statik *in vitro* KBB Modelinin Geliştirilmesi

KBB Modelleri, mono, iki veya daha fazla hücre tipi kullanılarak geliştirilebilir. Monokültürde oluşturulan KBB modellerinde endotel hücreleri genellikle Transwell'in üst (lüminal) bölgesinde hücreye özgü büyüme ortamında kültive edilir. Bu tez çalışmasında da HUVEC ve HBEC-5i endotel hücreleri kullanılarak PCL ve BC membranlarda monokültür KBB modeli oluşturulmuştur. KBB modellerindeki sıkı bağlantı proteinlerinin immunofloresan boyamalarla karakterize edilmesi literatürde sıklıkla kullanılmaktadır (Wolf et al., 2015; Gomes et al., 2016).

Sıkı bağlantı proteinleri KBB'deki düşük permabiliteyi kontrol eden, hücreler arası paraselüler yolu kapatan membran proteinleridir. Bu proteinlerden biri olan Occludin'in sıkı bağlantı proteinlerinin düzenlenmesi ve fonksiyonlarının yerine getirilmesinde rol oynar (Lochhead et al., 2020). Occludin yapılarındaki bozulmaların KBB geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir. Şekil 30 ve 31'de hem HUVEC hem de HBEC-5i hücrelerinin occludin proteinini ifade ettiği görülmektedir. Bu da hücrelerin sıkı bağlantıları oluşturmaya başlayarak paraselüler geçiş yolunu kapatmaya başlaması olarak değerlendirilebilir.

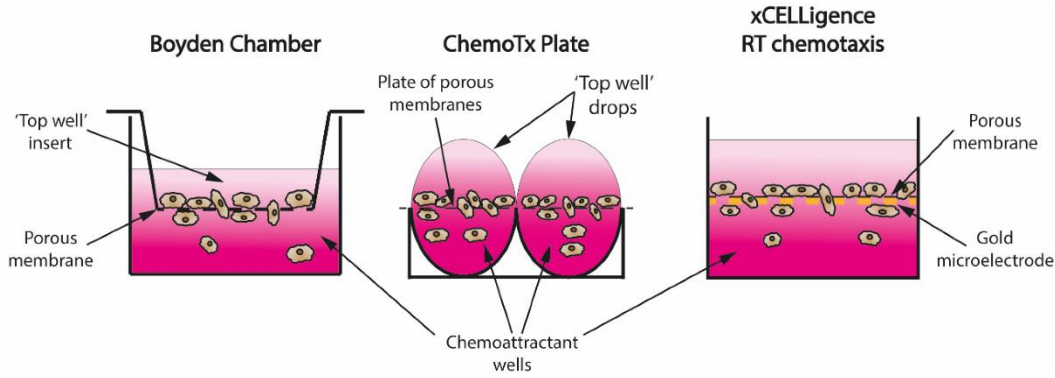
Claudinlerin, sıkı bağlantı omurgasını oluşturan ve KBB hücreleri arasındaki paraselüler "sıklığın" kritik belirleyicileri oldukları düşünülmektedir. Bugüne kadar 27 farklı claudin proteini tanımlanmıştır (Lochhead et al., 2020). Spesifik olarak claudin-4 ifadesinin seviyesi sıkı bağlantı proteinlerinin bütünlüğünü belirler. Şekil 30 ve 31'de hem HUVEC hem de HBEC-5i hücrelerinin Claudin-4 proteinini ifade ettiği görülmektedir.

Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılara ek olarak adherens bağlantıları KBB geçirgenliğinde rol oynayan bir diğer faktördür. Adherens bağlantıların hücre iskelet proteinleriyle etkileşimi, özellikle aktin filamentleriyle vimentin proteinin etkileşimi endotel geçirgenliğin düzenlenmesinde rol oynar. Yapılan çalışmalarda vimentin eksikliğinin endotel bütünlüğü bozduğu ve Vimentin filamentlerin endotel bariyeri hipoksi durumuna karşı koruduğu rapor edilmiştir (Osmanagic-Myers et al., 2015). Occludin ve Claudin 4'e benzer olarak Şekil 30 ve 31'de hem HUVEC hem de HBEC-5i hücrelerinin vimentin proteinini ifade ettiği görülmektedir. Bu bağlamda tez çalışmasında sıkı bağlantı ve adherens bağlantı proteinlerini ifade eden monokültür KBB modeli oluşturularak karakterize edilmiş olup, monosit geçiş çalışmalarında kullanılmıştır.

Model sadece endotel hücreleri kullanılarak geliştirilmiştir. Ancak literatürde astrosit ve perisit hücrelerinin birlikte kullanımının daha doğru ve daha yüksek sıkı bağlantılı model geliştirmekte kullanıldığı görülmektedir. Burada kokültüvasyonun zorluğu sebebi ile astrosit ve perisit hücreleri eklenmemiş olup ilerleyen çalışmalarda eklenmesi hedeflenmektedir. Campisi ve arkadaşları 3 hücre grubunu ve mikroakışkan platformüzerinde perfüzyon sistemini kullanarak geleneksel *in vitro* KBB modellerine göre daha güvenilir modeller elde etmiştir. Ayrıca pek çok çalışmada iPSC kullanarak düşük permeabilite değerleri elde edilerek *in vivo* değerlere yakın modeller oluşturulmuştur (Delsing et al.,2020; Appelt-Menzel et al.,2020).

5.4. Geliştirilen Modellerin Karşılaştırılması

Hücre göçü (migrasyonu), özellikle inflamasyon sırasında en temel hücre fonksiyonlarından biridir. 1841'de Addison ve 1873'te Cohnheim, kandan enfeksiyonlu dokuya göç eden hücreleri gözlemleyerek hücre hareketliliği üzerine ilk gözlemleri bildirmiştir (Rumianek and Greaves, 2020). Monosit göçünün çalışıldığı transwell analizleri ilk olarak 1960'larda tasarlanmıştır (Boyden, 1962). Boyden analizi olarak da bilinen transwell analizleri, hücre göçü çalışmalarının hızla artmasının yolunu açan en popüler migrasyon testi olmuştur (Şekil 64).



Şekil 64. Hücre migrasyon testlerinin illüstrasyonu (Rumianek, and Greaves, 2020).

bölmeden ayıran bir membran ve kemoatraktan çözeltisi ile doldurulmuş bir dış kuyu bulunmaktadır. İki kuyuyu birbirinden ayıran porlu membran hücrelerin tutunmasını sağlayan ve dış kuyuya konveksiyon akımlarıyla geçişlerini engelleyebilecek ama aynı zamanda bir kemoatraktan varlığında membranda bulunan uygun çaplarda porlardan istemli migrasyona izin verecek yapıda olmalıdır.

Tez çalışmasında KBB'nin monosit geçişine etkisi transwell analize gözlemlenmiştir. Nötrofiller ve monositler, yaralanmadan sonra 6-12 saat içinde KBB'den MSS dokusuna sızar. Yaralanmadan 1-2 gün sonra monositlerden farklılaşan proinflamatuvar makrofajlar maksimum seviyelerine ulaşır. Monositlerin MSS'den KBB'ye sızması, doku hasarı ve iltihabının çözülmesinde temel adımı oluşturur (Yao et al., 2014; Troletti et al., 2015; Katsi et al., 2020). Bununla birlikte, kontrolsüz sızıntı olabilir, bu da nöroinflamasyonu artırır ve hastalığın kronikleşmesine neden olur.

Klasik transwell membranlara alternatif olabilecek 2 farklı membran kullanılmıştır. PCL ve BC membranlarda monosit migrasyonuna izin verebilecek por çapları optimize edilmiştir. Por oluşturulan ve oluşturulmayan membranlar olmak üzere bütün membranlarından monosit geçişi test edilmiş ve HBEC-5i hücreleriyle KBB modeli oluşturularak monosit geçişi incelenmiştir. BS ve PCL membran üzerinde statik KBB modeli oluşturulup 5. günde monositler 10^5 hücre/mL olacak şekilde endotel hücrelerin bulunduğu luminal kısımdan kültüre dahil edilmiştir. Abluminal kısımda kemotaksik bir indükleyici olarak apoptosis oluşturulmuştur. Apoptotik

hücrelerin bariyerden monosit geçişini tetiklenmiştir (Rouhiainen et al., 2004; Goetze et al., 2011; Matuszak et al., 2018).

Nöroinflamasyon, nöronlar, mikroglia, astrositler ve perisitler gibi MSS hücreleri ile MSS'de yerleşik immün hücreleri ve sızan periferik immün hücreleri arasındaki etkileşimin sonucu olarak oluşur. Aslında temelde bu mekanizma kan-beyin bariyeri ile ilişkilidir. KBB, MSS'yi dolaşım sisteminden ayıran, seçici yarı geçirgen bir bariyer görevi görür (Carson et al., 2006). KBB nedeniyle, dolaşımdaki lökositler (Monositler, T, B ve NK hücreleri) normalde kan damarlarının içinde kalır ve KBB bir hasar almadığı sürece sağlıklı beyine girmez (Yin et al., 2017). İmmün ayrıcalığa rağmen inflamasyon, hipertansiyon, otoimmünite, kanser gibi sebeplerle KBB'nde fiziksel bir bozulma oluşabiliyor ve bu da dolaşımdaki diğer immün hücrelerin de bölgeye gelmesine ve inflamasyonu arttırmasına sebep olur.

Doğal porsuz BS membrandan ve porlu BS membran üzerine HBEC-5i hücreleriyle oluşturulan KBB'den işaretli monositlerin geçmediği görülmektedir. Apoptotik hücre varlığında ise porlu BS membrandan da KBB oluşturulan porlu BS membrandan da hücre geçişi gözlemlenmiştir. Porlu PCL membran ile HBEC-5i ve HUVEC hücreleri ile oluşturulan KBB modelinde de apoptotik hücre varlığında monosit hücre geçişi gözlemlenirken, normal şartlarda geçiş gözlemlenmemiştir. Görsellerin floresan yoğunluğu ve işaretli monosit sayısı ImageJ programı ile analiz edildiğinde apoptotik indükleyici faktör varlığının monosit geçişini anlamlı derecede arttırdığı görülmektedir. İndükleyici faktör bulunmadığında ise monosit geçişinin gerçekleşmediği görülmektedir. Bu sonuç KBB varlığının monosit migrasyonunu doğrudan etkilediğini göstermektedir.

Farklı endotel hücreleri ile yapılan denemelerde apoptotik hücre varlığında HBEC-5i ile yapılan KBB modelinin monosit migrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde HUVEC'ten çok sınırladığı belirlenmiştir. Bunun sebebi olarak hücre orjini ve bundan kaynaklı sıkı bağlantı, hücre boyutları vb. biyolojik ve morfolojik özelliklerin sebep olduğu düşünülmektedir.

5.5. Bilgisayarlı Akışkanlar Dinamiği ile Fizyolojik Koşullara Uygun Mikroakışkan Platformun Modellenmesi ve Üretimi

5.5.1. Mikroakışkan Platformun Modellenmesi

Mikroakışkan platform luminal ve abluminal olmak üzere iki kanaldan oluşacak ve bu iki kanalı doku iskelesi ile ayırarak şekilde modellenmiştir. Model de doku iskelesinin porozitesi dikkate alınarak fizyolojik değerleri sağlayacak fiziksel ve geometrik parametreler optimize edilmiştir.

5.5.2. Mikroakışkan Platformun Üretimi

Platform 3 boyutlu yazıcıda üretilen kalıplara PDMS dökülerek üretilmiştir. Kalıp üretiminde Formlabs Clear V4 reçine kullanılırken platform içine gömülen arabağlantı elemanları Formlabs Bioclear V” reçine ile üretilmiştir. Bu sayede ara bağlantıların biyouyumlu olarak üretimi sağlanmıştır. 3 boyutlu yazıcı ile üretimin avantajlarından biri ara bağlantılar ile birlikte üretim yapabilmekten bir diğeri ise yüksek hızda prototipleme imkanındır. Bu sayede Comsol Multyphysics uygulaması kullanılarak geliştirilen modeller hızlıca kalıplanarak gerekli değişiklikler yapıp tekrar kalıplar üretilmiştir.

5.6. Dinamik *in vitro* KBB modelinin Geliştirilmesi

Dinamik *in vitro* KBB modeli statik kültüre kıyasla fizyolojik koşulları daha iyi sağlamakla beraber literatürdeki benzerlerinden farklı olarak geliştirilen modelde hali hazırda kullanılan doku iskelelerinin kullanımıyla basal membran dokumühendisliği ürünü olmasına imkan tanınmıştır. Literatürde benzer çok az çalışma bulunum alternatiflerinde sıklıkla PDMS membranlar kullanılmaktadır. Wang et al. *in vitro* dinamik KBB modeli geliştirmiş hücreleri porlu polikarbonat üzerine ekmiştir. Yüksek TEER değerleri elde eden grup modelin permeabilite analizlerinde kullanılabilir bir alternatif olduğunu önermektedir.

Elektro eğrilmiş PCL membranlar statik kültürde olumlu sonuçlar vermiştir. Ancak dinamik kültür için aynı durum söz konusu değildir. Öncelikle mikroakışkan platforma entegre etme işleminde PDMS’in kürleyicisi içinde çözünerek

parçalanmıştır. Yapıştırma tekniği değiştirilerek yarı kürlenmiş PDMS'ler üzerine entegre edilebilmiş olsa da yapılan akış denemelerinde tekrar parçalanmış; bu sebeple çalışmanın devamında kullanılamamıştır.

5.7. *In silico* KBB modelinin Geliştirilmesi

Geliştirilen *in silico* modelin doğruluk değeri maksimum %97.1'e ulaşmaktadır. Bu değer oldukça yüksek bir değer olu verilerin arttırılması ve bu modelin moleküler dinamik ya da statik *in vitro* modeller ile paralel olarak kullanılması durumunda *in vivo* deneylere iyi bir alternatif olacağı önerilmiştir. Wang et al. 2018 yılında yaptıkları çalışmada %96.6 doğruluk ile permeabilite değerlerini tahminlemektedir. Aynı veri setinin eğitilmiş modelde sınanması ile %89.9'luk doğruluk oranları görülmüştür. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda küçük moleküller için %90 ve üzerinde permeabilite tahminlemesi gerçekleştirilirken bu oranın KBB+, KBB- ve Tanımsız grubu içeren modellerde yükseldiği gösterilmiştir. Bu sebeple daha büyük veri setleri ile Tanımsız grubunda içeren eğitimlerin yapılması ve bu gruba ait test sonuçlarının *in vitro* testler ile desteklenmesi önerilmektedir. *In vitro* testler ile karşılaştırıldığında hücre göçü gibi ya da büyük moleküllerin taşınımı gibi durumlarda *in silico* testlerin henüz *in vitro* testlerin yerini alamayacağı ancak küçük moleküller konusunda hızlı ve ucuz bir alternatif olduğu gösterilmiştir. Tanımsız grubunun eklenmesi ile doğruluk oranları arttırılarak *in vitro* testlere paralel yüksek doğruluklu KBB permeabilite protokolü geliştirilmiştir. Daina et al. 2017 yılında yaptıkları çalışmada 260 KBB geçirgen ve geçirgen olmayan molekülden oluşan bir eğitim seti ile eğitilerek %88 doğrulukla çalışan bir web uygulaması geliştirmiştir. Bu çalışmada Daina et al. verilerinde kullanımıyla yapılan eğitimlerde %86,67 e varn doğruluk elde edilmiştir. Ayrıca farklı veri gruplarıyla yapılan eğitimlerde %97,1'e kadar ulaşılmaktadır. Bu da geliştirilen modelin literatürdeki alternatiflerine paralel olarak yüksek doğrulukla çalıştığını göstermektedir. Literatürde birden çok tahminleme algoritmasının ortak kararlarından ya da bu algoritmaların birlikte kullanımından da faydalanılmaktadır(Wang et al., 2018). Bu çalışmada buna alternatif olarak nihai sonuca *in vitro* ve *in silico* sonuçların ortak kullanımı ile ulaşılması önerilmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek lisans tezi kapsamında yapılan çalışmada, *in vitro* ve *in silico* KBB permeabilite tahminleme modelleri geliştirilmiştir. Modeller birbirleri ile permeabilite tahminleme üzerinden kıyaslanarak benzerlikleri ve farklılıkları, avantaj ve dezavantajları ortaya konmuştur. *In silico* modeller büyük moleküllerin hatta ekstraselüler vesikül, monosit vb. hücresel yapıların geçişinde kullanılamamaktadır. Küçük moleküller için ise *in silico* modeller ile çok düşük maliyetlerle ve yüksek doğrulukla sanjeler içinde sonuçlar elde edilebilmektedir. Geliştirilen modelde küçük moleküllerde de hata payını en aza indirmek için verilerin bir kısmı “Tanımsız” olarak eğitilmiş bu sayede hata payı en aza indirilmiştir. *in silico* modellerde kullanılmayan ya da tanımsız olarak işaretlenen moleküllerin bu sonuca paralel olarak *in vitro* modeller ile desteklenerek daha geniş ve daha doğru molekül permeabilite tayini yapılabilecektir.

Çalışmaların devamında moleküler dinamik simülasyonları aracılığı ile hücre zarının ve transmembran proteinlerinin modellenmesi ve makine öğrenmesine dayalı modellerle birlikte kullanılması önerilmektedir. *In vitro* modeller için ise endotel hücreleri ile birlikte astrosit ve perisit hücrelerinin kokültürü önerilmektedir. Ayrıca iPSC hücrelerinin kullanımıyla yüksek sıkı bağlantılı KBB modellerinin geliştirilebilir. Hücre göçünü modellemek için kullanılan porlu membranların moleküler testlerde porsuz formda kullanımının daha uygun olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbott, N. J., 2013.,** Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of inherited metabolic disease*, 36(3), 437-449.
- Aday, S., Cecchelli, R., Hallier-Vanuxeem, D. T. D. I. F., Dehouck, M. P., & Ferreira, L., 2016,** Stem cell-based human blood–brain barrier models for drug discovery and delivery. *Trends in Biotechnology*, 34(5), 382-393.
- Adriani, G., Ma, D., Pavesi, A., Kamm, R. D., & Goh, E. L., 2017,** A 3D neurovascular microfluidic model consisting of neurons, astrocytes and cerebral endothelial cells as a blood–brain barrier. *Lab on a Chip*, 17(3), 448-459
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002,** The extracellular matrix of animals. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.
- Appelt-Menzel, A., Oerter, S., Mathew, S., Haferkamp, U., Hartmann, C., Jung, M., ... & Pless, O., 2020,** Human iPSC-Derived Blood-Brain Barrier Models: Valuable Tools for Preclinical Drug Discovery and Development?. *Current protocols in stem cell biology*, 55(1), e122.
- Avdeef, A., 2011.,** How well can in vitro brain microcapillary endothelial cell models predict rodent in vivo blood–brain barrier permeability? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(3), 109-124.
- Avril, M., 2015,** Inhibition of infected red blood cell binding to the vascular endothelium. In *Malaria Vaccines* (pp. 215-229). Humana Press, New York, NY.
- Aykar, S. S., Alimoradi, N., Petersen, I. S., Montazami, R., Brockman, A. L., & Hashemi, N. N., 2023,** Human Brain Endothelial Cell Seeded on Inner Surface of Alginate Hollow Microfibers. *bioRxiv*, 2023-01.
- Bang, S., S. Jeong, N. Choi, and H. N. Kim., 2019,** Brain-on-a-chip: A history of development and future perspective." *Biomicrofluidics* 13 (5):051301

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bayir, E., Celtikoglu, M. M., & Sendemir, A., 2019,** The use of bacterial cellulose as a basement membrane improves the plausibility of the static in vitro blood-brain barrier model. *International journal of biological macromolecules*, 126, 1002-1013.
- Bentivoglio, M., & Kristensson, K., 2014,** Tryps and trips: cell trafficking across the 100-year-old blood–brain barrier. *Trends in neurosciences*, 37(6), 325-333.
- Bhatia, S. N., & Ingber, D. E., 2014,** Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology*, 32(8), 760
- Bonakdar, M., Graybill, P. M., & Davalos, R. V., 2017,** A microfluidic model of the blood–brain barrier to study permeabilization by pulsed electric fields. *RSC advances*, 7(68), 42811-42818.
- Booth, R. and Kim, H., 2012.,** Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ KBB)”, *Lab on a chip*, 12 (10), 1784-92p.
- Boyden, S., 1962,** The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of experimental medicine*, 115(3), 453-466.
- Breiman, L., 2001,** Random forests. *Machine learning*, 45(1), 5-32, doi:10.1023/A:1010933404324.
- Burns, M.A., Johnson, B.N., Brahmamandra, S.N., Handique, K., Webster, J.R., Krishnan, M., Sammarco, T.S., Man, P.M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C.H. ve Burke, D.T., 1998.,** "An integrated nanoliter DNA analysis device", *Science*, 282, 484-7.
- Bosshart, H., & Heinzelmann, M., 2016,** THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of translational medicine*, 4(21).
- Cabrera-Pérez, M. Á., Nam, N. H., Castillo-Garit, J. A., Rasulev, B., Le-Thi-Thu, H., & Casañola-Martin, G. M., 2018,** In silico assessment of ADME properties: advances in Caco-2 cell monolayer permeability modeling. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(26), 2209-2229.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Campisi, M., Shin, Y., Osaki, T., Hajal, C., Chiono, V., & Kamm, R. D., 2018,** 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials*, 180, 117-129.
- Canbay, P.** Sağlıkta Yapay Zeka: Makine Öğrenmesi Yöntemleri Ve Uygulamaları.
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J., 2014,** THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology*, 23(1), 37-45.
- Chin, E., & Goh, E., 2018,** Blood-brain barrier on a chip. *Methods in cell biology*, 146, 159-182.
- Chiu, D. T., Jeon, N. L., Huang, S., Kane, R. S., Wargo, C. J., Choi, I. S., ... & Whitesides, G. M., 2000,** Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2408-2413.
- Cortes, C., & Vapnik, V., 1995,** Support-vector networks. *Machine learning*, 20(3), 2
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H., 2010,** The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS one*, 5(1), e8668.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. 2017,** SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7(1), 42717.
- Delsing, L., Herland, A., Falk, A., Hicks, R., Synnergren, J., & Zetterberg, H., 2020,** Models of the blood-brain barrier using iPSC-derived cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 107, 103533.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Estella, F., Delgado-Marquez, B. L., Rojas, P., Valenzuela, O., San Roman, B., & Rojas, I., 2012,** Advanced system for automously classify brain MRI in neurodegenerative disease. In 2012 International Conference on Multimedia Computing and Systems (pp. 250-255). IEEE.
- Gokaltun, A., Yarmush, M. L., Asatekin, A., & Usta, O. B., 2017,** Recent advances in nonbiofouling PDMS surface modification strategies applicable to microfluidic technology. *Technology*, 5(01), 1-12.
- Gorgieva, S., & Trček, J., 2019,** Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials*, 9(10), 1352.
- Gorgieva, S., 2020,** Bacterial cellulose as a versatile platform for research and development of biomedical materials. *Processes*, 8(5), 624.
- Griscom, L., Degenaar, P., LePioufle, B., Tamiya, E., & Fujita, H., 2002,** Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 83(1-3), 15-21.
- Gültürk S., İmir G., Tuncer E., 2007,** Kan beyin bariyeri.Erciyes Tip Dergisi (Erciyes Medical Journal) 29.2 (2007): 147-154.
- Hamill, K. J., Kligys, K., Hopkinson, S. B., & Jones, J. C., 2009,** Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *Journal of cell science*, 122(24), 4409-4417.
- Hatherell, K., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B., & Pilkington, G. J., 2011,** Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood–brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *Journal of neuroscience methods*, 199(2), 223-229.
- Heo YS, Cabrera LM, Song JW, Futai N, Tung YC, Smith GD, Takayama S., 2007,** Characterization and resolution of evaporation-mediated osmolality shifts that constrain microfluidic cell culture in poly(dimethylsiloxane) devices, *Anal Chem*,79(3):1126-34.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jain, P., Nishiguchi, A., Linz, G., Wessling, M., Ludwig, A., Rossaint, R., ... & Singh, S., 2021**, Reconstruction of Ultra-thin Alveolar-capillary Basement Membrane Mimics. *Advanced Biology*, 5(8), 2000427.
- Jain, P., Rauer, S. B., Möller, M., & Singh, S., 2022**, Mimicking the Natural Basement Membrane for Advanced Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 23(8), 3081-3103.
- Jiang, L., Li, S., Zheng, J., Li, Y., Huang, H., 2019**, Recent progress in microfluidic models of the blood-brain barrier, *Micromachines*, 10(6), 375.
- Johnson, K. W., Torres Soto, J., Glicksberg, B. S., Shameer, K., Miotto, R., Ali, M., ... & Dudley, J. T., 2018**, Artificial intelligence in cardiology. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(23), 2668-2679.
- Gomes, M. J., Mendes, B., Martins, S., & Sarmiento, B., 2016**, Cell-based in vitro models for studying blood–brain barrier (BBB) permeability. In *Concepts and models for drug permeability studies* (pp. 169-188). Woodhead Publishing.
- Kadyrova, A., Kanabekova, P., Martin, A., Begimbetova, D., & Kulsharova, G., 2022**, Evaluation of membranes for mimicry of an alveolar-capillary barrier in microfluidic lung-on-a-chip devices. *Materials Today: Proceedings*.
- Kalebic, N., & Huttner, W. B., 2020**, Basal progenitor morphology and neocortex evolution. *Trends in neurosciences*, 43(11), 843-853.
- Karal, E., & Turan, M., 2021**, Hekime Tanı Koymada Yardımcı, Yapay Zekâ Destekli Hastalık Tespit Uzmanı. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (26), 100-116.
- Kim, D., Eom, S., Park, S. M., Hong, H., & Kim, D. S., 2019**, A collagen gel-coated, aligned nanofiber membrane for enhanced endothelial barrier function. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Kim, J., Lee, J., & Lee, Y., 2015**, Data-mining-based coronary heart disease risk prediction model using fuzzy logic and decision tree. *Healthcare informatics research*, 21(3), 167-174.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kim, K. A., Kim, D., Kim, J. H., Shin, Y. J., Kim, E. S., Akram, M., ... & Bae, O. N., 2020**, Autophagy-mediated occludin degradation contributes to blood–brain barrier disruption during ischemia in bEnd. 3 brain endothelial cells and rat ischemic stroke models. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 1-12.
- Kim, K. S., Jeon, M. T., Kim, E. S., Lee, C. H., & Kim, D. G., 2022**, Activation of NMDA receptors in brain endothelial cells increases transcellular permeability. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1), 1-21.
- Kruegel, J., & Miosge, N., 2010**, Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(17), 2879-2895.
- Kuruca, S. E., Karadenizli, S., Akgun-Dar, K., Kapucu, A., Kaptan, Z., & Uzum, G., 2017**, The effects of 17 β -estradiol on blood brain barrier integrity in the absence of the estrogen receptor alpha; an in-vitro model. *Acta Histochemica*, 119(6), 638-647.
- Lee, D. H., Park, J. Y., Lee, E.-J., Choi, Y. Y., Kwon, G. H., Kim, B.-M., Lee, S.-H., 2010**, Fabrication of three-dimensional microarray structures by controlling the thickness and elasticity of poly(dimethylsiloxane) membrane , *Biomedical Microdevices*, 12(1), 49–54
- Lochhead, J. J., Yang, J., Ronaldson, P. T., & Davis, T. P., 2020**, Structure, function, and regulation of the blood-brain barrier tight junction in central nervous system disorders. *Frontiers in physiology*, 11, 914.
- Mantecón-Oria, M., Diban, N., Berciano, M. T., Rivero, M. J., David, O., Lafarga, M., ... & Urtiaga, A., 2020**, Hollow Fiber Membranes of PCL and PCL/Graphene as Scaffolds with Potential to Develop In Vitro Blood—Brain Barrier Models. *Membranes*, 10(8), 161.
- Mir, M., Palma-Florez, S., Lagunas, A., López-Martínez, M. J., & Samitier, J., 2022**, Biosensors Integration in Blood–Brain Barrier-on-a-Chip: Emerging Platform for Monitoring Neurodegenerative Diseases. *ACS sensors*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Musafargani, S., Mishra, S., Gulyás, M., Mahalakshmi, P., Archunan, G., Padmanabhan, P., & Gulyás, B., 2020**, Blood brain barrier: A tissue engineered microfluidic chip. *Journal of neuroscience methods*, 331, 108525.
- Morçimen Z.G., 2020**, Nöronlarla makrofajların in vitro etkileşiminin incelenmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi
- Neuhaus, W., Lauer, R., Oelzant, S., Fringeli, U. P., Ecker, G. F., & Noe, C. R., 2006**, A novel flow based hollow-fiber blood–brain barrier in vitro model with immortalised cell line PBMEC/C1–2. *Journal of biotechnology*, 125(1), 127-141.
- Oddo, A., Peng, B., Tong, Z., Wei, Y., Tong, W. Y., Thissen, H., & Voelcker, N. H., 2019.**, Advances in microfluidic blood–brain barrier (KBB) models, *Trends in biotechnology*, 37(12), 1295-1314.
- Osmanagic-Myers, S., Rus, S., Wolfram, M., Brunner, D., Goldmann, W. H., Bonakdar, N., ... & Wiche, G., 2015** Plectin reinforces vascular integrity by mediating crosstalk between the vimentin and the actin networks. *Journal of cell science*, 128(22), 4138-4150.
- Ostrovidov, S., Jiang, J., Sakai, Y., & Fujii, T., 2004**, Membrane-based PDMS microbio reactor for perfused 3D primary rat hepatocyte cultures. *Biomedical microdevices*, 6(4), 279-287.
- Palma-Florez, S., López-Canosa, A., Moralez-Zavala, F., Castaño, O., Kogan, M. J., Samitier, J., ... & Mir, M., 2022**, KBB-on-a-chip with Integrated micro-TEER for permeability evaluation of multi-functionalized gold nanorods against Alzheimer’s disease.
- Park, Y. S., & Lek, S., 2016**, Artificial neural networks: Multilayer perceptron for ecological modeling. In *Developments in environmental modelling* (Vol. 28, pp. 123-140). Elsevier.
- Patel, H. H., & Prajapati, P., 2018**, Study and analysis of decision tree based classification algorithms. *International Journal of Computer Sciences and Engineering*, 6(10), 74-78.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Phan, D. T., Bender, R. H. F., Andrejcsk, J. W., Sobrino, A., Hachey, S. J., George, S. C., & Hughes, C. C., 2017,** Blood–brain barrier-on-a-chip: Microphysiological systems that capture the complexity of the blood–central nervous system interface. *Experimental Biology and Medicine*, 242(17), 1669-1678.
- Puech, C., Hodin, S., Forest, V., He, Z., Mismetti, P., Delavenne, X., & Perek, N., 2018,** Assessment of HBEC-5i endothelial cell line cultivated in astrocyte conditioned medium as a human blood-brain barrier model for ABC drug transport studies. *International journal of pharmaceutics*, 551(1-2), 281-289.
- Rosenberg, G. A., 2012,** Neurological diseases in relation to the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1139-1151.
- Rumianek, A. N., & Greaves, D. R., 2020,** How have leukocyte in vitro chemotaxis assays shaped our ideas about macrophage migration?. *Biology*, 9(12), 439.
- Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ., 2014.,** The present and future role of microfluidics in biomedical research, *Nature*, 507(7491):181-9.
- Sell, S. A., Wolfe, P. S., Garg, K., McCool, J. M., Rodriguez, I. A., & Bowlin, G. L., 2010,** The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers*, 2(4), 522-553.
- Singh, A. V., Chandrasekar, V., Laux, P., Luch, A., Dakua, S. P., Zamboni, P., ... & Gemmati, D., 2022,** Micropatterned Neurovascular Interface to Mimic the Blood–Brain Barrier’s Neurophysiology and Micromechanical Function: A BBB-on-CHIP Model. *Cells*, 11(18), 2801.
- Sharma, B., Luhach, K., & Kulkarni, G. T., 2019,** In vitro and in vivo models of KBB to evaluate brain targeting drug delivery. In *Brain targeted drug delivery system* (pp. 53-101). Academic Press.
- Sruthi ,R. 2021,** Understanding Random Forest, *Analytics Vidhya*

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Teppola, H., Sarkanen, J. R., Jalonen, T. O., & Linne, M. L., 2016,** Morphological differentiation towards neuronal phenotype of SH-SY5Y neuroblastoma cells by estradiol, retinoic acid and cholesterol. *Neurochemical research*, 41(4), 731-747.
- Toepke MW, Beebe DJ., 2006,** PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications, *Lab Chip*, 6(12):1484-6.
- Tsopelas, F., Tsagkrasouli, M., Poursanidis, P., Pitsaki, M., Vasios, G., Danias, P., ... & Giaginis, C., 2018,** Retention behavior of flavonoids on immobilized artificial membrane chromatography and correlation with cell-based permeability. *Biomedical Chromatography*, 32(3), e4108.
- Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J., & Terasaki, T., 2011,** Quantitative targeted absolute proteomics of human blood–brain barrier transporters and receptors. *Journal of neurochemistry*, 117(2), 333-345.
- Wang, S. D., Ma, Q., Wang, K., Chen, H. W., 2018,** Improving antibacterial activity and biocompatibility of bioinspired electrospinning silk fibroin nanofibers modified by graphene oxide, *ACS omega*, 3(1), 406-413.
- Wang, Y. I., Abaci, H. E., & Shuler, M. L., 2017,** Microfluidic blood–brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnology and bioengineering*, 114(1), 184-194.
- Wang, Z., Yang, H., Wu, Z., Wang, T., Li, W., Tang, Y., & Liu, G., 2018,** In silico prediction of blood–brain barrier permeability of compounds by machine learning and resampling methods. *ChemMedChem*, 13(20), 2189-2201.
- Weng, S. F., Reps, J., Kai, J., Garibaldi, J. M., & Qureshi, N., 2017,** Can machine-learning improve cardiovascular risk prediction using routine clinical data?. *PloS one*, 12(4), e0174944.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Wolff, A., Antfolk, M., Brodin, B., & Tenje, M., 2015**, In vitro blood–brain barrier models—an overview of established models and new microfluidic approaches. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(9), 2727-2746.
- Xu, H., Li, Z., Yu, Y., Sizdahkhani, S., Ho, W. S., Yin, F., ... & Qin, J., 2016**, A dynamic in vivo-like organotypic blood-brain barrier model to probe metastatic brain tumors. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Yılmaz, N., 2006**, Kan-beyin bariyerinin Fizyopatolojisi. *Van Tıp Dergisi*, 13(1), 25-27.
- Yin, N., Stilwell, M. D., Santos, T. M., Wang, H., & Weibel, D. B., 2015**, Agarose particle-templated porous bacterial cellulose and its application in cartilage growth in vitro. *Acta biomaterialia*, 12, 129-138.
- Zamprogno, P., Wüthrich, S., Achenbach, S., Thoma, G., Stucki, J. D., Hobi, N., Guenat, O. T. Ostuni, E., Kane, R., Chen, C. S., Ingber, D. E., & Whitesides, G. M., 2000**, Patterning mammalian cells using elastomeric membranes. *Langmuir*, 16(20), 7811-7819.
- Zhang, Y., Lane, M. E., Hadgraft, J., Heinrich, M., Chen, T., Lian, G., & Sinko, B., 2019**, A comparison of the in vitro permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model. *International Journal of Pharmaceutics*, 556, 142-149.
- Zhong, C., 2020**, Industrial-scale production and applications of bacterial cellulose. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 605374.

TEŞEKKÜR

Tüm lisans ve lisansüstü çalışmalarımda beni en iyi şekilde yönlendiren, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak eğitimime büyük katkı sağlayan, hayatımın her alanında verdiği büyük destekle beni evimde hissettiren ve kariyerimi planlarken her aşamada arkamda duran tez çalışmalarımaya sürdürmemi sağlayan ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım, çok değerli hocam, Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR'e,

“Hipertansiyonun Çip-Üstü Kan Beyin Bariyerinde Modellenmesi ve Monositlerin Geçişinin Değerlendirilmesi” başlıklı 221M092 numaralı 1001 araştırma projesi kapsamında tezimi destekleyen TÜBİTAK'a

Laboratuvarını büyük bir cömertlikle bizlere açan Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ'e

Bana yol gösteren, motive eden, bir sorunla karşılaştığımda çekinmeden arayabildiğim çok sevdiğim hocam Dr. Ece BAYIR ve dostum Raif İLKTAÇ'a,

Laboratuvarda arkamı toplayan, yardımlarını esirgemeyen başta Bora BOZMAOĞLU, Fatma Nur KUTLU, Pelin İLHAN, Ece BATTALOĞLU olmak üzere tüm EBIOPHASE ailesine,

İsteklerimi her zaman anlayışla karşılayan can dostum Nur Deniz BİNGÜL ve Yunus Emre ÖZ'e

Juri üyelerim Dr. Şeyma Taşdemir ve Doç. Dr. İsmail Hakkı Akgün'e,

Ufkumu açan hocam Prof. Dr. Mustafa Demircioğlu'na

Her daim yanımda olan, bilgi birikimlerinden yararlandığım ve beni tüm süreçlerde destekleyen Zehra Gül MORÇİMEN'e,

Her başım sıkıştığında aradığım ücretsiz psikoloğum abim Hasan GÜLİÇLİ'ye ve kardeşim Yudum GÜLİÇLİ'ye

Hayatımın her döneminde maddi manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olup, her koşulda beni destekleyerek durmadan devam etmemi sağlayan annem Neslihan GÜLİÇLİ ve babam Savaş GÜLİÇLİ'ye,

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim lisansımın beri yılın 3'te birini benimle geçiren anneannem Hikmet BAŞÇI ve büyükbabam Suphi BAŞÇI'ya teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Uyruk: T.C.

Doğum Tarihi:

Telefon:

Email:

Yabancı Dil: İngilizce, Almanca

Eğitim

08/2020 – Devam ediyor Yüksek Lisans

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye
Tez: İlaç Permeabilitesinin *in vitro* ve *in silico* Kan Beyin Bariyeri Modellerinde Karşılaştırılması
Doku Mühendisliği, hastalık modelleme, *in silico* modelleme ve biyomalzemeler

09/2015 - 06/2019 Lisans

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye
Lisans Tezi: Çip Üstü *in vitro* dinamik Kan Beyin Bariyeri Modelinin Geliştirilmesi

09/2011 - 06/2015 Lise

Bülent Ecevit Anadolu Lisesi, Lefkoşa, KKTC

DENEYİM

11/2021- Devam ediyor Araştırmacı- Yüksek Lisans Bursiyeri

Çip Üzerindeki Kan-Beyin Bariyeri ile Hipertansiyonun Modellenmesi ve Monosit Geçişinin Değerlendirilmesi

(TÜBİTAK 1001: 221MS092, Yürütücü Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR)

Ege Biyomalzemeler ve 3B Biyoarafazlar Laboratuvarı, Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi, İzmir

11/2021-8/2022 Yüksek Lisans Bursiyeri

Oral kanser hücrelerinin farklılaşmasında manyetik levitasyon yönteminin *in vitro* ve *ex vivo* etkinliğinin değerlendirilmesi

(TÜBİTAK 1001: 121S903, Yürütücü: Doç. Dr. Betül Karaca) Mikrorobotiks ve Mekatronik Laboratuvarı, Makine Mühendisliği Bölümü, Ege Üniversitesi, İzmir

10/2020 - 06/2021 Yüksek Lisans Bursiyeri

İpekböceği (Bombyx mori) kullanılarak doğal bitkisel bileşiklerin biyoaktif bileşiklere biyotransformasyonu

(TÜBİTAK 1001: 119Z093, Yürütücü Prof. Dr. Oğuz BAYRAKTAR)

Doğal Biyoaktif Bileşikler Laboratuvarı, Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi, İzmir

7/2020 - 10/2020 Yüksek Lisans Bursiyeri

Sarcopoterium spinosum (Abdest Bozan) bitkisinin tavuk embriyo modelinde antidiyabetik etkisinin belirlenmesi

(Ege Üniversitesi Öncelikli Alanlar Bilimsel Araştırma Projeleri, FOA-2020-21822, Yürütücü: Prof. Dr. Oğuz BAYRAKTAR)

Doğal Biyoaktif Bileşikler Laboratuvarı, Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi, İzmir

9/2019- 11/2021 Kurucu Ortak

Spectron Biyoteknolojik Ürünler Limited Şirketi

TUBİTAK 1512 BIGG Desteği

Teknopark, Ege Üniversitesi, İzmir

04/2017 - 05/2021 Lisans-Yüksek Lisans Bursiyeri

Hipertansiyonun Kan Beyin Bariyeri üzerindeki etkilerinin *in vitro* modelde araştırılması

(TÜBİTAK COST: 216M542, Yürütücü Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR)

Ege Biyomalzemeler ve 3B Biyoarafazlar Laboratuvarı, Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi, İzmir

02/2018 - 03/2019 Stajer

Nailtronics Arayüz Teknolojileri, İzmir, Türkiye

Teknopark, Ege Üniversitesi, İzmir

KONGRE VE KONFERANSLAR

- **Barış GÜLİÇLİ**, Fatma Nur Kutlu, Barış Oğuz Gürses, Aylin Şendemir, "In silico Modeling of Shear Stress and Pressure Applied to Cells at Different Nozzle Diameters and Printing Speeds in 3D Bioprinting" Sözlü Sunum, EBAT 03-06

Kasım 2022, Antalya, Türkiye.

- Bariş GÜLİÇLİ, Barış Oğuz GÜRSES, Aylin ŞENDEMİR, “Modeling and Optimization of a Microfluidic KBB Platform to Simulate Hypertensive Physiological Conditions” Poster Sunumu, 24. Blood Brain Barrier Sympposium, 21-23 Eylül 2022, Bari, İtalya
- Zehra Gül Morçimen, Barış Güliçli, Aylin Şendemir, “Investigation of Monocyte Migration Due to Neuroinflammation Through an in vitro KBB Model”, Poster Sunumu, 24. Blood Brain Barrier Sympposium, 21-23 Eylül 2022, Bari, İtalya
- Aylin SENDEMİR, Barış GÜLİÇLİ, Zehra Gül MORÇİMEN, Nur Deniz BİNGÜL, Elif Esin HAMEŞ TUNA, “Pore Optimization in Bacterial Cellulose Membranes with Polycaprolactone Microspheres and Demonstrating the Migration of Monocytes through the Porous Membrane”. Poster Sunumu, 5th International Symposium on Bacterial Cellulose, 22-23 Eylül 2022, Jena, Almanya
- Bariş Güliçli, Ece Bayır, Aylin Şendemir, “Development of an *in vitro* Dynamic Blood Brain Barrier Model on Chip” Poster Sunumu, BIOMED, 17-20 Kasım 2019, İzmir, Türkiye.
- Yüksel Gezgin, Şeref Akay, Bariş Güliçli, Özlem Yeşil-Çelikaş “Hydrogel Based Microplatform for Rapid Detection of Escherichia Coli in Environmental Water Samples”. Poster Sunumu, Basel Life 2018 11-14 Eylül 2018, Basel, İsviçre, **1.’lik Ödülü**
- Barış Güliçli, Bengü Dülgeroğlu, Didem Nur Köseoğlu, Aylin Şendemir, Oğuz Yetkin, “Öğrenci Laboratuvarlarında ve Projelerinde Kullanım İçin Açık Kaynaklı ve Düşük Maliyetli Spektrofotometre”. Sözlü Sunum, 6. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, Nisan 05- 06, 2018, İstanbul, Türkiye.
- Bengü Dülgeroğlu, Didem Nur Köseoğlu, Barış Güliçli, Aylin Şendemir, Oğuz Yetkin, “Otomatik Spektrometre Cihazı ile Sudaki Kirleticilerin Tespiti”, Poster Sunumu, 6. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, Nisan 05- 06, 2018, İstanbul, Türkiye.

ÇALIŞTAY VE EĞİTİMLER

- İnsan Dokularını İnşa Etmek: Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp, Bilimler Köyü, 22-28 Ağustos 2022, İzmir, Türkiye (eğitmen)
- 8. Ege Biennial International Graduate Summer School, Turkish Neuroscience Association (TÜBAS), 27 Haziran-1 Temmuz 2022, İzmir, Türkiye (organizasyon-eğitmen)
- Doku Mühendisliği ve Uygulamaları Kursu, İzmir Türkiye, 29 Şubat 2020 (organizasyon-katılım)
- TURKEY-UK International Workshop No:1: Biobased Approaches on Renewable

Energy Technologies, 6-7 Nisan 2017, İzmir, Türkiye

- Arduino Workshop 3, 9 Mart 2018, İzmir, Türkiye (organizasyon-katılım)
- Arduino Workshop 2, 29 Mayıs 2017, İzmir, Türkiye (organizasyon-katılım)
- Arduino Workshop, 24 Mart 2017, İzmir, Türkiye (organizasyon-katılım)
- İyi Hijyen Uygulamaları, İyi Laboratuvar Uygulamaları ve ISO 22716:2007 Eğitimleri, TSC Yönetim Sistemleri Akademisi, İzmir, Türkiye, 2016

ÖDÜLLER

- TÜBİTAK 2242 Üniversite Öğrencileri Proje Yarışması, Öncelikli Alanlar, 24-27 Haziran 2019, İzmir, Proje: Türkiye Çevresel su örneklerinden E. coli'nin anında tespiti için test kiti, **Bölge Birincilik Ödülü**
- European Best Engineering Competition, Ege Üniversitesi, **Birincilik Ödülü**, İzmir, 03/2019
- TÜBİTAK 2242 Üniversite Öğrencileri Proje Yarışması, Öncelikli Alanlar, İzmir, Türkiye, 10/2018 Proje: Sürüş Güvenliği için Aktif Gölgeleme Cihazı, **İkincilik Ödülü**
- SANOFI "Sen Bul Diyabet Kolaylaşsın" Proje Yarışması, İstanbul, 11/2018, Fiziksel Aktivite Kategorisi, **Birincilik Ödülü**
- Basel LIFE Poster Sunumu **Birincilik Ödülü**, Basel, İsviçre, 11-14 Eylül 2018
- Hack4Wellbeing(H4W), İzmir, Türkiye, 16-17 Aralık 2017
- 2202- Ulusal TÜBİTAK Matematik Olimpiyatları Bölge Şampiyonası, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (2014)
- 2202- Ulusal TÜBİTAK Matematik Olimpiyatları Bölge Şampiyonası, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti (2013)

AKTİVİTELER

- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Topluluğu Kurucu Başkanı (2017-2019)
- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Topluluğu, Kurucu Eş Başkanı (2016-2017)
- Ege Üniversitesi Hackerspace aktif üyelik (2017-2022)
- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Sınıf Temsilcisi (2015-2019)
- Bulent Ecevit Anadolu Lisesi Fen Kulübü Kurucu Başkanı (2013-2015)

EKLER

Tablo 23. Pubchem üzerinden elde edilen PAMPA analizi yapılmış moleküllerin modelde kullanılan fiziksel ve kimyasal özellikler.

| Hidrojen Bağ Alıcısı | Hidrojen Bağ Donörü | XLogP3 | Tam Moleküler Ağırlık | Kutup Yüzey Alanı | KBB Permeabilitesi |
|----------------------|---------------------|--------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 1 | 4,9 | 432,2161 | 76,6 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 4 | 3 | 0,4 | 252,1157 | 114 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 3,7 | 276,1725 | 46,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 2 | 1 | 3,7 | 284,108 | 38,9 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 5 | 2 | 6,8 | 530,2336 | 71,4 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|-----|----------|------|----|
| 5 | 2 | 7,6 | 578,2336 | 71,4 | 1 |
| 6 | 2 | 7,4 | 635,2915 | 74,7 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 5 | 1 | 4,2 | 438,2519 | 60 | 1 |
| 5 | 2 | 3,8 | 424,2362 | 71 | 1 |
| 4 | 3 | 3,4 | 380,21 | 72,8 | 1 |
| 4 | 2 | 3,9 | 394,2256 | 61,8 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 4 | 2 | 1,4 | 244,0306 | 87 | 1 |
| 4 | 1 | 2,3 | 248,0619 | 74,7 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 1 | 3,2 | 260,9918 | 99,7 | 1 |
| 4 | 1 | 2,2 | 288,0569 | 85,6 | 1 |
| 4 | 1 | 2,3 | 248,0619 | 74,7 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 4 | 2 | 4,2 | 349,1954 | 50,9 | 1 |
| 4 | 2 | 3 | 332,2001 | 63,8 | 1 |
| 4 | 1 | 3,9 | 315,2111 | 42,2 | 1 |
| 3 | 2 | 3,3 | 283,2048 | 50,9 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 1 | 6,5 | 489,1619 | 47,8 | 1 |
| 2 | 0 | 3,5 | 276,1029 | 41,6 | 1 |
| 5 | 0 | 2,8 | 316,1059 | 93 | 1 |
| 4 | 0 | 3 | 245,1027 | 28,8 | 1 |
| 5 | 0 | 3,2 | 330,1216 | 93 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 6 | 1 | 7,9 | 562,2832 | 69,7 | 1 |
| 6 | 1 | 9 | 590,3145 | 69,7 | 1 |
| 6 | 1 | 8 | 550,2632 | 60,4 | 1 |
| 6 | 1 | 7,5 | 548,2675 | 69,7 | 1 |
| 6 | 1 | 7,9 | 564,2988 | 69,7 | 0 |
| 5 | 1 | 8,5 | 566,2336 | 60,4 | 0 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 4 | 0 | 4,3 | 379,2147 | 38,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 4 | 0 | 4,3 | 379,2147 | 38,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 5 | 1 | 4,1 | 365,1627 | 59 | 1 |
| 5 | 0 | 4,1 | 365,1627 | 48 | 1 |
| 5 | 0 | 4,4 | 379,1784 | 48 | 1 |
| 4 | 0 | 3,5 | 282,0892 | 44,8 | 1 |
| 5 | 0 | 4,4 | 379,1784 | 48 | 1 |
| 7 | 0 | 4,4 | 439,1995 | 66,5 | 1 |
| 6 | 0 | 4,9 | 464,2311 | 68,3 | 1 |
| 5 | 0 | 5,1 | 413,1394 | 48 | 1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 4 | 2 | 1,5 | 273,1365 | 52,9 | -1 |
| 6 | 0 | 1,4 | 331,142 | 52,7 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 4 | 3 | 0,4 | 252,1157 | 114 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 4 | 1 | 5,1 | 366,1135 | 51,2 | 1 |
| 5 | 0 | 3,8 | 437,1739 | 72,4 | 1 |
| 6 | 0 | 5,9 | 480,2049 | 68,7 | 1 |
| 3 | 2 | 4,6 | 351,1502 | 37 | 1 |
| 5 | 0 | 6,7 | 486,171 | 51,7 | 1 |
| 4 | 0 | 5,5 | 470,1397 | 59,5 | 1 |

| | | | | | |
|----|---|------|----------|------|---|
| 6 | 0 | 4,7 | 494,1842 | 85,8 | 1 |
| 4 | 2 | 2,9 | 318,1844 | 49,8 | 0 |
| 4 | 0 | 6,7 | 456,1605 | 42,4 | 1 |
| 3 | 1 | 6,1 | 455,1764 | 45,2 | 1 |
| 5 | 1 | 3,4 | 333,1477 | 64,1 | 1 |
| 3 | 2 | 4,5 | 365,1295 | 54 | 1 |
| 4 | 0 | 4,3 | 379,2147 | 38,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 4 | 1 | 5,3 | 392,1525 | 65,2 | 1 |
| 3 | 0 | 5,4 | 356,1412 | 35,5 | 1 |
| 2 | 0 | 5,4 | 326,1307 | 26,3 | 1 |
| 2 | 0 | 6,6 | 376,1463 | 26,3 | 1 |
| 4 | 4 | -0,5 | 204,111 | 98,7 | 0 |
| 3 | 2 | 2,3 | 335,1634 | 57,5 | 1 |
| 12 | 0 | 6,2 | 604,3207 | 164 | 0 |
| 4 | 2 | 2,3 | 251,1158 | 67,8 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 0 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 4 | 0 | 2,9 | 272,0849 | 35,5 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 1 | 3,2 | 331,0208 | 38,3 | 1 |
| 3 | 0 | 3,6 | 270,1056 | 26,3 | 1 |
| 4 | 0 | 3,6 | 300,1162 | 35,5 | 1 |
| 4 | 1 | 3,6 | 260,0849 | 46,5 | 1 |
| 4 | 1 | 3,6 | 260,0849 | 46,5 | 1 |
| 3 | 1 | 4,1 | 276,0553 | 46,5 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 4 | 1 | 6 | 399,2077 | 37,4 | 0 |
| 5 | 1 | 5,6 | 432,1717 | 40,6 | -1 |
| 4 | 1 | 6 | 399,2077 | 37,4 | 0 |
| 5 | 1 | 5,6 | 432,1717 | 40,6 | -1 |
| 4 | 1 | 6 | 399,2077 | 37,4 | 1 |
| 5 | 1 | 5,6 | 432,1717 | 40,6 | -1 |
| 4 | 1 | 6 | 399,2077 | 37,4 | 1 |
| 5 | 1 | 5,6 | 432,1717 | 40,6 | -1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 4 | 0 | 4,6 | 393,2304 | 38,8 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 5 | 0 | 3,6 | 394,2256 | 51,7 | 1 |
| 6 | 1 | 4,2 | 446,2206 | 71,9 | 1 |
| 5 | 0 | 3,6 | 394,2256 | 51,7 | 1 |
| 5 | 0 | 4,4 | 397,2053 | 38,8 | 1 |
| 5 | 0 | 4,4 | 397,2053 | 38,8 | 1 |
| 6 | 1 | 4,2 | 446,2206 | 71,9 | 1 |
| 5 | 0 | 4 | 415,1784 | 55,8 | 1 |
| 4 | 0 | 4,2 | 401,1991 | 46,6 | 1 |
| 5 | 1 | 3,6 | 452,1503 | 81,9 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 4 | 1 | 3,2 | 323,1998 | 37,4 | 1 |
| 3 | 1 | 3,6 | 307,2048 | 28,2 | 1 |
| 3 | 2 | 3,9 | 308,1889 | 35,5 | 1 |
| 4 | 2 | 3,9 | 338,1994 | 44,7 | 1 |
| 4 | 2 | 4 | 351,2311 | 38,7 | 1 |
| 4 | 3 | 3,5 | 324,1838 | 55,7 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 2 | 4,4 | 337,1314 | 70 | 1 |
| 5 | 1 | 4,7 | 351,1471 | 59 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 5 | 2 | 4,5 | 440,2675 | 71 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 2 | 2 | 4 | 375,2311 | 48,1 | 1 |
| 2 | 2 | 4,2 | 389,2467 | 48,1 | 1 |
| 3 | 2 | 4,2 | 419,2573 | 57,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4,1 | 389,2467 | 48,1 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 375,2311 | 48,1 | 1 |
| 3 | 2 | 3,9 | 405,2416 | 57,4 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 5 | 1 | 6 | 458,2482 | 42,3 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 5 | 1 | 6 | 458,2482 | 42,3 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 0 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 5 | 2 | 1 | 343,1579 | 103 | 1 |
| 5 | 3 | 0,9 | 343,1579 | 112 | 1 |
| 5 | 3 | 0,1 | 315,1266 | 112 | 0 |
| 5 | 2 | 0,6 | 329,1423 | 103 | 1 |
| 5 | 3 | 0,6 | 329,1423 | 112 | 1 |
| 5 | 2 | 1,4 | 357,1736 | 103 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 4 | 2 | 4,1 | 402,1943 | 61,8 | 1 |
| 4 | 1 | 4,3 | 416,21 | 50,8 | 1 |
| 4 | 3 | 3,7 | 390,1943 | 72,8 | 1 |
| 4 | 2 | 3,6 | 390,1943 | 61,8 | 1 |
| 4 | 3 | 3,9 | 388,1787 | 72,8 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 3 | 3,3 | 376,1787 | 72,8 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 6 | 0 | 4,7 | 458,2239 | 76,5 | 1 |
| 5 | 0 | 4,7 | 428,2134 | 67,3 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 4 | 2 | 7,3 | 494,3309 | 52,6 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 4 | 2 | 2,6 | 273,0714 | 57,8 | 1 |
| 2 | 1 | 3,7 | 319,0279 | 46,9 | 1 |
| 2 | 1 | 3,7 | 319,0279 | 46,9 | 1 |
| 3 | 1 | 3,1 | 303,0575 | 46,9 | 1 |
| 3 | 1 | 3,1 | 303,0575 | 46,9 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 4 | 0 | 6,7 | 538,3195 | 42 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 3 | 1 | 5,2 | 420,2777 | 41,6 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 3 | 0 | 2,9 | 332,1525 | 40,6 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 0 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | 0 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 4 | 1 | 3,4 | 293,1052 | 58,9 | 1 |
| 4 | 1 | 3,7 | 313,0506 | 58,9 | 1 |
| 4 | 1 | 4 | 376,9454 | 58,9 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 0 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 2 | 1 | 2 | 265,1215 | 58,7 | 1 |
| 2 | 1 | 2 | 290,1531 | 54 | 1 |
| 2 | 1 | 2,7 | 271,1685 | 58,7 | 1 |
| 2 | 1 | 3,4 | 277,2154 | 58,7 | 1 |
| 4 | 2 | 3,3 | 394,2005 | 101 | 1 |
| 3 | 0 | 3,2 | 374,2107 | 41,4 | 1 |
| 3 | 0 | 3,6 | 388,2263 | 41,4 | 1 |
| 2 | 0 | 3,8 | 373,2154 | 28,5 | 1 |
| 2 | 0 | 4,4 | 407,1764 | 28,5 | 1 |
| 2 | 0 | 4,4 | 407,1764 | 28,5 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 0 | 4,4 | 407,1764 | 28,5 | 1 |
| 3 | 0 | 4,4 | 424,2263 | 41,4 | 1 |
| 5 | 1 | 5,6 | 429,0582 | 80,9 | 1 |
| 5 | 1 | 5,4 | 395,0971 | 80,9 | 1 |
| 5 | 1 | 5,8 | 453,0623 | 80,9 | 0 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 0 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | 0 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 2 | 1 | 3,8 | 345,9776 | 64,4 | 1 |
| 2 | 1 | 3,4 | 270,0285 | 79,4 | 1 |
| 7 | 1 | 5,2 | 721,3639 | 103 | 1 |
| 6 | 1 | 5,4 | 717,389 | 103 | 1 |
| 6 | 1 | 5,7 | 829,27 | 103 | 0 |
| 6 | 0 | 4,2 | 368,126 | 67,1 | 1 |
| 3 | 0 | 5,3 | 457,3093 | 20,6 | 1 |
| 4 | 2 | 12,2 | 648,3959 | 49,8 | 1 |
| 4 | 2 | 12,8 | 682,3569 | 49,8 | 1 |
| 4 | 2 | 10,5 | 586,4035 | 49,8 | 1 |
| 4 | 2 | 11,6 | 614,4348 | 49,8 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 2 | 11,1 | 620,3646 | 49,8 | 1 |
| 4 | 2 | 12,2 | 648,3959 | 49,8 | 1 |
| 4 | 1 | 4,7 | 336,1362 | 55,8 | 0 |
| 6 | 2 | 3,2 | 368,126 | 93,1 | 0 |
| 4 | 3 | 4 | 308,1049 | 77,8 | 1 |
| 5 | 2 | 5,8 | 428,1624 | 76 | 1 |
| 4 | 2 | 4,7 | 336,1362 | 66,8 | 1 |
| 4 | 1 | 6,2 | 412,1675 | 55,8 | 1 |
| 4 | 1 | 7,7 | 488,1988 | 55,8 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 6 | 1 | 6,8 | 475,2159 | 66,8 | 1 |
| 6 | 1 | 6,1 | 447,1846 | 66,8 | 0 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 9 | 0 | 3,3 | 497,1032 | 89,9 | 1 |
| 7 | 0 | 2,8 | 448,1823 | 78 | 1 |
| 5 | 0 | 3,2 | 423,1495 | 74,8 | 1 |
| 8 | 0 | 3,8 | 444,1209 | 71,2 | 1 |
| 6 | 0 | 2,5 | 455,1315 | 89,9 | 1 |
| 7 | 0 | 3,2 | 418,1617 | 71,2 | 1 |
| 5 | 0 | 2,2 | 399,1695 | 84 | 1 |
| 8 | 0 | 3 | 441,1413 | 84 | 1 |
| 6 | 0 | 2 | 391,1445 | 84 | 1 |
| 6 | 0 | 2,9 | 427,1245 | 74,8 | 1 |
| 5 | 0 | 2,3 | 387,1695 | 84 | 1 |
| 4 | 0 | 2,9 | 372,1586 | 71,2 | 1 |
| 9 | 0 | 2,7 | 445,1162 | 84 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |

| | | | | | |
|----|---|------|----------|------|----|
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 3 | 0 | 2,1 | 308,0829 | 43,1 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 8 | 0 | 1,3 | 454,0505 | 144 | 1 |
| 8 | 2 | 4,6 | 606,1131 | 166 | 1 |
| 6 | 0 | 6,7 | 731,9422 | 126 | 1 |
| 8 | 2 | 4 | 578,0818 | 166 | 1 |
| 8 | 2 | -0,1 | 424,0511 | 178 | 1 |
| 6 | 0 | 2,6 | 461,9514 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 6,1 | 703,9109 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 6,1 | 703,9109 | 126 | 1 |
| 10 | 0 | 4,4 | 636,0621 | 217 | 1 |
| 6 | 0 | 1,3 | 394,0293 | 126 | 1 |
| 10 | 0 | 5 | 664,0934 | 217 | 1 |
| 6 | 0 | 6 | 614,014 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 2 | 422,0606 | 126 | 1 |
| 8 | 2 | 3,3 | 576,1137 | 178 | 1 |
| 6 | 0 | 6,7 | 731,9422 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 2,7 | 551,8483 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 5,4 | 574,1232 | 126 | 1 |
| 8 | 0 | 1,5 | 430,0105 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 5,4 | 574,1232 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 6,5 | 642,0453 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 2,6 | 461,9514 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 0 | 326,0606 | 126 | -1 |
| 8 | 2 | 4,6 | 606,1131 | 166 | 1 |

| | | | | | |
|----|---|------|----------|------|----|
| 6 | 0 | 0,7 | 354,0919 | 126 | 0 |
| 3 | 2 | 3 | 259,1572 | 41,5 | 1 |
| 1 | 1 | 2,5 | 236,095 | 46,3 | 1 |
| 8 | 3 | -0,2 | 283,0739 | 145 | -1 |
| 12 | 5 | -1,8 | 454,1713 | 211 | -1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 7 | 4 | 8,4 | 596,4652 | 116 | -1 |
| 3 | 2 | 3 | 259,1572 | 41,5 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 12 | 5 | -1,8 | 454,1713 | 211 | -1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 6 | 3 | 1,9 | 392,1999 | 94,8 | -1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 7 | 2 | 0,3 | 314,1413 | 112 | -1 |
| 4 | 4 | 2,6 | 363,2522 | 82,6 | -1 |
| 4 | 1 | 2,7 | 308,1049 | 63,6 | 1 |
| 4 | 2 | 2,2 | 284,2001 | 63,8 | -1 |
| 4 | 2 | 4,2 | 349,1954 | 50,9 | -1 |
| 4 | 2 | 3 | 332,2001 | 63,8 | -1 |
| 4 | 1 | 3,9 | 315,2111 | 42,2 | 1 |
| 3 | 2 | 3,3 | 283,2048 | 50,9 | 1 |
| 7 | 2 | 0,3 | 314,1413 | 112 | 0 |
| 4 | 4 | 2,6 | 363,2522 | 82,6 | 1 |
| 4 | 1 | 2,7 | 308,1049 | 63,6 | 1 |
| 4 | 2 | 2,2 | 284,2001 | 63,8 | -1 |
| 4 | 2 | 4,2 | 349,1954 | 50,9 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 2 | 3 | 332,2001 | 63,8 | 1 |
| 4 | 1 | 3,9 | 315,2111 | 42,2 | 1 |
| 3 | 2 | 3,3 | 283,2048 | 50,9 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 0 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 0 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 0 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 0 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 0 |

Tablo 24. Boiledegg uygulamasının geliştirilmesinde kullanılan moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin Pubchem üzerinden çekilen verileri

| Hidrojen Bağ Alıcısı | Hidrojen Bağ Donörü | XLogP3 | Tam Moleküler Ağırlık | Kutup Yüzey Alanı | KBB Permeabilitesi |
|----------------------|---------------------|--------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| 1 | 2 | 2,3 | 208,1034 | 56,2 | 1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 372,1063 | 6,5 | 1 |
| 4 | 1 | 0,9 | 324,0778 | 63,3 | -1 |
| 2 | 0 | 3,8 | 344,075 | 6,5 | 1 |
| 1 | 1 | 1,6 | 88,08882 | 20,2 | 1 |
| 1 | 1 | 2,3 | 133,0891 | 12 | 1 |
| 2 | 0 | 2,1 | 142,0994 | 18,5 | 1 |
| 1 | 0 | 1,4 | 102,1045 | 9,2 | 1 |
| 3 | 2 | 0,5 | 122,0314 | 75,2 | -1 |
| 1 | 0 | 1,6 | 102,1045 | 9,2 | 1 |
| 2 | 2 | 0,6 | 193,1103 | 63,3 | 1 |
| 4 | 1 | 1,6 | 324,0778 | 63,3 | -1 |
| 2 | 1 | 3,5 | 198,0681 | 37,3 | -1 |
| 6 | 3 | 0,9 | 286,1542 | 102 | -1 |
| 1 | 0 | 0,2 | 53,02655 | 23,8 | 1 |
| 5 | 3 | -1,9 | 225,0862 | 115 | -1 |
| 6 | 0 | 2,2 | 416,2536 | 81 | -1 |
| 3 | 3 | 2 | 302,2107 | 57,7 | -1 |
| 5 | 2 | -0,3 | 244,0859 | 78,9 | -1 |
| 3 | 0 | 2,1 | 308,0829 | 43,1 | 1 |
| 3 | 2 | 3,1 | 249,1729 | 41,5 | -1 |
| 3 | 0 | 1 | 231,1372 | 26,8 | 1 |
| 1 | 0 | 5 | 277,183 | 3,2 | 1 |
| 3 | 1 | 2,6 | 313,0982 | 36,9 | 1 |
| 8 | 3 | 2,9 | 505,2247 | 140 | -1 |
| 3 | 1 | 3,4 | 264,1263 | 52 | 1 |
| 4 | 1 | 2,2 | 318,1692 | 86,4 | -1 |
| 3 | 0 | 3,3 | 275,1885 | 21,7 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|-----|----------|------|----|
| 2 | 0 | 3,8 | 285,092 | 12,5 | 1 |
| 5 | 1 | 6 | 458,2482 | 42,3 | -1 |
| 4 | 0 | 4,4 | 389,2016 | 38,9 | 1 |
| 4 | 1 | 3 | 327,1205 | 55,2 | 1 |
| 3 | 0 | 3,7 | 323,1798 | 21,1 | 1 |
| 3 | 1 | 2,5 | 307,1685 | 39,1 | 1 |
| 4 | 1 | 2,2 | 311,1434 | 39,1 | 1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 4 | 1 | 1,8 | 289,1678 | 49,8 | 1 |
| 7 | 0 | 5,7 | 524,1916 | 114 | -1 |
| 5 | 0 | 3,1 | 473,2348 | 80,2 | -1 |
| 2 | 0 | 4,1 | 391,2624 | 28,5 | -1 |
| 3 | 1 | 2,8 | 295,1572 | 32,7 | 1 |
| 1 | 0 | 1,3 | 177,1154 | 28,8 | 1 |
| 4 | 2 | 2,8 | 307,2147 | 50,7 | 1 |
| 2 | 1 | 4,3 | 311,2249 | 23,5 | 1 |
| 7 | 2 | 3 | 380,1341 | 134 | -1 |
| 3 | 2 | 3,9 | 315,2198 | 43,7 | 1 |
| 4 | 0 | 3,1 | 417,0688 | 64,4 | 1 |
| 5 | 0 | 2,4 | 357,0993 | 77 | -1 |
| 6 | 1 | 1 | 373,0942 | 97,3 | -1 |
| 7 | 2 | 0 | 389,0891 | 118 | -1 |
| 1 | 0 | 5,2 | 293,2143 | 3,2 | 1 |
| 2 | 1 | 3,2 | 239,1077 | 29,1 | 1 |
| 3 | 1 | 2,9 | 193,1103 | 52,3 | 1 |
| 5 | 0 | 5 | 409,2188 | 52,1 | 1 |
| 2 | 0 | 1,8 | 116,0837 | 26,3 | 1 |
| 5 | 1 | 1 | 348,111 | 79,7 | -1 |
| 2 | 0 | 2,1 | 75,94414 | 64,2 | 1 |
| 3 | 1 | 1,5 | 213,0072 | 61,8 | 1 |
| 4 | 3 | 1 | 292,1787 | 70,6 | -1 |
| 4 | 3 | 3,6 | 316,1587 | 57,3 | 1 |
| 7 | 3 | 3,6 | 459,2421 | 99,9 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 0 | 2,1 | 300,0666 | 40,6 | 1 |
| 1 | 2 | 1,8 | 189,1266 | 36,4 | -1 |
| 1 | 2 | 2 | 318,9143 | 36,4 | 1 |
| 3 | 2 | 0,9 | 197,0765 | 36,4 | -1 |
| 3 | 1 | 3,1 | 326,1298 | 30,9 | 1 |
| 5 | 0 | 2,3 | 303,1471 | 55,8 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 3 | 0 | 3,1 | 326,1298 | 23,8 | 1 |
| 4 | 2 | 2,5 | 254,0579 | 66,8 | 1 |
| 2 | 1 | 2,5 | 304,145 | 35,4 | 1 |
| 7 | 3 | 2,4 | 456,1944 | 119 | -1 |
| 3 | 1 | 4,7 | 304,0801 | 40,6 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 2 | 0 | 3,4 | 271,1936 | 12,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 4 | 1 | 4,1 | 405,9791 | 85,6 | -1 |
| 5 | 2 | -1,2 | 236,0909 | 88,7 | -1 |
| 3 | 1 | 4,2 | 290,0644 | 54,6 | 1 |
| 2 | 1 | 4,4 | 252,1626 | 29,3 | 1 |
| 2 | 0 | 3,3 | 255,1623 | 12,5 | 1 |
| 1 | 1 | 2,8 | 221,1204 | 12 | 1 |
| 4 | 0 | 4,3 | 379,2147 | 38,8 | 1 |
| 2 | 0 | 4,3 | 279,1623 | 12,5 | 1 |
| 3 | 0 | 2,5 | 270,1732 | 25,4 | 1 |
| 6 | 1 | 7,6 | 524,408 | 74,2 | -1 |
| 6 | 1 | 2,5 | 304,1059 | 101 | -1 |
| 8 | 1 | 3,9 | 343,1031 | 64,6 | -1 |
| 4 | 1 | 3,3 | 293,0819 | 55,4 | 1 |
| 1 | 1 | -0,1 | 46,04186 | 20,2 | 1 |
| 2 | 0 | 0,7 | 88,05243 | 26,3 | 1 |
| 3 | 2 | 2,8 | 287,1521 | 62,3 | -1 |
| 3 | 1 | 6,5 | 454,2984 | 24,5 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 0 | 4 | 336,2202 | 23,6 | 1 |
| 7 | 1 | 0,4 | 306,1041 | 81,6 | -1 |
| 6 | 1 | 0,1 | 219,0655 | 93,1 | -1 |
| 4 | 0 | 1,9 | 126,0292 | 9,2 | 1 |
| 3 | 0 | 0,8 | 106,023 | 9,2 | 1 |
| 4 | 2 | 3,7 | 367,948 | 87,4 | 1 |
| 3 | 2 | -1,1 | 171,1259 | 63,3 | -1 |
| 4 | 1 | 1,8 | 287,1521 | 41,9 | 1 |
| 4 | 1 | 0,8 | 273,1365 | 41,9 | 1 |
| 7 | 0 | 2,3 | 370,198 | 39,7 | 1 |
| 3 | 1 | 2,8 | 312,195 | 50,2 | 1 |
| 4 | 2 | 2,1 | 341,031 | 98,4 | -1 |
| 3 | 2 | 1,8 | 218,0626 | 106 | -1 |
| 4 | 3 | 1,1 | 233,0735 | 132 | -1 |
| 5 | 4 | 1,2 | 314,1062 | 166 | -1 |
| 4 | 3 | 0,9 | 275,0841 | 135 | -1 |
| 6 | 0 | 4,9 | 441,1623 | 89,9 | -1 |
| 5 | 0 | 4 | 350,1201 | 77 | -1 |
| 4 | 1 | 4,3 | 454,2369 | 59,4 | -1 |
| 5 | 1 | 4,3 | 410,1397 | 50,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0,3 | 128,0408 | 67,2 | -1 |
| 3 | 1 | 2 | 204,0721 | 67,2 | -1 |
| 4 | 1 | 3,7 | 374,1761 | 35,9 | 1 |
| 5 | 4 | 1,2 | 314,1062 | 166 | -1 |
| 3 | 2 | 1,2 | 156,047 | 106 | -1 |
| 5 | 2 | 2,6 | 379,2008 | 88,5 | 1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 398,1219 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 1,8 | 116,0837 | 26,3 | 1 |
| 2 | 0 | 2 | 130,0994 | 26,3 | 1 |
| 2 | 0 | 0,9 | 102,0681 | 26,3 | 1 |
| 3 | 2 | 2 | 294,1368 | 52,6 | -1 |
| 9 | 2 | 5,1 | 580,1347 | 115 | 1 |

| | | | | | |
|----|---|------|----------|------|----|
| 2 | 1 | 2,3 | 234,1732 | 32,3 | 1 |
| 3 | 2 | 2,4 | 320,0119 | 61,7 | 1 |
| 2 | 0 | 3,8 | 272,9627 | 30,7 | 1 |
| 3 | 0 | 3,1 | 327,1138 | 28,1 | -1 |
| 6 | 2 | 1,5 | 413,1885 | 108 | -1 |
| 5 | 2 | 3,6 | 326,1379 | 90 | -1 |
| 5 | 2 | 3,4 | 448,1933 | 95,2 | -1 |
| 6 | 3 | 1,1 | 413,1885 | 131 | -1 |
| 6 | 6 | -3,1 | 182,079 | 121 | 1 |
| 1 | 1 | 4,6 | 277,183 | 12 | 1 |
| 3 | 1 | 7 | 468,3141 | 24,5 | 1 |
| 4 | 0 | 4,6 | 437,2842 | 26,8 | 1 |
| 5 | 2 | 4,4 | 384,1353 | 62,4 | 1 |
| 4 | 1 | 5 | 394,1448 | 41,6 | 1 |
| 6 | 2 | 3,7 | 380,1848 | 71,6 | 1 |
| 6 | 0 | 5,2 | 481,1227 | 82,6 | -1 |
| 4 | 2 | 0,7 | 218,1267 | 105 | 1 |
| 4 | 0 | 3,3 | 285,1841 | 28,6 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 309,2093 | 20,3 | 1 |
| 3 | 0 | 2,2 | 163,9607 | 9,2 | -1 |
| 2 | 0 | 0,2 | 74,03678 | 26,3 | -1 |
| 2 | 2 | 0,2 | 90,02517 | 75,2 | 1 |
| 1 | 0 | 0,9 | 88,08882 | 9,2 | 1 |
| 6 | 0 | 3,1 | 343,1467 | 80,3 | 1 |
| 3 | 0 | 2,5 | 325,0782 | 30,2 | -1 |
| 7 | 1 | 1,8 | 263,043 | 85,3 | 1 |
| 3 | 0 | 3,3 | 265,1579 | 19,4 | -1 |
| 10 | 0 | 5,4 | 716,266 | 126 | 1 |
| 3 | 1 | 4,1 | 270,1191 | 40,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,9 | 434,2118 | 48,9 | -1 |
| 5 | 1 | 1,4 | 232,0848 | 70,5 | 1 |
| 3 | 1 | 3,3 | 230,0943 | 46,5 | 1 |
| 3 | 1 | 2,4 | 247,1572 | 32,7 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 7 | 3 | 3 | 405,1752 | 71 | -1 |
| 6 | 1 | -0,5 | 238,0338 | 121 | 1 |
| 2 | 1 | 1,9 | 286,0509 | 49,4 | 1 |
| 1 | 1 | 3,2 | 168,0687 | 28,7 | 1 |
| 4 | 1 | 5,4 | 356,1381 | 65,9 | 1 |
| 4 | 1 | 2,9 | 312,1409 | 59,1 | -1 |
| 6 | 1 | 2,2 | 345,1147 | 96,3 | -1 |
| 7 | 1 | 2,2 | 426,2067 | 82,2 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 285,2093 | 23,5 | 1 |
| 2 | 0 | 1,9 | 130,0994 | 26,3 | 1 |
| 2 | 1 | 4,2 | 314,1817 | 44,3 | 1 |
| 5 | 1 | 4,2 | 403,1485 | 55,2 | 1 |
| 5 | 2 | 3,6 | 379,1718 | 74,4 | 1 |
| 5 | 2 | 3,8 | 367,1718 | 74,4 | 1 |
| 5 | 2 | 3,2 | 351,1947 | 59,3 | 1 |
| 4 | 2 | 3,7 | 390,242 | 51,1 | 1 |
| 5 | 2 | 5,1 | 409,2188 | 74,4 | 1 |
| 5 | 2 | 5 | 429,1875 | 74,4 | 1 |
| 5 | 2 | 3,9 | 393,1875 | 74,4 | 1 |
| 3 | 1 | 5,4 | 412,2515 | 24,5 | 1 |
| 3 | 2 | 2,9 | 296,1889 | 33,3 | 1 |
| 3 | 2 | 4 | 338,2358 | 33,3 | -1 |
| 5 | 2 | 2,2 | 374,1664 | 75,8 | -1 |
| 6 | 2 | 2,5 | 429,2086 | 79 | -1 |
| 4 | 2 | 2,3 | 379,226 | 53,6 | -1 |
| 8 | 2 | 3,8 | 500,1916 | 120 | 1 |
| 1 | 0 | 3,6 | 243,1987 | 3,2 | -1 |
| 2 | 0 | 3,2 | 308,1525 | 40,6 | 1 |
| 4 | 1 | 0,7 | 275,1634 | 44,8 | -1 |
| 3 | 0 | 0,7 | 194,1055 | 46,4 | -1 |
| 4 | 3 | 0,8 | 266,163 | 70,6 | -1 |
| 8 | 1 | 2 | 383,1594 | 107 | -1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 360,1937 | 94,8 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 5 | 1 | 3,2 | 285,1035 | 83,1 | 1 |
| 4 | 1 | 1,9 | 236,1525 | 55,6 | 1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 1 | 3,8 | 178,1358 | 20,2 | 1 |
| 1 | 1 | 3,5 | 155,1674 | 12 | 1 |
| 5 | 1 | 2,1 | 383,1667 | 73,6 | 1 |
| 2 | 1 | 3,1 | 257,178 | 23,5 | -1 |
| 7 | 4 | -1,8 | 244,0808 | 144 | -1 |
| 8 | 1 | 3,9 | 366,1191 | 71,8 | 1 |
| 3 | 1 | 2,4 | 179,0946 | 52,3 | 1 |
| 3 | 0 | 2,3 | 250,1681 | 32,8 | -1 |
| 1 | 2 | 1,2 | 195,0563 | 50,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,5 | 259,0688 | 36,4 | -1 |
| 5 | 0 | 1,9 | 319,0991 | 92,7 | 1 |
| 4 | 0 | 2,3 | 314,0613 | 68,8 | 1 |
| 3 | 1 | 2,2 | 275,1521 | 47,6 | 1 |
| 7 | 1 | 4,6 | 415,173 | 77,1 | -1 |
| 4 | 3 | 0,9 | 195,0532 | 86,6 | 1 |
| 4 | 1 | 3,2 | 276,1096 | 54,6 | 1 |
| 1 | 1 | 4,8 | 305,0738 | 12 | -1 |
| 5 | 2 | 0,9 | 204,1123 | 83,7 | -1 |
| 5 | 3 | 0,2 | 272,1195 | 86,8 | -1 |
| 4 | 2 | -0,8 | 224,0797 | 78,9 | -1 |
| 9 | 3 | -0,7 | 398,0685 | 150 | 1 |
| 2 | 1 | 5,9 | 380,1889 | 42 | 1 |
| 2 | 1 | 4,3 | 311,1708 | 37,3 | -1 |
| 4 | 2 | 3,7 | 441,1164 | 79,3 | 1 |
| 1 | 1 | 0,5 | 74,07316 | 20,2 | 1 |
| 3 | 0 | 3 | 359,1419 | 29,5 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 0 | 3,2 | 355,1784 | 40,2 | 1 |
| 2 | 2 | 2,4 | 292,1722 | 76 | 1 |
| 2 | 1 | 2,4 | 312,2089 | 37,3 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 5 | 3 | 0,8 | 313,1193 | 85,6 | -1 |
| 6 | 4 | -0,4 | 312,0939 | 191 | 1 |
| 2 | 1 | 3,5 | 321,1066 | 50,6 | -1 |
| 3 | 2 | 2,3 | 270,1038 | 83,6 | 1 |
| 3 | 2 | 1,9 | 223,1572 | 41,5 | -1 |
| 9 | 1 | -0,8 | 339,0988 | 124 | 1 |
| 3 | 1 | 2,6 | 263,1885 | 32,7 | 1 |
| 2 | 1 | 1,6 | 151,0797 | 26 | 1 |
| 3 | 0 | 2,4 | 342,0439 | 43,1 | 1 |
| 2 | 0 | 5,8 | 294,2096 | 6,5 | -1 |
| 1 | 2 | -1,4 | 60,03236 | 69,1 | 1 |
| 1 | 0 | 1,3 | 70,04186 | 9,2 | -1 |
| 3 | 2 | -1,3 | 211,0957 | 88,2 | -1 |
| 4 | 3 | -2,1 | 241,1063 | 108 | -1 |
| 4 | 3 | 0 | 222,0688 | 134 | 1 |
| 3 | 1 | 4,9 | 376,2515 | 32,3 | -1 |
| 5 | 1 | 5,4 | 381,1875 | 65,6 | 1 |

Tablo 25. Boiledegg çalışması ve Pubchem üzerinden elde edilmiş PAMPA analizi yapılmış moleküllerin KBB+ ve KBB- olarak işaretlenmiş fiziksel ve kimyasal özellikleri

| Hidrojen Bağ Alıcısı | Hidrojen Bağ Donörü | XLogP3 | Tam Moleküler Ağırlık | Kutup Yüzey Alanı | KBB Permeabilitesi |
|----------------------|---------------------|--------|-----------------------|-------------------|--------------------|
| c | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 1 | 4,9 | 432,2161 | 76,6 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 4 | 3 | 0,4 | 252,1157 | 114 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 3,7 | 276,1725 | 46,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 2 | 1 | 3,7 | 284,108 | 38,9 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 5 | 2 | 6,8 | 530,2336 | 71,4 | 1 |
| 5 | 2 | 7,6 | 578,2336 | 71,4 | 1 |
| 6 | 2 | 7,4 | 635,2915 | 74,7 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|-----|----------|------|----|
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 5 | 1 | 4,2 | 438,2519 | 60 | 1 |
| 5 | 2 | 3,8 | 424,2362 | 71 | 1 |
| 4 | 3 | 3,4 | 380,21 | 72,8 | 1 |
| 4 | 2 | 3,9 | 394,2256 | 61,8 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 4 | 2 | 1,4 | 244,0306 | 87 | 1 |
| 4 | 1 | 2,3 | 248,0619 | 74,7 | 1 |
| 4 | 1 | 3,2 | 260,9918 | 99,7 | 1 |
| 4 | 1 | 2,2 | 288,0569 | 85,6 | 1 |
| 4 | 1 | 2,3 | 248,0619 | 74,7 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 4 | 2 | 4,2 | 349,1954 | 50,9 | 1 |
| 4 | 2 | 3 | 332,2001 | 63,8 | 1 |
| 4 | 1 | 3,9 | 315,2111 | 42,2 | 1 |
| 3 | 2 | 3,3 | 283,2048 | 50,9 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 1 | 6,5 | 489,1619 | 47,8 | 1 |
| 2 | 0 | 3,5 | 276,1029 | 41,6 | 1 |
| 5 | 0 | 2,8 | 316,1059 | 93 | 1 |
| 4 | 0 | 3 | 245,1027 | 28,8 | 1 |
| 5 | 0 | 3,2 | 330,1216 | 93 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 6 | 1 | 7,9 | 562,2832 | 69,7 | 1 |
| 6 | 1 | 9 | 590,3145 | 69,7 | 1 |
| 6 | 1 | 8 | 550,2632 | 60,4 | 1 |
| 6 | 1 | 7,5 | 548,2675 | 69,7 | 1 |
| 6 | 1 | 7,9 | 564,2988 | 69,7 | 1 |
| 5 | 1 | 8,5 | 566,2336 | 60,4 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 0 | 4,3 | 379,2147 | 38,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 4 | 0 | 4,3 | 379,2147 | 38,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 5 | 1 | 4,1 | 365,1627 | 59 | 1 |
| 5 | 0 | 4,1 | 365,1627 | 48 | 1 |
| 5 | 0 | 4,4 | 379,1784 | 48 | 1 |
| 4 | 0 | 3,5 | 282,0892 | 44,8 | 1 |
| 5 | 0 | 4,4 | 379,1784 | 48 | 1 |
| 7 | 0 | 4,4 | 439,1995 | 66,5 | 1 |
| 6 | 0 | 4,9 | 464,2311 | 68,3 | 1 |
| 5 | 0 | 5,1 | 413,1394 | 48 | 1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | -1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 2 | 1,5 | 273,1365 | 52,9 | -1 |
| 6 | 0 | 1,4 | 331,142 | 52,7 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 4 | 3 | 0,4 | 252,1157 | 114 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 4 | 1 | 5,1 | 366,1135 | 51,2 | 1 |
| 5 | 0 | 3,8 | 437,1739 | 72,4 | 1 |
| 6 | 0 | 5,9 | 480,2049 | 68,7 | 1 |
| 3 | 2 | 4,6 | 351,1502 | 37 | 1 |
| 5 | 0 | 6,7 | 486,171 | 51,7 | 1 |
| 4 | 0 | 5,5 | 470,1397 | 59,5 | 1 |
| 6 | 0 | 4,7 | 494,1842 | 85,8 | 1 |
| 4 | 2 | 2,9 | 318,1844 | 49,8 | 1 |
| 4 | 0 | 6,7 | 456,1605 | 42,4 | 1 |
| 3 | 1 | 6,1 | 455,1764 | 45,2 | 1 |
| 5 | 1 | 3,4 | 333,1477 | 64,1 | 1 |
| 3 | 2 | 4,5 | 365,1295 | 54 | 1 |
| 4 | 0 | 4,3 | 379,2147 | 38,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 4 | 1 | 5,3 | 392,1525 | 65,2 | 1 |
| 3 | 0 | 5,4 | 356,1412 | 35,5 | 1 |

| | | | | | |
|----|---|------|----------|------|----|
| 2 | 0 | 5,4 | 326,1307 | 26,3 | 1 |
| 2 | 0 | 6,6 | 376,1463 | 26,3 | 1 |
| 4 | 4 | -0,5 | 204,111 | 98,7 | 1 |
| 3 | 2 | 2,3 | 335,1634 | 57,5 | 1 |
| 12 | 0 | 6,2 | 604,3207 | 164 | 1 |
| 4 | 2 | 2,3 | 251,1158 | 67,8 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 4 | 0 | 2,9 | 272,0849 | 35,5 | 1 |
| 2 | 1 | 3,2 | 331,0208 | 38,3 | 1 |
| 3 | 0 | 3,6 | 270,1056 | 26,3 | 1 |
| 4 | 0 | 3,6 | 300,1162 | 35,5 | 1 |
| 4 | 1 | 3,6 | 260,0849 | 46,5 | 1 |
| 4 | 1 | 3,6 | 260,0849 | 46,5 | 1 |
| 3 | 1 | 4,1 | 276,0553 | 46,5 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 4 | 1 | 6 | 399,2077 | 37,4 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|-----|----------|------|----|
| 5 | 1 | 5,6 | 432,1717 | 40,6 | -1 |
| 4 | 1 | 6 | 399,2077 | 37,4 | 1 |
| 5 | 1 | 5,6 | 432,1717 | 40,6 | -1 |
| 4 | 1 | 6 | 399,2077 | 37,4 | 1 |
| 5 | 1 | 5,6 | 432,1717 | 40,6 | -1 |
| 4 | 1 | 6 | 399,2077 | 37,4 | 1 |
| 5 | 1 | 5,6 | 432,1717 | 40,6 | -1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 4 | 0 | 4,6 | 393,2304 | 38,8 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 5 | 0 | 3,6 | 394,2256 | 51,7 | 1 |
| 6 | 1 | 4,2 | 446,2206 | 71,9 | 1 |
| 5 | 0 | 3,6 | 394,2256 | 51,7 | 1 |
| 5 | 0 | 4,4 | 397,2053 | 38,8 | 1 |
| 5 | 0 | 4,4 | 397,2053 | 38,8 | 1 |
| 6 | 1 | 4,2 | 446,2206 | 71,9 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 5 | 0 | 4 | 415,1784 | 55,8 | 1 |
| 4 | 0 | 4,2 | 401,1991 | 46,6 | 1 |
| 5 | 1 | 3,6 | 452,1503 | 81,9 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 4 | 1 | 3,2 | 323,1998 | 37,4 | 1 |
| 3 | 1 | 3,6 | 307,2048 | 28,2 | 1 |
| 3 | 2 | 3,9 | 308,1889 | 35,5 | 1 |
| 4 | 2 | 3,9 | 338,1994 | 44,7 | 1 |
| 4 | 2 | 4 | 351,2311 | 38,7 | 1 |
| 4 | 3 | 3,5 | 324,1838 | 55,7 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 2 | 4,4 | 337,1314 | 70 | 1 |
| 5 | 1 | 4,7 | 351,1471 | 59 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 5 | 2 | 4,5 | 440,2675 | 71 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 2 | 4 | 375,2311 | 48,1 | 1 |
| 2 | 2 | 4,2 | 389,2467 | 48,1 | 1 |
| 3 | 2 | 4,2 | 419,2573 | 57,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4,1 | 389,2467 | 48,1 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 375,2311 | 48,1 | 1 |
| 3 | 2 | 3,9 | 405,2416 | 57,4 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 5 | 1 | 6 | 458,2482 | 42,3 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 5 | 1 | 6 | 458,2482 | 42,3 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 5 | 2 | 1 | 343,1579 | 103 | 1 |
| 5 | 3 | 0,9 | 343,1579 | 112 | 1 |
| 5 | 3 | 0,1 | 315,1266 | 112 | 1 |
| 5 | 2 | 0,6 | 329,1423 | 103 | 1 |
| 5 | 3 | 0,6 | 329,1423 | 112 | 1 |
| 5 | 2 | 1,4 | 357,1736 | 103 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 4 | 2 | 4,1 | 402,1943 | 61,8 | 1 |
| 4 | 1 | 4,3 | 416,21 | 50,8 | 1 |
| 4 | 3 | 3,7 | 390,1943 | 72,8 | 1 |
| 4 | 2 | 3,6 | 390,1943 | 61,8 | 1 |
| 4 | 3 | 3,9 | 388,1787 | 72,8 | 1 |
| 4 | 3 | 3,3 | 376,1787 | 72,8 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 6 | 0 | 4,7 | 458,2239 | 76,5 | 1 |
| 5 | 0 | 4,7 | 428,2134 | 67,3 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 4 | 2 | 7,3 | 494,3309 | 52,6 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 4 | 2 | 2,6 | 273,0714 | 57,8 | 1 |
| 2 | 1 | 3,7 | 319,0279 | 46,9 | 1 |
| 2 | 1 | 3,7 | 319,0279 | 46,9 | 1 |
| 3 | 1 | 3,1 | 303,0575 | 46,9 | 1 |
| 3 | 1 | 3,1 | 303,0575 | 46,9 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 4 | 0 | 6,7 | 538,3195 | 42 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 3 | 1 | 5,2 | 420,2777 | 41,6 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 3 | 0 | 2,9 | 332,1525 | 40,6 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 4 | 1 | 3,4 | 293,1052 | 58,9 | 1 |
| 4 | 1 | 3,7 | 313,0506 | 58,9 | 1 |
| 4 | 1 | 4 | 376,9454 | 58,9 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 2 | 1 | 2 | 265,1215 | 58,7 | 1 |
| 2 | 1 | 2 | 290,1531 | 54 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 1 | 2,7 | 271,1685 | 58,7 | 1 |
| 2 | 1 | 3,4 | 277,2154 | 58,7 | 1 |
| 4 | 2 | 3,3 | 394,2005 | 101 | 1 |
| 3 | 0 | 3,2 | 374,2107 | 41,4 | 1 |
| 3 | 0 | 3,6 | 388,2263 | 41,4 | 1 |
| 2 | 0 | 3,8 | 373,2154 | 28,5 | 1 |
| 2 | 0 | 4,4 | 407,1764 | 28,5 | 1 |
| 2 | 0 | 4,4 | 407,1764 | 28,5 | 1 |
| 2 | 0 | 4,4 | 407,1764 | 28,5 | 1 |
| 3 | 0 | 4,4 | 424,2263 | 41,4 | 1 |
| 5 | 1 | 5,6 | 429,0582 | 80,9 | 1 |
| 5 | 1 | 5,4 | 395,0971 | 80,9 | 1 |
| 5 | 1 | 5,8 | 453,0623 | 80,9 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 2 | 1 | 3,8 | 345,9776 | 64,4 | 1 |
| 2 | 1 | 3,4 | 270,0285 | 79,4 | 1 |
| 7 | 1 | 5,2 | 721,3639 | 103 | 1 |
| 6 | 1 | 5,4 | 717,389 | 103 | 1 |
| 6 | 1 | 5,7 | 829,27 | 103 | 1 |
| 6 | 0 | 4,2 | 368,126 | 67,1 | 1 |
| 3 | 0 | 5,3 | 457,3093 | 20,6 | 1 |
| 4 | 2 | 12,2 | 648,3959 | 49,8 | 1 |
| 4 | 2 | 12,8 | 682,3569 | 49,8 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 2 | 10,5 | 586,4035 | 49,8 | 1 |
| 4 | 2 | 11,6 | 614,4348 | 49,8 | 1 |
| 4 | 2 | 11,1 | 620,3646 | 49,8 | 1 |
| 4 | 2 | 12,2 | 648,3959 | 49,8 | 1 |
| 4 | 1 | 4,7 | 336,1362 | 55,8 | 1 |
| 6 | 2 | 3,2 | 368,126 | 93,1 | 1 |
| 4 | 3 | 4 | 308,1049 | 77,8 | 1 |
| 5 | 2 | 5,8 | 428,1624 | 76 | 1 |
| 4 | 2 | 4,7 | 336,1362 | 66,8 | 1 |
| 4 | 1 | 6,2 | 412,1675 | 55,8 | 1 |
| 4 | 1 | 7,7 | 488,1988 | 55,8 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | -1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 6 | 1 | 6,8 | 475,2159 | 66,8 | 1 |
| 6 | 1 | 6,1 | 447,1846 | 66,8 | 1 |
| 7 | 2 | -1 | 319,1332 | 72,9 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 9 | 0 | 3,3 | 497,1032 | 89,9 | 1 |
| 7 | 0 | 2,8 | 448,1823 | 78 | 1 |
| 5 | 0 | 3,2 | 423,1495 | 74,8 | 1 |
| 8 | 0 | 3,8 | 444,1209 | 71,2 | 1 |
| 6 | 0 | 2,5 | 455,1315 | 89,9 | 1 |
| 7 | 0 | 3,2 | 418,1617 | 71,2 | 1 |
| 5 | 0 | 2,2 | 399,1695 | 84 | 1 |
| 8 | 0 | 3 | 441,1413 | 84 | 1 |
| 6 | 0 | 2 | 391,1445 | 84 | 1 |
| 6 | 0 | 2,9 | 427,1245 | 74,8 | 1 |
| 5 | 0 | 2,3 | 387,1695 | 84 | 1 |
| 4 | 0 | 2,9 | 372,1586 | 71,2 | 1 |
| 9 | 0 | 2,7 | 445,1162 | 84 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 3 | -1 | 153,079 | 66,5 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | -1 |
| 3 | 2 | 2,2 | 286,0509 | 61,7 | 1 |
| 3 | 0 | 2,1 | 308,0829 | 43,1 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 8 | 0 | 1,3 | 454,0505 | 144 | 1 |
| 8 | 2 | 4,6 | 606,1131 | 166 | 1 |
| 6 | 0 | 6,7 | 731,9422 | 126 | 1 |
| 8 | 2 | 4 | 578,0818 | 166 | 1 |
| 8 | 2 | -0,1 | 424,0511 | 178 | 1 |
| 6 | 0 | 2,6 | 461,9514 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 6,1 | 703,9109 | 126 | 1 |

| | | | | | |
|----|---|------|----------|------|----|
| 6 | 0 | 6,1 | 703,9109 | 126 | 1 |
| 10 | 0 | 4,4 | 636,0621 | 217 | 1 |
| 6 | 0 | 1,3 | 394,0293 | 126 | 1 |
| 10 | 0 | 5 | 664,0934 | 217 | 1 |
| 6 | 0 | 6 | 614,014 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 2 | 422,0606 | 126 | 1 |
| 8 | 2 | 3,3 | 576,1137 | 178 | 1 |
| 6 | 0 | 6,7 | 731,9422 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 2,7 | 551,8483 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 5,4 | 574,1232 | 126 | 1 |
| 8 | 0 | 1,5 | 430,0105 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 5,4 | 574,1232 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 6,5 | 642,0453 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 2,6 | 461,9514 | 126 | 1 |
| 6 | 0 | 0 | 326,0606 | 126 | -1 |
| 8 | 2 | 4,6 | 606,1131 | 166 | 1 |
| 6 | 0 | 0,7 | 354,0919 | 126 | 1 |
| 3 | 2 | 3 | 259,1572 | 41,5 | 1 |
| 1 | 1 | 2,5 | 236,095 | 46,3 | 1 |
| 8 | 3 | -0,2 | 283,0739 | 145 | -1 |
| 12 | 5 | -1,8 | 454,1713 | 211 | -1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 7 | 4 | 8,4 | 596,4652 | 116 | -1 |
| 3 | 2 | 3 | 259,1572 | 41,5 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 12 | 5 | -1,8 | 454,1713 | 211 | -1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 6 | 3 | 1,9 | 392,1999 | 94,8 | -1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 7 | 2 | 0,3 | 314,1413 | 112 | -1 |
| 4 | 4 | 2,6 | 363,2522 | 82,6 | -1 |
| 4 | 1 | 2,7 | 308,1049 | 63,6 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 4 | 2 | 2,2 | 284,2001 | 63,8 | -1 |
| 4 | 2 | 4,2 | 349,1954 | 50,9 | -1 |
| 4 | 2 | 3 | 332,2001 | 63,8 | -1 |
| 4 | 1 | 3,9 | 315,2111 | 42,2 | 1 |
| 3 | 2 | 3,3 | 283,2048 | 50,9 | 1 |
| 7 | 2 | 0,3 | 314,1413 | 112 | 1 |
| 4 | 4 | 2,6 | 363,2522 | 82,6 | 1 |
| 4 | 1 | 2,7 | 308,1049 | 63,6 | 1 |
| 4 | 2 | 2,2 | 284,2001 | 63,8 | -1 |
| 4 | 2 | 4,2 | 349,1954 | 50,9 | 1 |
| 4 | 2 | 3 | 332,2001 | 63,8 | 1 |
| 4 | 1 | 3,9 | 315,2111 | 42,2 | 1 |
| 3 | 2 | 3,3 | 283,2048 | 50,9 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 2 | 2 | 4 | 272,1776 | 40,5 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 3 | 1 | 0 | 180,0647 | 69,3 | -1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 8 | 1 | -0,4 | 361,1438 | 73,3 | -1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 6 | 2 | 3,1 | 331,0627 | 108 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 314,2246 | 34,1 | 1 |
| 8 | 2 | -0,8 | 351,1394 | 72,9 | 1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 3 | 0 | -0,1 | 194,0804 | 58,4 | 1 |
| 1 | 2 | 1,6 | 229,0174 | 36,4 | 1 |
| 8 | 2 | -0,2 | 320,1285 | 85,8 | -1 |
| 4 | 2 | 1,9 | 346,2144 | 74,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,8 | 454,2832 | 64 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | 1 |
| 1 | 2 | 2,3 | 208,1034 | 56,2 | 1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 372,1063 | 6,5 | 1 |
| 4 | 1 | 0,9 | 324,0778 | 63,3 | -1 |
| 2 | 0 | 3,8 | 344,075 | 6,5 | 1 |
| 1 | 1 | 1,6 | 88,08882 | 20,2 | 1 |
| 1 | 1 | 2,3 | 133,0891 | 12 | 1 |
| 2 | 0 | 2,1 | 142,0994 | 18,5 | 1 |
| 1 | 0 | 1,4 | 102,1045 | 9,2 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 2 | 0,5 | 122,0314 | 75,2 | -1 |
| 1 | 0 | 1,6 | 102,1045 | 9,2 | 1 |
| 2 | 2 | 0,6 | 193,1103 | 63,3 | 1 |
| 4 | 1 | 1,6 | 324,0778 | 63,3 | -1 |
| 2 | 1 | 3,5 | 198,0681 | 37,3 | -1 |
| 6 | 3 | 0,9 | 286,1542 | 102 | -1 |
| 1 | 0 | 0,2 | 53,02655 | 23,8 | 1 |
| 5 | 3 | -1,9 | 225,0862 | 115 | -1 |
| 6 | 0 | 2,2 | 416,2536 | 81 | -1 |
| 3 | 3 | 2 | 302,2107 | 57,7 | -1 |
| 5 | 2 | -0,3 | 244,0859 | 78,9 | -1 |
| 3 | 0 | 2,1 | 308,0829 | 43,1 | 1 |
| 3 | 2 | 3,1 | 249,1729 | 41,5 | -1 |
| 3 | 0 | 1 | 231,1372 | 26,8 | 1 |
| 1 | 0 | 5 | 277,183 | 3,2 | 1 |
| 3 | 1 | 2,6 | 313,0982 | 36,9 | 1 |
| 8 | 3 | 2,9 | 505,2247 | 140 | -1 |
| 3 | 1 | 3,4 | 264,1263 | 52 | 1 |
| 4 | 1 | 2,2 | 318,1692 | 86,4 | -1 |
| 3 | 0 | 3,3 | 275,1885 | 21,7 | 1 |
| 2 | 0 | 3,8 | 285,092 | 12,5 | 1 |
| 5 | 1 | 6 | 458,2482 | 42,3 | -1 |
| 4 | 0 | 4,4 | 389,2016 | 38,9 | 1 |
| 4 | 1 | 3 | 327,1205 | 55,2 | 1 |
| 3 | 0 | 3,7 | 323,1798 | 21,1 | 1 |
| 3 | 1 | 2,5 | 307,1685 | 39,1 | 1 |
| 4 | 1 | 2,2 | 311,1434 | 39,1 | 1 |
| 4 | 3 | 0,2 | 266,163 | 84,6 | -1 |
| 4 | 1 | 1,8 | 289,1678 | 49,8 | 1 |
| 7 | 0 | 5,7 | 524,1916 | 114 | -1 |
| 5 | 0 | 3,1 | 473,2348 | 80,2 | -1 |
| 2 | 0 | 4,1 | 391,2624 | 28,5 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|-----|----------|------|----|
| 3 | 1 | 2,8 | 295,1572 | 32,7 | 1 |
| 1 | 0 | 1,3 | 177,1154 | 28,8 | 1 |
| 4 | 2 | 2,8 | 307,2147 | 50,7 | 1 |
| 2 | 1 | 4,3 | 311,2249 | 23,5 | 1 |
| 7 | 2 | 3 | 380,1341 | 134 | -1 |
| 3 | 2 | 3,9 | 315,2198 | 43,7 | 1 |
| 4 | 0 | 3,1 | 417,0688 | 64,4 | 1 |
| 5 | 0 | 2,4 | 357,0993 | 77 | -1 |
| 6 | 1 | 1 | 373,0942 | 97,3 | -1 |
| 7 | 2 | 0 | 389,0891 | 118 | -1 |
| 1 | 0 | 5,2 | 293,2143 | 3,2 | 1 |
| 2 | 1 | 3,2 | 239,1077 | 29,1 | 1 |
| 3 | 1 | 2,9 | 193,1103 | 52,3 | 1 |
| 5 | 0 | 5 | 409,2188 | 52,1 | 1 |
| 2 | 0 | 1,8 | 116,0837 | 26,3 | 1 |
| 5 | 1 | 1 | 348,111 | 79,7 | -1 |
| 2 | 0 | 2,1 | 75,94414 | 64,2 | 1 |
| 3 | 1 | 1,5 | 213,0072 | 61,8 | 1 |
| 4 | 3 | 1 | 292,1787 | 70,6 | -1 |
| 4 | 3 | 3,6 | 316,1587 | 57,3 | 1 |
| 7 | 3 | 3,6 | 459,2421 | 99,9 | -1 |
| 3 | 0 | 5,2 | 318,0957 | 31,8 | 1 |
| 2 | 0 | 2,1 | 300,0666 | 40,6 | 1 |
| 1 | 2 | 1,8 | 189,1266 | 36,4 | -1 |
| 1 | 2 | 2 | 318,9143 | 36,4 | 1 |
| 3 | 2 | 0,9 | 197,0765 | 36,4 | -1 |
| 3 | 1 | 3,1 | 326,1298 | 30,9 | 1 |
| 5 | 0 | 2,3 | 303,1471 | 55,8 | 1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 362,2093 | 94,8 | -1 |
| 3 | 0 | 3,1 | 326,1298 | 23,8 | 1 |
| 4 | 2 | 2,5 | 254,0579 | 66,8 | 1 |
| 2 | 1 | 2,5 | 304,145 | 35,4 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 7 | 3 | 2,4 | 456,1944 | 119 | -1 |
| 3 | 1 | 4,7 | 304,0801 | 40,6 | 1 |
| 2 | 1 | 4,9 | 266,1783 | 15,3 | 1 |
| 2 | 0 | 3,4 | 271,1936 | 12,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3 | 284,0716 | 32,7 | 1 |
| 4 | 1 | 4,1 | 405,9791 | 85,6 | -1 |
| 5 | 2 | -1,2 | 236,0909 | 88,7 | -1 |
| 3 | 1 | 4,2 | 290,0644 | 54,6 | 1 |
| 2 | 1 | 4,4 | 252,1626 | 29,3 | 1 |
| 2 | 0 | 3,3 | 255,1623 | 12,5 | 1 |
| 1 | 1 | 2,8 | 221,1204 | 12 | 1 |
| 4 | 0 | 4,3 | 379,2147 | 38,8 | 1 |
| 2 | 0 | 4,3 | 279,1623 | 12,5 | 1 |
| 3 | 0 | 2,5 | 270,1732 | 25,4 | 1 |
| 6 | 1 | 7,6 | 524,408 | 74,2 | -1 |
| 6 | 1 | 2,5 | 304,1059 | 101 | -1 |
| 8 | 1 | 3,9 | 343,1031 | 64,6 | -1 |
| 4 | 1 | 3,3 | 293,0819 | 55,4 | 1 |
| 1 | 1 | -0,1 | 46,04186 | 20,2 | 1 |
| 2 | 0 | 0,7 | 88,05243 | 26,3 | 1 |
| 3 | 2 | 2,8 | 287,1521 | 62,3 | -1 |
| 3 | 1 | 6,5 | 454,2984 | 24,5 | 1 |
| 2 | 0 | 4 | 336,2202 | 23,6 | 1 |
| 7 | 1 | 0,4 | 306,1041 | 81,6 | -1 |
| 6 | 1 | 0,1 | 219,0655 | 93,1 | -1 |
| 4 | 0 | 1,9 | 126,0292 | 9,2 | 1 |
| 3 | 0 | 0,8 | 106,023 | 9,2 | 1 |
| 4 | 2 | 3,7 | 367,948 | 87,4 | 1 |
| 3 | 2 | -1,1 | 171,1259 | 63,3 | -1 |
| 4 | 1 | 1,8 | 287,1521 | 41,9 | 1 |
| 4 | 1 | 0,8 | 273,1365 | 41,9 | 1 |
| 7 | 0 | 2,3 | 370,198 | 39,7 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 1 | 2,8 | 312,195 | 50,2 | 1 |
| 4 | 2 | 2,1 | 341,031 | 98,4 | -1 |
| 3 | 2 | 1,8 | 218,0626 | 106 | -1 |
| 4 | 3 | 1,1 | 233,0735 | 132 | -1 |
| 5 | 4 | 1,2 | 314,1062 | 166 | -1 |
| 4 | 3 | 0,9 | 275,0841 | 135 | -1 |
| 6 | 0 | 4,9 | 441,1623 | 89,9 | -1 |
| 5 | 0 | 4 | 350,1201 | 77 | -1 |
| 4 | 1 | 4,3 | 454,2369 | 59,4 | -1 |
| 5 | 1 | 4,3 | 410,1397 | 50,8 | -1 |
| 3 | 1 | 0,3 | 128,0408 | 67,2 | -1 |
| 3 | 1 | 2 | 204,0721 | 67,2 | -1 |
| 4 | 1 | 3,7 | 374,1761 | 35,9 | 1 |
| 5 | 4 | 1,2 | 314,1062 | 166 | -1 |
| 3 | 2 | 1,2 | 156,047 | 106 | -1 |
| 5 | 2 | 2,6 | 379,2008 | 88,5 | 1 |
| 2 | 0 | 4,8 | 280,1939 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 398,1219 | 6,5 | 1 |
| 2 | 0 | 1,8 | 116,0837 | 26,3 | 1 |
| 2 | 0 | 2 | 130,0994 | 26,3 | 1 |
| 2 | 0 | 0,9 | 102,0681 | 26,3 | 1 |
| 3 | 2 | 2 | 294,1368 | 52,6 | -1 |
| 9 | 2 | 5,1 | 580,1347 | 115 | 1 |
| 2 | 1 | 2,3 | 234,1732 | 32,3 | 1 |
| 3 | 2 | 2,4 | 320,0119 | 61,7 | 1 |
| 2 | 0 | 3,8 | 272,9627 | 30,7 | 1 |
| 3 | 0 | 3,1 | 327,1138 | 28,1 | -1 |
| 6 | 2 | 1,5 | 413,1885 | 108 | -1 |
| 5 | 2 | 3,6 | 326,1379 | 90 | -1 |
| 5 | 2 | 3,4 | 448,1933 | 95,2 | -1 |
| 6 | 3 | 1,1 | 413,1885 | 131 | -1 |
| 6 | 6 | -3,1 | 182,079 | 121 | 1 |

| | | | | | |
|----|---|------|----------|------|----|
| 1 | 1 | 4,6 | 277,183 | 12 | 1 |
| 3 | 1 | 7 | 468,3141 | 24,5 | 1 |
| 4 | 0 | 4,6 | 437,2842 | 26,8 | 1 |
| 5 | 2 | 4,4 | 384,1353 | 62,4 | 1 |
| 4 | 1 | 5 | 394,1448 | 41,6 | 1 |
| 6 | 2 | 3,7 | 380,1848 | 71,6 | 1 |
| 6 | 0 | 5,2 | 481,1227 | 82,6 | -1 |
| 4 | 2 | 0,7 | 218,1267 | 105 | 1 |
| 4 | 0 | 3,3 | 285,1841 | 28,6 | 1 |
| 2 | 0 | 3,9 | 309,2093 | 20,3 | 1 |
| 3 | 0 | 2,2 | 163,9607 | 9,2 | -1 |
| 2 | 0 | 0,2 | 74,03678 | 26,3 | -1 |
| 2 | 2 | 0,2 | 90,02517 | 75,2 | 1 |
| 1 | 0 | 0,9 | 88,08882 | 9,2 | 1 |
| 6 | 0 | 3,1 | 343,1467 | 80,3 | 1 |
| 3 | 0 | 2,5 | 325,0782 | 30,2 | -1 |
| 7 | 1 | 1,8 | 263,043 | 85,3 | 1 |
| 3 | 0 | 3,3 | 265,1579 | 19,4 | -1 |
| 10 | 0 | 5,4 | 716,266 | 126 | 1 |
| 3 | 1 | 4,1 | 270,1191 | 40,6 | 1 |
| 6 | 0 | 3,9 | 434,2118 | 48,9 | -1 |
| 5 | 1 | 1,4 | 232,0848 | 70,5 | 1 |
| 3 | 1 | 3,3 | 230,0943 | 46,5 | 1 |
| 3 | 1 | 2,4 | 247,1572 | 32,7 | 1 |
| 7 | 3 | 3 | 405,1752 | 71 | -1 |
| 6 | 1 | -0,5 | 238,0338 | 121 | 1 |
| 2 | 1 | 1,9 | 286,0509 | 49,4 | 1 |
| 1 | 1 | 3,2 | 168,0687 | 28,7 | 1 |
| 4 | 1 | 5,4 | 356,1381 | 65,9 | 1 |
| 4 | 1 | 2,9 | 312,1409 | 59,1 | -1 |
| 6 | 1 | 2,2 | 345,1147 | 96,3 | -1 |
| 7 | 1 | 2,2 | 426,2067 | 82,2 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|-----|----------|------|----|
| 2 | 1 | 3,3 | 285,2093 | 23,5 | 1 |
| 2 | 0 | 1,9 | 130,0994 | 26,3 | 1 |
| 2 | 1 | 4,2 | 314,1817 | 44,3 | 1 |
| 5 | 1 | 4,2 | 403,1485 | 55,2 | 1 |
| 5 | 2 | 3,6 | 379,1718 | 74,4 | 1 |
| 5 | 2 | 3,8 | 367,1718 | 74,4 | 1 |
| 5 | 2 | 3,2 | 351,1947 | 59,3 | 1 |
| 4 | 2 | 3,7 | 390,242 | 51,1 | 1 |
| 5 | 2 | 5,1 | 409,2188 | 74,4 | 1 |
| 5 | 2 | 5 | 429,1875 | 74,4 | 1 |
| 5 | 2 | 3,9 | 393,1875 | 74,4 | 1 |
| 3 | 1 | 5,4 | 412,2515 | 24,5 | 1 |
| 3 | 2 | 2,9 | 296,1889 | 33,3 | 1 |
| 3 | 2 | 4 | 338,2358 | 33,3 | -1 |
| 5 | 2 | 2,2 | 374,1664 | 75,8 | -1 |
| 6 | 2 | 2,5 | 429,2086 | 79 | -1 |
| 4 | 2 | 2,3 | 379,226 | 53,6 | -1 |
| 8 | 2 | 3,8 | 500,1916 | 120 | 1 |
| 1 | 0 | 3,6 | 243,1987 | 3,2 | -1 |
| 2 | 0 | 3,2 | 308,1525 | 40,6 | 1 |
| 4 | 1 | 0,7 | 275,1634 | 44,8 | -1 |
| 3 | 0 | 0,7 | 194,1055 | 46,4 | -1 |
| 4 | 3 | 0,8 | 266,163 | 70,6 | -1 |
| 8 | 1 | 2 | 383,1594 | 107 | -1 |
| 5 | 3 | 1,6 | 360,1937 | 94,8 | -1 |
| 5 | 1 | 3,2 | 285,1035 | 83,1 | 1 |
| 4 | 1 | 1,9 | 236,1525 | 55,6 | 1 |
| 3 | 0 | 4,5 | 284,1347 | 31,8 | 1 |
| 1 | 1 | 3,8 | 178,1358 | 20,2 | 1 |
| 1 | 1 | 3,5 | 155,1674 | 12 | 1 |
| 5 | 1 | 2,1 | 383,1667 | 73,6 | 1 |
| 2 | 1 | 3,1 | 257,178 | 23,5 | -1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 7 | 4 | -1,8 | 244,0808 | 144 | -1 |
| 8 | 1 | 3,9 | 366,1191 | 71,8 | 1 |
| 3 | 1 | 2,4 | 179,0946 | 52,3 | 1 |
| 3 | 0 | 2,3 | 250,1681 | 32,8 | -1 |
| 1 | 2 | 1,2 | 195,0563 | 50,4 | 1 |
| 3 | 2 | 2,5 | 259,0688 | 36,4 | -1 |
| 5 | 0 | 1,9 | 319,0991 | 92,7 | 1 |
| 4 | 0 | 2,3 | 314,0613 | 68,8 | 1 |
| 3 | 1 | 2,2 | 275,1521 | 47,6 | 1 |
| 7 | 1 | 4,6 | 415,173 | 77,1 | -1 |
| 4 | 3 | 0,9 | 195,0532 | 86,6 | 1 |
| 4 | 1 | 3,2 | 276,1096 | 54,6 | 1 |
| 1 | 1 | 4,8 | 305,0738 | 12 | -1 |
| 5 | 2 | 0,9 | 204,1123 | 83,7 | -1 |
| 5 | 3 | 0,2 | 272,1195 | 86,8 | -1 |
| 4 | 2 | -0,8 | 224,0797 | 78,9 | -1 |
| 9 | 3 | -0,7 | 398,0685 | 150 | 1 |
| 2 | 1 | 5,9 | 380,1889 | 42 | 1 |
| 2 | 1 | 4,3 | 311,1708 | 37,3 | -1 |
| 4 | 2 | 3,7 | 441,1164 | 79,3 | 1 |
| 1 | 1 | 0,5 | 74,07316 | 20,2 | 1 |
| 3 | 0 | 3 | 359,1419 | 29,5 | 1 |
| 2 | 1 | 3,3 | 288,2089 | 37,3 | 1 |
| 5 | 0 | 3,2 | 355,1784 | 40,2 | 1 |
| 2 | 2 | 2,4 | 292,1722 | 76 | 1 |
| 2 | 1 | 2,4 | 312,2089 | 37,3 | -1 |
| 5 | 3 | 0,8 | 313,1193 | 85,6 | -1 |
| 6 | 4 | -0,4 | 312,0939 | 191 | 1 |
| 2 | 1 | 3,5 | 321,1066 | 50,6 | -1 |
| 3 | 2 | 2,3 | 270,1038 | 83,6 | 1 |
| 3 | 2 | 1,9 | 223,1572 | 41,5 | -1 |
| 9 | 1 | -0,8 | 339,0988 | 124 | 1 |

| | | | | | |
|---|---|------|----------|------|----|
| 3 | 1 | 2,6 | 263,1885 | 32,7 | 1 |
| 2 | 1 | 1,6 | 151,0797 | 26 | 1 |
| 3 | 0 | 2,4 | 342,0439 | 43,1 | 1 |
| 2 | 0 | 5,8 | 294,2096 | 6,5 | -1 |
| 1 | 2 | -1,4 | 60,03236 | 69,1 | 1 |
| 1 | 0 | 1,3 | 70,04186 | 9,2 | -1 |
| 3 | 2 | -1,3 | 211,0957 | 88,2 | -1 |
| 4 | 3 | -2,1 | 241,1063 | 108 | -1 |
| 4 | 3 | 0 | 222,0688 | 134 | 1 |
| 3 | 1 | 4,9 | 376,2515 | 32,3 | -1 |
| 5 | 1 | 5,4 | 381,1875 | 65,6 | 1 |