



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***IN VITRO* HİPERTANSİYON MODELLENMESİNDE KULLANILACAK ATARDAMAR BİYOREAKTÖRÜ TASARLANMASI VE ÜRETİMİ**

Yüksek Lisans Tezi

M. Mert ÇELTİKOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

***IN VITRO* HİPERTANSİYON MODELLENMESİNDE
KULLANILACAK ATARDAMAR BİYOREAKTÖRÜ
TASARLANMASI VE ÜRETİMİ**

M. Mert ÇELTİKOĞLU

Danışman : Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “*In Vitro* Hipertansiyon Modellenmesinde Kullanılacak Atardamar Biyoreaktörü Tasarlanması Ve Üretimi” 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.

03/06/2021

M. Mert ÇELTİKOĞLU

ÖZET***IN VITRO* HİPERTANSİYON MODELLENMESİNDE KULLANILACAK
ATARDAMAR BİYOREAKTÖRÜ TASARLANMASI VE ÜRETİMİ****ÇELTİKOĞLU, M. Mert**

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Haziran 2021, 166 sayfa

Damar yapısının kan ile etkileşen yüzünü kaplayan endotel hücreler, kan akışı sebebiyle sürekli olarak mekanik etkilere maruz kalırlar. Hücreler bu kuvvetlere maruz kaldığında, hücre yüzeyindeki mekanoreseptörler uyarılır ve bir dizi sinyal yolağı aktive edilir. Bu yolakların aktivasyonu pek çok farklı gen ve proteinin ekspresyonunun, hücre dizilim ve şekillerinin, komşu hücreler arası ilişkilerin değişmesine yol açar. Bu mekanik uyarılar arasında hücreler üzerinde en çok yanıt oluşturan kuvvetler kayma gerilimi ve dairesel germe olarak belirlenmiştir. Bu etkiler kan akışını kontrol etmek ve damar yapısını korumak için, hücrelerin tepki oluşturmaya neden olur. Mekanotransdüksiyon adı verilen bu sürecin detaylı olarak incelenebilmesi, gerçekçi bir *in vitro* damar modelinin geliştirilmesi ve hipertansiyon gibi hastalıklarda, değişen mekanik uyarılarla birlikte vücuttakine benzer yanıtların model üzerinde oluşturulabilmesi için oldukça önemlidir.

Mekanotransdüksiyonun olumlu veya olumsuz etkilerinin incelenebilmesi için, kullanım kolaylığı ön planda tutulan, kontrollü *in vitro* koşulları sağlarken modelin takibi ve gözlenmesine olanak veren bir biyoreaktöre ihtiyaç duyulmuştur. Bu tez çalışmasıyla, damar doku mühendisliği uygulamalarında, kan akışının pulsatif etkisini taklit eden bir pompa sistemi yardımıyla, doku iskelesini ve hücreleri mekanik sinyallerle uyarmaya olanak sağlayacak bir biyoreaktör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Daha önce yapılmış çalışmalarda kayma geriliminin endotel hücreler üzerindeki etkisi incelenmiş olsa da dairesel germe ile ilgili yapılmış çalışma sayısı oldukça azdır. Hipertansiyon modellerinde ise hücre

yanıtları, basınçlı inkübatör içerisinde farklı basınçlarda kùltive edilerek incelenmiştir. Sisteme etki edeceği düşünölen mekanik değışkenlerin incelenmesi ve biyoreaktörün tasarımı için Bilgisayar Destekli Tasarım (Computer Aided Design - CAD) teknikleri kullanılmıştır. Özgünlük ve üretilebilirlik gözetilerek, kullanım kolaylığını amaçlayan tasarım, SolidWorks programı ile son haline getirilmiştir. Parçaların üretimi için kullanılacak malzemeler; steril edilebilirlik, biyouyumluluk ve dayanıklılık kriterleri üzerinden seçilmiştir. Son tasarım üzerinden ANSYS programı ile farklı akış etkileri simöle edilmiş, Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiğı (Computational Fluid Dynamics - CFD) sayesinde hücrelerin maruz kalacağı düşünölen mekanik etkiler gösterilmiştir.

Tez dahilinde tasarlanıp üretilen biyoreaktör ile, *in vitro* atardamar modelindeki endotel hücrelerinin, doğala özdeş fiziksel bir makro çevrede bulunmasını sağlamak için doku iskelesi olarak hücre tutunma verimi bilinen, esnek ve yüksek mekanik dayanıma sahip tübüler bakteriyel selöloz içerisine ekimi gerçekleştirilmiş; sistemin damar içi akış sırasında ve hipertansiyon koşulları altında maruz kaldığı mekanik uyarılara olan tepkisi, farklı akış rejimleri ve basınç etkileri ile incelenmiştir. Tez kapsamında geliştirilen Hipertansiyonda Akış Sistemi ile yüksek basınç ve buna bağılı artan dairesel germe etkilerinin, diğler sistemlerle aynı kayma gerilimine maruz bırakılmış olmasına rağmen endotel hücreleri üzerinde hasar yarattığı gösterilmiştir. Bu hasar sonucunda, akut hipertansiyon etkilerinin, damar geçirgenliğinde önemli artışa yol açtığı mekanobiyolojik açıdan ispatlanmıştır.

Bu tez çalışması sırasında geliştirilen biyoreaktör ve *in vitro* damar modeli sayesinde, damar geçirgenlik çalışmaları için stabil bir sistem; kontrol edilebilir ve değıştirilebilir çevre koşulları sayesinde ise hipertansiyon gibi hastalık çalışmalarında kullanılabilecek bir ara basamak oluşturulmuştur. Böylece bu çalışmalarda kullanılacak tekniklerin ve ilaç adaylarının, *in vivo* denemeler öncesi incelenebilmesini mümkün kılmaya ve hipotezlerin ispatı için kullanılacak deney hayvanlarının sayısını azaltmaya yönelik bir adım atılmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyoreaktör, mekanotransdüksiyon, hipertansiyon, CFD, yapay atardamar, tübüler bakteriyel selöloz, damar geçirgenliği.

ABSTRACT**DESIGN AND PRODUCTION OF AN ARTERY BIOREACTOR FOR *IN VITRO* HYPERTENSION MODEL****ÇELTİKOĞLU, M. Mert****MSc in Bioengineering****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aylin ŞENDEMİR****June 2021, 166 pages**

Endothelial cells that cover the blood interface of the vascular structure, constantly exposed to mechanical effects due to blood flow. Exposing the cells to these mechanical effects activates a number of signaling pathways with stimulation of mechanoreceptors on the cell surface. These pathways cause alterations in the expressions of various genes and proteins, cell shapes and arrangement, and intercellular relationships. Among these mechanical stimulants, the most effective forces on the cells have been identified as shear stress and circumferential stress. The cells react to these stimuli, to control blood flow and to protect of the vascular structure. It is crucial to investigate this mechanism called mechanotransduction in detail, develop a realistic *in vitro* vascular model, and acquire responses similar to those in the body with altering mechanical stimuli in hypertension.

In order to examine the positive or negative effects of the mechanotransduction, there was a need for a bioreactor that allows easy-to-use, controlled *in vitro* conditions and allows the follow-up and observation of the model. This thesis aims to develop a bioreactor that can stimulate the tissue scaffold and cells with mechanical signals in vascular tissue engineering applications by imitating the pulsative effect of blood flow *via* a pumping system. Although the effect of shear stress on endothelial cells has been examined in previous studies, the number of studies on circumferential stress is a deficit. Also, in hypertension models, cells were mostly incubated in at pressurized incubator and cell responses at different pressures were studied. Computer-Aided Design (CAD) techniques

were used to investigate the mechanical stimuli that possibly affect the cell behavior and to design the bioreactor. Considering originality and manufacturability, the design that aims ease of use has been finalized with the SolidWorks software. The materials to be used for the parts were; chosen based on the criteria of sterilizability, biocompatibility, and durability. Different flow regimes have been simulated with the ANSYS program over the last design, and the mechanical effects that the cells will be exposed to were shown by Computational Fluid Dynamics (CFD).

With the bioreactor developed within this thesis, in order to ensure that the endothelial cells in the *in vitro* artery model inhabit a physical environment similar to the body, they were seeded into tubular bacterial cellulose scaffold, which is known to show cell attachment efficiency, flexibility, and has high mechanical strength. With different flow regimes and pressure effects, the response of the system to mechanical stimuli exposed during intravascular flow and under hypertension conditions was studied. With the Flow System in Hypertension developed within the scope of the thesis, it has been shown that high pressure and the resulting increased circumferential stress effects cause damage to the endothelial cells even though they are exposed to the same shear stress as other systems. As a result of this damage, it has been proven mechanobiological that the effects of acute hypertension cause a significant increase in vascular permeability.

The *in vitro* vascular model developed during this thesis is a stable system for vascular permeability studies, and can be used as an intermediate step for disease studies, such as hypertension, with the help of the controllable and modifiable environmental conditions provided by the bioreactor. Thus, a step was taken to enable the drug candidates and techniques to be used in these studies to be screened before *in vivo* trials and to reduce the number of experimental animals to be used to prove hypotheses.

Keywords: Bioreactor, mechanotransduction, hypertension, CFD, tissue engineered artery, tubular bacterial cellulose, vascular permeability.

TEŞEKKÜR

“Ad Augusta Per Angusta”

Yaklaşık 4 yıl süren bu tez çalışması dışında ekibi bünyesinde geçirdiğim lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca, yalnızca bilimsel olarak gelişmemi sağladığı için değil; olaylara bakış açımı değiştirdiği, zorluklar karşısında sakin kalabilme yeteneğimi kesinleştirdiği, görevleri yerine getirmekteki titizliğini artırdığı, bugün olduğum kişi ve geldiğim noktada ciddi katkıları olduğu için danışmanım Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR’e teşekkür ederim. Ayrıca tezimin zenginleşmesinde yaptıkları yapıcı yorumlarla katkıları büyük olan jüri üyelerim Doç. Dr. Suphi Ş. ÖNCEL ve Doç. Dr. Ozan KARAMAN’a teşekkür ederim.

Laboratuvara adım attığım ilk günden bu yana yeri doldurulması mümkün olmayan bir arkadaş ve mentor olarak; bu tez çalışmasını tamamlayabilmek için ihtiyaç duyduğum bütün teknikleri ve bilgileri bana öğreten; disiplin, mükemmeliyetçilik, yaratıcı çözümler geliştirme konusunda rol modelim olan; zekâsı ve kişiliği ile her daim imrendiğim; uzun yıllar hayatımda yer almaya devam edeceğini bildiğim sevgili hocam Dr. Ece BAYIR’a; sabrı, yüzümü güldüren arkadaşlığı ve sancılarla dolu gelişim sürecimde başka hiç kimsenin göstermeyeceği desteği gösterdiği, bana kattığı her şey için çok teşekkür ederim.

Başta Mert ŞAHİNLER, Cem TÜRKAY, Dr. Şeyma TAŞDEMİR, olmak üzere, lisans dönemimden itibaren keyifle bir parçası olduğum EgeREACT ve EBIOPHASE laboratuvar grubu üyelerine; birlikte geçirdiğimiz uzun saatlerin, keyifli sohbetlerin yanında bana öğrettikleri her şey ve öğrenme sürecimdeki yardımları için teşekkür ederim. Özellikle tezin de bir parçası olan projenin sonuçlanması için katkılarından ötürü Barış GÜLİÇLİ, Özgün Selim GERMİYAN ve Zehra MORÇİMEN’e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın da parçası olduğu projemizi bitirebilmemiz için gösterdiğimiz yoğun çaba sırasında laboratuvar imkanlarını pandemi koşullarında dahi kullanmama izin veren Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (Ege MATAL) müdürü Prof. Dr.

Suna TİMUR'a ve çalışmalarımız sırasında desteğini esirgemeyen Dr. Raif İLKTAÇ'a içten teşekkürü borç bilirim.

Biyoreaktörün geliştirilme sürecinde birlikte uzun mesailer harcadığımız; Ege Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü'nden Dr. Öğr. Üyesi Barış Oğuz GÜRSES ve Mert ŞENER'e biyoreaktörü gerçeğe dönüştürmemize yardımcı olan emekleri ve katkıları için teşekkür ederim.

Doğduğum günden beri birey olarak bana saygılarını sunarken, kendim olmak için bıraktıkları alandan büyük bir özveri ve emekle beni yetiştiren, en iyi eğitimi almam için her türlü fedakarlığı gösteren, emeğin ve bilginin yerini herhangi bir şeyle doldurulmayacağını bana öğreten canım annem Vildan ÇELTİKOĞLU'na, babam Günhan ÇELTİKOĞLU'na ve ablam A. Aslı ÇELTİKOĞLU'na sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın en uçlarını ve diplerini yaşadığım süreçte hep ayak ucumda olan, sorumluluk sahibi, planlı ve sabırlı olmamda muhteşem karakteri, karşılıksız sunduğu sevgisi ve vakurluğunun yanında hiçbir zaman kaybetmediği zıırlığı ile canım kızım Arwen'e sabahın köründe çıkıp, gece yarlarına kadar laboratuvarıda geçirdiğim bu yıllarda özlemle beni beklediğı ve hayatıma en çok dokunan varlık olduğı için teşekkür ederim.

Tez sürecimin son iki yılında bir yandan özel sektörde çalışırken, tez bitirmenin zorluğunu bilen, hemen her rica ettiğimde şirket imkanlarını dahi sunarak yardımcı olan başta direktörüm Ö. Rüyam ERDİR ve ofis arkadaşım, oyun arkadaşım, sınıf arkadaşım, dostum Ozan UĞUR'a, süreçte desteğini her daim hissettiğim genel müdürüm Oğul ÇİZMECİĞİL ve bütün Katsan Medical Devices ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Bir yandan yoğun laboratuvar temposunda çalışmalarımı sürdürürken, bir yandan da hayatımı kazanmaya çalıştığım süre zarfında desteklerini esirgemeyen, çalışma saatlerimi ayarlamamda yardımcı olan, laboratuvarıda geçirdiğim uzun saatlerde mesaim e geç kaldığımda her daim anlayış gösteren işverenlerime, yöneticilerime, hoş sohbet müşterilere ve bu zorlu süreci çekilebilir kılan bütün

mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bütün bu yoğunluk sırasında elinden gelen desteği göstererek hayatı çekilebilir kılan, bu serüvenin cefasını en çok çeken sevgili Evin Kobatan'a özel olarak teşekkür ederim. Bütün desteği için minnettarım.

Tezimi yapmak için gerekli maddi desteği sağlayan ve lisansüstü eğitimim sırasında geçimimi sürdürebilmek için proje kapsamında burs aldığım 216M542 No'lu proje ile çalışmama yapmış oldukları katkılar için TÜBİTAK'a ve bu COST projesinin dahil olduğu EuroCellNet'e (CA 15214) çalışmalarımız sırasında sundukları imkanlar ve bilimsel destek için teşekkür ederim. Özellikle biyoreaktörün geliştirilmesi sürecinde fikirsel katkılarının yanında, bu alanda uzman laboratuvarına da gidebilmem için oldukça uğraşan, deneyimlerini içtenlikle bizimle paylaşan Prof. Dr. F. Ioannis MISSIRLIS'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

03/06/2021

M. Mert Çeltikoğlu

ÖN SÖZ

Bilim karanlıktan beslenir. Bilinmezin aydınlatılması için, bizden öncekilerin koyduğu tuğlalar üzerine inşa edilen bilgi dağına, bir çakıl taşı koyabilmek için çıktığım bu uzun maceranın sonuna gelirken somut bir fayda sağlayabilmiş olmanın mutluluğunu yaşıyorum. Tolkien'in de dizeleriyle;

“Yuvamız geride, dünya önümüzde,

Ve arşınlanacak nice yol var,

Gölgelerin arasından karanlığın sınırına,

Yıldızlar ıslıl ıslıl oluncaya kadar.”

Uykusuz geceler, maddi kaygılar, stres ve hüsrarla başa çıkabilmeyi öğrendiğim bu yolculuk, bilimsel düşünce yapısını cebime koyarken çok daha bütün bir insan olmamı sağladı. Başarısızlıkların ve sonunda başarımların hatırına, okuyan herkesin faydalanabileceği bir tez çalışması toparladığımı düşünüyorum. Keyifli okumalar.

M. Mert ÇELTİKOĞLU

İzmir, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ÖN SÖZ	xiv
İÇİNDEKİLER.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ.....	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu.....	14
3.1.1. TBS üretimi.....	14
3.1.2. TBS'nin saflaştırılması.....	15
3.1.3. TBS'nin modifikasyonu.....	16
3.2. Biyoreaktör Tasarımı ve Üretimi.....	19
3.2.1. Malzeme seçimi.....	20
3.2.2. TBS'nin CAD modelinin oluşturulması.....	23
3.2.3. Biyoreaktör parçalarının tasarımı ve modellenmesi.....	23

3.2.4. CFD analizi ile akış etkilerinin incelenmesi	26
3.3. Hücre Kültürü	29
3.3.1. Besi ortamı (GFM) hazırlanması.....	30
3.3.2. Hücre çözündürme ve çoğaltma.....	30
3.3.3. Hücre pasajlama	31
3.3.4. Hücre dondurma	33
3.3.5. TBS üzerinde hücre davranışlarının incelenmesi	33
3.4. Hücre Yanıtlarının <i>In Vitro</i> Modelde İncelenmesi.....	40
3.4.1. Biyoreaktörün kurulumu.....	45
3.4.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile hücre yanıtlarının mekanik ölçümü.....	53
3.4.3. İmmünofloresans (IF) boyamalar	54
3.4.4. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) çalışmaları ...	57
3.4.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve nitrik oksit (NO) birikiminin incelenmesi	59
3.4.6. Geçirgenlik testleri.....	62
3.4.7. İstatistiksel analiz	63
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	64
4.1. Statik TBS Üzerinde Hücre Davranışlarının İncelenmesi	64
4.1.1. Hücre ekim yönteminin belirlenmesi.....	64
4.1.2. Hücre sağ kalım veriminin belirlenmesi	64
4.2. TBS Modifikasyon Başarısının İncelenmesi	68
4.2.1. Modifiye TBS yüzeyine hücre tutunma veriminin görsel takibi	70
4.2.2. Modifiye TBS yüzeyindeki hücrelerin TEER ölçümleri	71
4.2.3. TBS modifikasyonunun optimizasyonu.....	75
4.2.4. Modifikasyon başarısının ATR-FTIR ile tespit edilmesi.....	76

4.2.5. Modifiye HTBS'lerin IF boyamaları.....	78
4.3. Biyoreaktör Parçalarının Üretimi.....	80
4.3.1. Otoklav dayanım testleri.....	80
4.3.2. Korozyon dayanım testi.....	80
4.3.3. Malzemelerin sitotoksik etkilerinin gözlenmesi	80
4.3.4. Parçaların işlenmesi.....	81
4.4. CFD Analiz Sonuçları.....	82
4.4.1. Sabit akışın TBS üzerindeki etkilerinin analizi.....	83
4.4.2. Sistolik akışın TBS üzerindeki etkilerinin analizi	84
4.4.3. Hipertansiyondaki akışın TBS üzerindeki etkilerinin analizi ..	86
4.4.4. Akış hesaplamalarının değerlendirilmesi	87
4.5. Biyoreaktör Denemeleri.....	90
4.5.1. Akış kurgularının sistem üzerinde optimizasyonu	90
4.5.2. Hücre tutunma denemeleri.....	92
4.5.3. TBS yüzeyindeki hücre morfolojilerinin incelenmesi.....	93
4.5.4. Oksidatif stres etkilerinin değerlendirilmesi.....	94
4.5.5. TEER ölçüm sonuçları.....	97
4.5.6. Hücre sitoiskelet değişimlerinin AFM ile ölçülmesi.....	102
4.5.7. Protein ifadelerinin IF boyama sonuçları	107
4.5.8. Proteinlerin mRNA ifade düzeyindeki değişimlerinin kantitatif PCR ile gösterilmesi	115
4.5.9. Sistemin geçirgenlik başarısının değerlendirilmesi.....	118
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	121
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	123
ÖZGEÇMİŞ	137

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Damar duvarında hücrelere etki eden mekanik kuvvetler	5
Şekil 2.2 Damar içi akışla oluşan kayma geriliminin, endotel hücrelerdeki mekanotransdüksiyonu.....	7
Şekil 2.3 Kan basıncındaki artışla birlikte damarda meydana gelen kısa ve uzun vadeli değişimler.....	10
Şekil 2.4 Damar içindeki dairesel germe etkileri.....	11
Şekil 3.1 Tez etkileşim diyagramı.	13
Şekil 3.2 Tübüler Bakteriyel Selüloz üretimi ve saflaştırılması	15
Şekil 3.3 Selülozun NaOH varlığında GTMAC ile modifikasyonu.	17
Şekil 3.4 GTMAC ile BS modifikasyonu sırasında meydana gelen kompetitif reaksiyonlar..	17
Şekil 3.5 TBS'nin GTMAC ile modifikasyonu.....	19
Şekil 3.6 Ön tasarımda kullanılan biyoreaktörler	23
Şekil 3.7 Biyoreaktörün <i>in silico</i> montajı.....	26
Şekil 3.8 CFD analizi için basitleştirilmiş model	27
Şekil 3.9 Akış simülasyonu için meshlenmiş model	28
Şekil 3.10 TBS'ye hücre ekimi.....	35
Şekil 3.11 Analizlerin gerçekleştirilmesi için inkübasyon sonrası kesilerek açılan HTBS.....	36
Şekil 3.12 HTBS'lerde TEER ölçümü	39
Şekil 3.13 Sabit ve Pulsatif akış rejiminde kayma gerilimi ve dairesel germe etkileri	41
Şekil 3.14 Pulsatif akışı sabit akışa dönüştüren dampener.....	43
Şekil 3.15 Sitemde basınç kontrolünü sağlayabilmek için kullanılan vana.	44
Şekil 3.16 Biyorektör kurulumu öncesi kabin içerisindeki hazırlıklar.	48
Şekil 4.1 HBMEC Alamar Blue kalibrasyon grafiği.	65
Şekil 4.2 EPC Alamar Blue kalibrasyon grafiği.....	66
Şekil 4.3 HUVEC Alamar Blue kalibrasyon grafiği.....	66
Şekil 4.4 HBEC-5i Alamar Blue kalibrasyon grafiği.....	67
Şekil 4.5 HBMEC'lerin TBS üzerindeki Live&Dead boyama sonuçları	68

Şekil 4.6 TBS doku iskelelerinin farklı malzemeler ile yüzey modifikasyonu denemelerinin farklı hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi.	69
Şekil 4.7 HBMEC'lerin 10.gün fotoğrafları.	70
Şekil 4.8 Kolajen kaplı BS üzerinde EPC hücrelerinin zamanla uzaklaşması. Jelatin kaplı BS üzerinde HUVEC hücrelerinin zamanla uzaklaşması. Ters faz ışık mikroskobu fotoğrafları	71
Şekil 4.9 GTMAC ile modifiye edilmiş liyofilize BS üzerinde HBMEC morfolojisi.	71
Şekil 4.10 EPC'lerin 5 günlük kültivasyonu sonucunda elde edilen TEER değerleri.	72
Şekil 4.11 HUVEC'lerin 5 günlük kültivasyonu sonucunda elde edilen TEER değerleri.	73
Şekil 4.12 HBMEC'lerin 5 günlük kültivasyonu sonucunda elde edilen TEER değerleri.	73
Şekil 4.13 Hücrelerin 1. gün ters faz ışık mikroskobu görüntüleri	75
Şekil 4.14 Kontrol BS, DMSO varlığında GTMAC ile modifiye edilmiş BS, Susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilmiş BS üzerinde kültive edilen HUVEC'lerin 5. gün ters faz ışık mikroskobu fotoğrafları	76
Şekil 4.15 Kontrol BS ile kuru havayla susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS'nin FTIR spektrumları	76
Şekil 4.16 Kontrol BS ile DMSO yardımıyla GTMAC ile modifiye edilen BS'nin FTIR spektrumları.	77
Şekil 4.17 Kontrol BS, kuru hava ile susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS, DMSO ile susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS ve saf GTMAC'ın FTIR spektrumları.	77
Şekil 4.18 Modifiye edilmemiş ve edilmiş BS üzerinde HBEC-5i'lerin sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1 ve Klaudin-5) gösterilmesi.	78
Şekil 4.19 Modifiye edilmiş BS üzerinde HUVEC'lerin sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1 ve Klaudin-5) gösterilmesi.	79
Şekil 4.20 Sabit akışın TBS yüzeylerinde oluşturduğu WSS.	83
Şekil 4.21 Sabit akışta dairesel germe etkileri.	84
Şekil 4.22 Sistolik akışın TBS yüzeylerinde oluşturduğu WSS.....	85
Şekil 4.23 Sistolik akışta dairesel germe etkileri.....	85
Şekil 4.24 Hipertansiyondaki akışın TBS yüzeylerinde oluşturduğu WSS.....	86

Şekil 4.25 Hipertansiyondaki akışta dairesel germe etkileri.	87
Şekil 4.26 Hipertansiyon basıncının TBS’de yol açtığı radyal deformasyon.	87
Şekil 4.27 Damar içindeki akışkanın hareketi. A – Simetrik parabolik hareket. B – Asimetrik parabolik hareket.	88
Şekil 4.28 TBS yüzeyine uygulanan basıncın, sistemi terk ederken gösterdiği değişimi.	89
Şekil 4.29 Açık ölçüm sistemine sabitlenen vananın basınç ve debi kontrolünü sağlayabilmek için kullanılması.....	91
Şekil 4.30 5 günlük inkübasyon sonrası HBEC-5i’lerin TBS yüzeyindeki dağılımlarının floresans mikroskop görüntüleri.	92
Şekil 4.31 5 günlük inkübasyon sonrası HBEC-5i’lerin TBS yüzeyindeki dağılımlarının SEM görüntüleri.....	93
Şekil 4.32 MDA stok solüsyonlarına ait seyreltmelerle elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	94
Şekil 4.33 Statik modelden ve dinamik modellerden 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilen MDA miktarı sonuçları.....	95
Şekil 4.34 Statik modelden ve dinamik modellerden 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilen NO sonuçları.	96
Şekil 4.35 Akış etkisindeki ve statik HTBS’lerin birikimli TEER ölçüm değerleri.	97
Şekil 4.36 Statik ve dinamik modellerde 1 günlük TEER ölçüm değerleri.	98
Şekil 4.37 Statik ve dinamik modellerde 2 günlük TEER ölçüm değerleri..	98
Şekil 4.38 Statik ve dinamik modellerde 3 günlük TEER ölçüm değerleri..	99
Şekil 4.39 Statik ve dinamik modellerde 4 günlük TEER ölçüm değerleri..	99
Şekil 4.40 Statik ve dinamik modellerde 5 günlük TEER ölçüm değerleri..	100
Şekil 4.41 Çelik rakorlar yerine sistemde kullanılan HTBS bağlantıları.....	101
Şekil 4.42 Statik modelde kültive edilen HBEC-5i hücrelerinin A. AFM topografisi. B. Hücreli BC yüzeyinin kuvvet-mesafe eğrisi. C. Hücreli BC yüzeyinin Young’s modulus haritası. D. Hücreli BC yüzeyinin adhezyon haritası.....	103
Şekil 4.43 Sabit akışlı modelde kültive edilen HBEC-5i hücrelerinin A. AFM topografisi. B. Hücreli BC yüzeyinin kuvvet-mesafe eğrisi. C. Hücreli BC yüzeyinin Young’s modulus haritası. D. Hücreli BC yüzeyinin adhezyon haritası.	104

Şekil 4.44 Sistolik akış modelinde kültive edilen HBEC-5i hücrelerinin A. AFM topografisi. B. Hücreli BC yüzeyinin kuvvet-mesafe eğrisi. C. Hücreli BC yüzeyinin Young's modulus haritası. D. Hücreli BC yüzeyinin adhezyon haritası.	105
Şekil 4.45 Hipertansiyon akış modelinde kültive edilen HBEC-5i hücrelerinin A. AFM topografisi. B. Hücreli BC yüzeyinin kuvvet-mesafe eğrisi. C. Hücreli BC yüzeyinin Young's modulus haritası. D. Hücreli BC yüzeyinin adhezyon haritası.	106
Şekil 4.46 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve F-aktin proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri.	108
Şekil 4.47 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve β -Katenin proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF görüntüleri.....	109
Şekil 4.48 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve VE-Kaderin proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF görüntüleri.	110
Şekil 4.49 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve ZO-1 proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri. ...	111
Şekil 4.50 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve Okludin proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF görüntüleri.....	112
Şekil 4.51 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve Klaudin-5 proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF görüntüleri.....	113
Şekil 4.52 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D.	

akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve JAM-A proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri.	114
Şekil 4.53 Sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1, Okludin, Klaudin-5, JAM-A) mRNA ifade düzeylerindeki değişimleri tüm modeller (statik, sabit akış, sistolik ve hipertansiyon) üzerinde gösteren grafikler.	116
Şekil 4.54 Adherens bağlantı proteini olan VE-Kaderin ve hücre içerisinde VE-Kaderinler ile F-aktinler arası bağlantıyı sağlayan kompleks proteinlerin bir türü olan β -Katenin proteininin ve F-aktin proteininin mRNA ifade düzeylerindeki değişimleri tüm modeller (statik, sabit, sistolik ve hipertansiyon) üzerinde gösteren grafikler	117
Şekil 4.55 HPLC ile kafein miktar analizi gerçekleştirebilmek için çizilen kalibrasyon grafiği.	119
Şekil 4.56 HPLC ile sükroz miktar analizi gerçekleştirebilmek için çizilen kalibrasyon grafiği.	119

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3-1 Biyoreaktör parçaları	24
Tablo 3-2 TBS üzerindeki fiziksel etkilerin hesaplanmasında kullanılan formüller.	41
Tablo 3-3 Farklı akış etkilerinde sistemin maruz kalacağı kuvvetlerin hesaplanması	42
Tablo 3-4 Biyoreaktörün ön montaj basamakları.	45
Tablo 3-5 Biyoreaktörün kurulum basamakları.	48
Tablo 3-6 Kantitatif PCR (qPCR) ile analiz edilen gen dizileri.....	58
Tablo 4-1 CFD analizinde kullanılan malzemelerin özellikleri.....	82
Tablo 4-2 Farklı akış rejimleri için operasyon parametreleri.....	91
Tablo 4-3 Statik ve dinamik modellerden elde edilen sükroz ve kafein permeabilite değerleri (cm/s).....	119

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CAD	Bilgisayar Destekli Tasarım - Computer Aided Design
CFD	Hesaplama Akışkanlar Dinamiği - Computational Fluid Dynamics
BS	Bakteriyel Selüloz
TBS	Tübüler Bakteriyel Selüloz
HTBS	Hücreli Tübüler Bakteriyel Selüloz
GFM	Büyüme Faktörlü Besi Ortamı - Growth Factor Medium
FBS	Fötal Sığır Serum – Fetal Bovine Serum
BSA	Sığır Serum Albümini – Bovine Serum Albumin
TEC	Doku Mühendisliği Ürünü – Tissue Engineered Construct
ECM	Hücre Dışı Matris – Extra Cellular Matrix
FA	Fokal Adezyon
AJ	Adherens Bağlantı Proteinleri – Adherens Junction
TJ	Sıkı Bağlantı Proteinleri – Tight Junction
TEER	Trans Endotelyal Elektrik Direnci – Trans Endothelial Electrical Resistance

SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu – Scanning Electron Microscope
UPW	Ultra Saf Su – Ultra Pure Water
WSS	Duvar Kayma Gerilimi – Wall Shear Stress
PBS	Fosfat Tamponlu Salin – Phosphate Buffered Saline
TrisBS	Tris Tamponlu Salin – Tris Buffered Saline
PFA	Paraformaldehit
CNC	Bilgisayarlı Nümerik Kontrol – Computed Numerical Control
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Polymerase Chain Reaction
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Quantitative Polymerase Chain Reaction
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – High Performance Liquid Chromatography
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit – Complementary Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribo Nükleik Asit
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri – Reactive Oxygen Species
NO	Nitrik Oksit
MDA	Malondialdehit

BHT	Bütil hidroksitolüen
DAD	Diyot Dizi Dedektörü
ACN	Asetonitril



1. GİRİŞ

Günümüzde damar benzeri bariyer modelleri, hastalıkların tedavi denemeleri, ilaç hedefleme ve ilaç geliştirme çalışmaları gibi birçok farklı alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Statik modeller olarak adlandırılan bu yapıların, vücut içerisinde gerçekleşen yanıtlara yakın sonuç vermesi dar bir pencereden mümkün olmakla birlikte, fizyolojik değişimlere karşı vücut içinde gerçekleşen yanıtların bu modellerde denenmesi mümkün olamamaktadır.

Gerçekçi bir atardamar modeli oluştururken damar içi yapıların doğru taklit edilmesi, tedavilerin öncül denemelerinde doğru sonuçların elde edilebilmesi için oldukça kritiktir. Bu ihtiyaçtan yola çıkılan bu tez çalışması kapsamında, hücrelerden, *in vitro* olarak vücut içerisindeki benzer yanıtlar elde edebilmek için doku mühendisliği yaklaşımlarına başvurulmuştur.

Fonksiyonel doku veya organların *in vitro* olarak elde edilebilmesi için, canlı hücreler ve dokular, diğer hücreler ve hücre dışı matris (ECM) aracılığıyla fizyolojik koşullarda kimyasal uyanlarla birlikte çeşitli fiziksel uyanlara maruz kaldıklarından, doku ve organların yerel mikro ortamları taklit edilmelidir (Bayir et al., 2020). Doku mühendisliği çalışmalarının nihai amacı, hücreler, biyomalzemeler ve sinyal faktörlerinin kombinasyonunu kullanarak tamamen işlevsel üç boyutlu (3B) yapay doku ve organlar oluşturmaktır (Kim et al., 2008; O'Brien, 2011). Bu sinyal faktörleri arasında elektromanyetik ortam, mekanik uyanlar ve sıcaklık gibi fiziksel olanların yanı sıra, serum proteinleri, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi biyokimyasal olanlar, O₂ gerilimi, pH ve CO₂ konsantrasyonu gibi fizikokimyasal faktörler de bulunmaktadır. Hücrelere iletilen sinyallerin tetiklediği biyokimyasal faaliyetler, çeşitli yollar yoluyla; morfogenez, proliferasyon, göç, farklılaşma, matris üretimi ve genel olarak protein ekspresyonu gibi hücre davranışının kritik yönlerini kontrol eder (Altman et al., 2002; Burdick & Vunjak-Novakovic, 2009; Dupont et al., 2011).

Doku mühendisliği laboratuvar ortamında işlevsel, implante edilebilecek dokular üretmek amacıyla ortaya atılmış bir terim olsa da, doku mühendisliğine kısa vadede atfedilen rol, çeşitli hastalıkların hücresel mekanizmalarının yanı sıra belirli

parametrelerin (stres faktörleri veya çevresel değişkenler gibi) hastalıkların ilerlemesi üzerindeki etkilerini daha da iyi anlamayı sağlayabilecek *in vitro* hastalık modellerinin üretilmesidir (Benam et al., 2015; Griffith & Swartz, 2006; Maltman & Przyborski, 2010). Bu modeller, yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek, yüksek verimli klinik öncesi ilaç taraması yapmak ve tedavi seçeneklerini hassas tıp yaklaşımı ile kişiselleştirmek için son derece kullanışlıdır (Katt et al., 2016; Skardal et al., 2016). Bu *in vitro* hastalık modelleri, 3R: yerine koyma (replacement), azaltma (reduction), iyileştirme (refinement) prensibi dikkate alınarak hayvan testlerini azaltma amacına da hizmet eder (de Vries et al., 2015; Russell & Burch, 1960).

Doku mühendisliği prensipleriyle gerçekçi bir *in vitro* model oluşturulabilmesi için taklit edilmek istenen hedef dokunun fizyolojik ortamında maruz kaldığı dış ve iç etkilerin iyi bilinmesi ve uygulanacak biyosinyallerin buna göre seçilmesi gerekmektedir. Damar çeperleri, kalp kasılması ile birlikte tüm vasküler ağa yayılan pulsatif kan akışı nedeniyle pek çok farklı kimyasal ve mekanik sinyale maruz kalır. Damar duvarı içinde bulunan endotel hücreleri üzerinde en önemli mekanik etkilerin kayma gerilimi (shear stress) ve dairesel germe (circumferential stress) olduğu bilinmektedir (Davies et al., 2005). Arter ve venlerde, damar çevresinde bulunan düz kas hücrelerinin pulsatif akışı sağlamak için yaptığı kasılıp gevşeme hareketi de endotel hücreler için bir mekanik sinyaldir. Endotel hücreler, tüm bu sinyalleri algılamaya olanak veren mekanoreseptörlere sahiptir. Bu yapılar sayesinde endotel hücreler mekanik uyarıyı algıladıktan sonra pek çok sinyal yolağını aktive eder ve ilgili gen ve proteinlerin ekspresyonunu sağlar (Uzarski et al., 2013). Böylece uyarana adapte olabilmek için yeniden yapılanmaya giderek hem morfolojik hem yapısal hem de fizyolojik tepki gösterirler. Hızlı sonuç alabilmek ve sürdürülebilirlik açısından mevcutta kullanılan *in vitro* modellerin çeşitli avantajları bulunsa da bu modeller makro ve mikro çevre kontrolündeki eksikleri nedeniyle vücut içi damar yapılarının fizyolojik özelliklerini tam anlamıyla taklit edememektedirler. Doku mühendisliği yaklaşımı ile oluşturulan dinamik modellerle; bu mekanik sinyallerin, doğru biyomalzemeler üzerindeki hücreler ile bir araya getirilmesi mümkün olabilmektedir.

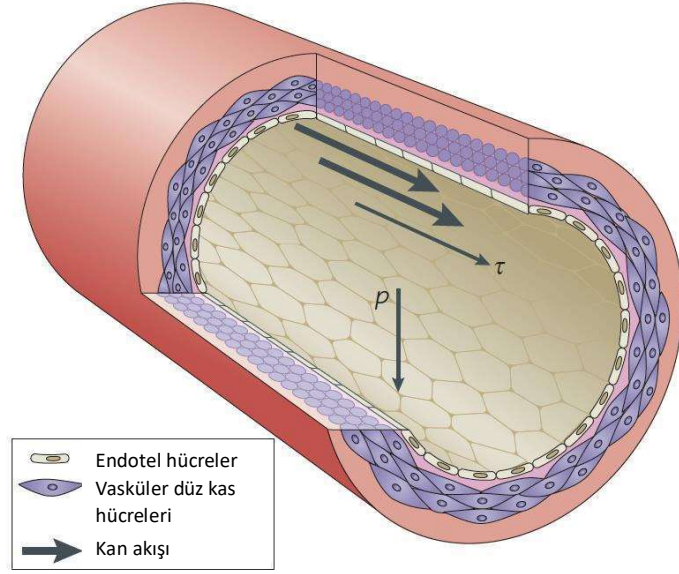
Literatürde bulunan az sayıdaki çalışmalarda, kültür koşullarına özel bir dikkat gösterilmeksizin karıştırmalı biyoreaktörler ve silindir kültür şişeleri (roller bottles) dinamik kültürlerin elde edilmesi için kullanmıştır. Dinamik kültürleri elde etmek için kullanılabilecek biyoreaktörler basitçe bir organizmayı yetiştirmek ve/veya biyolojik bir reaksiyonu gerçekleştirmek için biyolojik olarak aktif koşulları koruyan bir cihaz veya sistem olarak tanımlanır (Wendt et al., 2008). Bu yaklaşım, fermantasyon gibi klasik endüstriyel prosesler için biyoreaktörlerin ilk üretim amacından esinlenmiştir. Doku mühendisliği biyoreaktörleri laboratuvarında oluşturulan doku mühendisliği ürünlerine (TEC), uygun kütle taşınımı ve kültür ortamı içeriği, sıcaklık, oksijen, pH ve mekanik sinyaller gibi birçok önemli değişkenin sıkı kontrolünün sağlandığı bir ortam sunarken, bu ürünleri büyük ölçekli, fonksiyonel ve finansal olarak makul dokulara ve organlara çevirmenin anahtarıdır (Bayir et al., 2020). Doğru koşullarda bir araya getirilen hücreler ve biyosinyaller; hücre canlılığı, proliferasyonu, göçü ve farklılaşması için, vücuttaki yapıların iyi taklit edilmesini sağlayacaktır. Hedef dokuya özgü bir ortam elde etmek için biyoreaktörün büyük bir kontrol seviyesi sağladığı çeşitli mekanik kuvvetler kullanılarak, hücrel mekanotransdüksiyon incelenebilir (Chen & Hu, 2006; Plunkett & O'Brien, 2011). Hidrodinamik ve mekanik yükler gibi kültür koşullarının optimizasyonu için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen biyoreaktör ile kontrollü fiziksel çevrenin sağlanarak endotel hücrelerin farklı sıvı akış rejimlerine verdikleri yanıtlar incelenmiş, geliştirilen *in vitro* damar modelinden vücut içerisindeki benzer yanıtlar alınması ve hipertansiyon hastalığının yarattığı fiziksel değişimlerin, damar üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu sayede hastalığın daha iyi anlaşılması ve gelecekteki ilaç geçiş denemelerinde, gerçekçi bir model üzerinde geçirgenlik performansının denenebilmesine olanak sağlanmıştır. Bu çalışma ile doku mühendisliği yaklaşımlarının biyoreaktör uygulamaları sayesinde klinik uygulamalar öncesinde, 3R prensibi ile tekniğin/ilâç adayının gerçekçi değerlendirilmesi ve başarısız denemelerin ara basamakta elenerek olası *in vivo* denemelerde sakrifiye edilecek hayvan sayısının azaltılması yolunda önemli bir adım atılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Vücut içerisindeki dokulara etki eden mekanik uyaranların, hücre yüzeyindeki mekanoreseptörler tarafından algılanarak çeşitli sinyal yollarını aktive etmesi ve bu yollarla hücresel yanıtların oluşturulmasına mekanotransdüksiyon adı verilir. Vücut içerisindeki benzer yanıtların elde edilmek istendiği bir damar modeli geliştirirken, hücresel yanıtların tam olarak anlaşılabilmesi ve ortaya konulan doku benzeri yapının vücuttakine benzer uyaranlara maruz bırakılması gereklidir. Kalbin kasılmasıyla birlikte, damar yüzeyine etki eden kayma gerilimi (shear stress) ve dairesel germenin (circumferential stress) damar içerisindeki endotel hücrelerin davranışlarını doğrudan etkileyen mekanik sinyaller olduğu bilinmektedir (Davies et al., 2005).

Duvar kayma gerilimi (WSS) bir sıvının yüzey üzerinden akarken birim alan başına uyguladığı sürtünme kuvvetidir. Bu kuvvet yüzeye paraleldir; sıvının viskozitesi ve hızı ile doğru, kabın yarıçapı ile ters orantılıdır (Hahn & Schwartz, 2009) (Şekil 2.1). Damar içerisinde endotel hücreler üzerinde oluşan kayma gerilimi kan akışından kaynaklanır ve damar çeperine paralel olarak kan akışı yönünde hücrelerin apikal yüzeylerine sürtünme kuvveti ile etki eden teğetsel kuvvettir (Ballermann et al., 1998; Resnick et al., 2003). Vasküler endotel hücreler fizyolojik olarak 3 – 20 dyn/cm² arasında kayma gerilimine maruz kalırlar (Booth et al., 2014). Kayma gerilimi, morfoloji, sitoskelet organizasyonu, membran mekanik özellikleri, hücre içi sinyaller, endositoz, hücre döngüsü, iyon kanalları, mRNA ve protein sentezi aktivasyonu ile hücre içi Ca⁺² taşınmasında etkilidir.



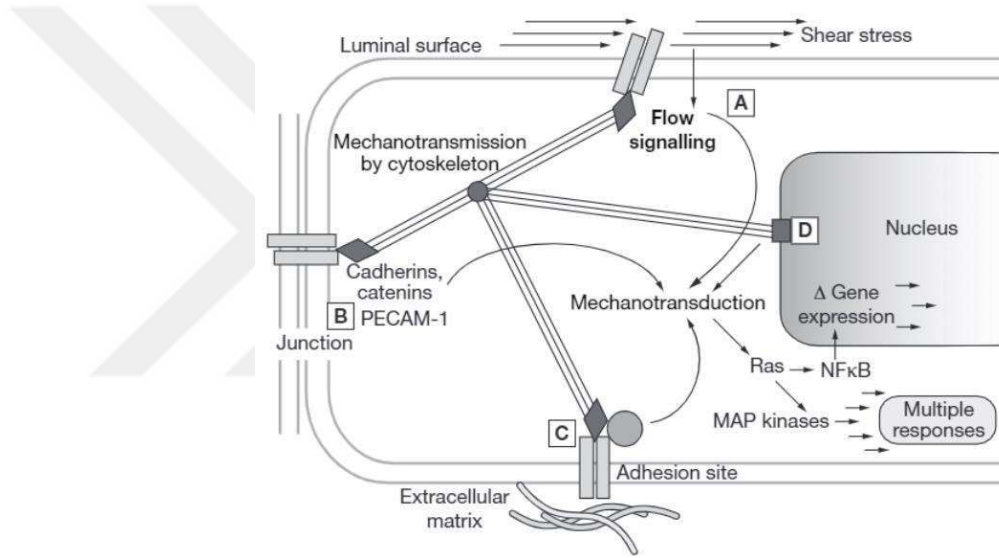
Şekil 2.1 Damar duvarında hücelere etki eden mekanik kuvvetler: τ : kayma gerilmesi, p :daireysel germe (Hahn & Schwartz, 2009).

Sıvı akışını yönlendiren kan basıncı hem damar duvarındaki endotel hücrelerde hem de arterlerde daireysel germeye neden olur. Kan damarlarındaki hidrolik basınç (alan başına uygulanan dik kuvvet) kalbin pompalama hareketinden kaynaklanır. Kan basıncı aortta en yüksek değerindedir ve kan küçük arterlere, kılcallara ve venlere doğru hareket ettikçe kan basıncı düşer. Hidrostatik basınç tek başına hücre fizyolojisini değiştirebilir; ancak daireysel germe ve kayma gerilimi kadar hücreler üzerinde etkili değildir (Hahn & Schwartz, 2009). Kan basıncı sonucu meydana gelen ve damar çeperine dik olan kuvvete ise daireysel germe adı verilir (White & Frangos, 2007). Kayma gerilimi sadece endotel hücreler üzerinde etkili olurken, daireysel germe çevre hücrelerde de etki göstermektedir. Hücre yapısına, büyümesine, yönelimine, tamir mekanizmasına, sitoskelet yapısına ve fonksiyonuna etki eden bu mekanik kuvvetlere karşı verilen hücresel tepkiler, damar bütünlüğünü korumak veya kan akışını kontrol etmek amacıyla hemostatik geri bildirim mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Fisher et al., 2001; Jalali et al., 2001). Mekanik germe, normal kabul edilen değerler altında (%5 – 10) hücre proliferasyonu, anjiyogenez, vasküler tonusun düzenlenmesi gibi fizyolojik olaylarla vasküler bütünlüğün sağlanmasında olumlu etkiler gösterirken, hipertansiyonun sebep olduğu yüksek germe değerleri (>%20) hücre fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere yol açmaktadır (Anwar et al., 2012; Jufri et al., 2015).

Mekanik kuvvetler mekanotransdüksiyon denilen sistem ile genellikle proteinlerin konformasyonel değişimi vasıtasıyla biyokimyasal sinyallere çevrilir (Charbonier et al., 2019). Bu sistem sürekli mekanik stres altında olan kemik, kas, kıkırdak, kan damarı gibi dokuların bütünlüğünün devamlılığında önemlidir. Hücresel düzeyde mekanotransdüksiyon, protein sentezi, adhezyon, proliferasyon, farklılaşma, hücre canlılığı ve apoptoz gibi pek çok mekanizma üzerinde etkilidir (Cunningham & Gotlieb, 2005; Takahashi et al., 1997). Hücresel mekanotransdüksiyon defektleri pek çok hastalığa sebep olabilir ve bu hastalıkların ortak noktası hücre – hücre bağlantılarının veya sitoskelet ile hücre dışı matriks (ECM) arasındaki kuvvet iletiminin bozulmasıdır. Hücreler arası sıkı bağlantıların bozulmasıyla örneğin, kanda bulunan istenmeyen moleküller çevre dokulara sızabilir ve bu sebeple inme, pulmoner ödem gibi çeşitli hastalıklar ortaya çıkabilir (Gulino-Debrac, 2013). Mekanotransdüksiyon adı verilen bu biyokimyasal olaylar zincirinde hücrelerin mekanik uyarılarına membran reseptör kinazlar, integrinler, G proteinleri, Ca^{+2} 'nin hücreye girişinin değişmesi ile tepki veren ve germe ile aktifleşen iyon kanalları, hücre içi bağlantı proteinleri, membran lipidleri ve sitoskelet mekanosensörleri ile algıladıkları bilinmektedir (Jufri et al., 2015). Bu yapılar dışında glikokaliksin de mekanosensör olarak rol aldığı belirtilmektedir. Glikokaliks endotel hücrelerin apikal yüzeyinde bulunan, proteinler, glikolipidler, glikoproteinler ve proteoglikanlar gibi pek çok transmembran makromoleküllerden oluşan bir tabakadır. Kan pıhtılaşmasında, inflamatuvar tepkilerde ve kan akışının düzenlenmesinde çok önemli görevleri vardır (A. R. Pries et al., 2000).

Mekanik uyarılar endotel hücrelerin apikal yüzeylerinden diğer hücrelere veya ECM'ye tutundukları yüzeylere sitoskelet ile iletilir. Bu sebeple fokal adezyonlar (FA), sıkı bağlantılar (TJ) ve adherens bağlantılar (AJ) mekanotransdüksiyon ile doğrudan ilişkilidir. FA'larda integrinler, TJ'lerde okludin ve AJ'lerde VE-kaderin, kan akışından kaynaklı mekanik uyarılarına algılayan mekanoreseptörler olarak kabul edilmektedir (Gulino-Debrac, 2013). FA'lar hücrenin ECM'ye tutunmasını sağlayan bağlardır. Integrinlerden oluşan büyük multiprotein kompleksleri ECM proteinleri ile etkileşime girer. Integrinler RGD gibi spesifik domainlerden ECM ligandlarına bağlanan transmembran proteinleri ve ECM'nin hücrenin aktomyozin sitoskeleti arasındaki iletişimini sağlamak amacıyla uygulanan kuvvetleri algılayan mekanoreseptörlerdir. Tüm bu

mekanoreseptörler uyarıldığında sinyal yolları aktive olur ve sitoskelet yapısı doğrudan etkilenir. Damar içindeki laminar kan akışı Rho GTPase yolağını aktive eder ve aktin fiberler akış yönü boyunca uzayarak hücrelerin akış yönüne paralel dizilmesi sağlanır (Gulino-Debrac, 2013). Aktin fiberlerin konformasyonel değişimi hem hücre – hücre hem de hücre – ECM etkileşimini değiştirir. Düzenli bir akış rejimi gergin bir sitoskelet yapısı sağlayarak hücre – hücre etkileşimini artırır. Düzensiz bir akış rejimi ise organize olmayan bir sitoskelet yapısına ve AJ'lerin dağılmasına neden olur. Laminar olmayan kayma gerilimi ayrıca, hücrede DNA sentezini uyarır ve nitrik oksit seviyesini değiştirir. Pulsatif akış hücre içi Ca^{+2} miktarını azaltırken laminar akış artırır (Hillsley & Tarbell, 2002).



Şekil 2.2 Damar içi akışla oluşan kayma geriliminin, endotel hücrelerdeki mekanotransdüksiyonu (Davies, 2009).

Hemodinamik kayma gerilimindeki değişimler plazma ve hücrelerin luminal yüzeyi arasında karmaşık bir kuvvet ortamı oluşturur. Endotel hücreler akışa maruz kaldığında, ilk dakika içerisinde hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu aniden düşer (Shen et al., 1992). Aynı anda tüm hücrenin ve çekirdeğinin boyutları yaklaşık 1 μm azalır (Stamatas & McIntire, 2001). Hücre çekirdek boyutlarının azalması hücre metabolizması ve büyüme hızının değiştirilmesi için akışa karşı verilen bir tepki iken, hücre boyutlarının azalması luminal yüzeydeki kayma gerilimi gradientini düşürmek amacıyla verilen bir tepkidir. İlk bir saat içerisinde, statik koşullarda endotel hücre yüzeyinde bulunan karakteristik mikrovillus yapıları kaybolarak

hücre yüzeyi pürüzsüzleşir (Seebach et al., 2000). Endotel hücre hareketliliği yaklaşık %50 oranında azalır ve aktin filametleri yeniden düzenlenmeye gider. Hücrelerin akışa uzun süreli verdiği tepkiler ise daha farklıdır. Akışın dördüncü saatinde FA'lar yeniden düzenlenir ve hücre-hücre arasındaki bağlar yeniden yapılır (Thi et al., 2004). Bazal kısımda bulunan yoğun periferel F-aktin stres fiber demetleri akış uygulamasından kısa süre sonra çözülür ve birkaç saat sonra apikal membranın altında hücre aksisi boyunca yapılacak şekilde tekrar oluşur (Barbee et al., 1995). Bu yapısal değişim hücrelere uygulanan maksimum kayma gerilimi etkilerini azaltır. Bir gün sonra ise endotel hücreler monolayer tabakası olarak akış yönünde dizilir. Kayma gerilimine maruz kalan endotel hücreler klasik poligonal şekillerini değiştirerek içi morfolojiye geçerler (Chistiakov et al., 2016; Yao et al., 2007).

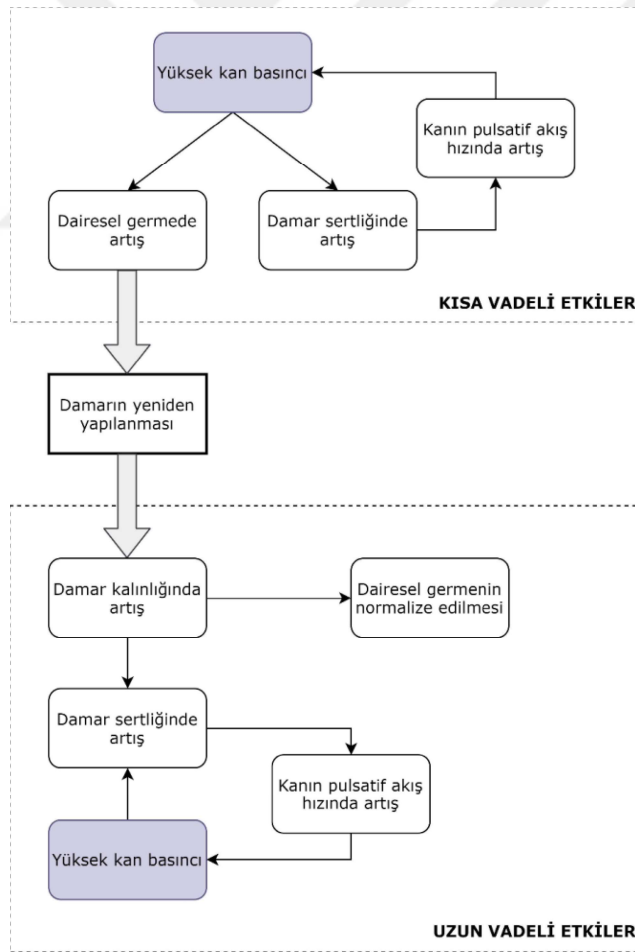
Hücre iskeleti, yüzeyden gelen gerilim değişiklik sinyallerinin hücre boyunca iletilmesinde merkezi bir role sahiptir. Bu iletimlerin gerçekleşmesinin dört farklı yolak üzerinden ilerlediği düşünülmektedir (Hoskins, 2017). Direkt sinyalleşme (Şekil 2.2 – A), muhtemelen glikokaliks yoluyla lümen yüzeyinin deformasyonu yoluyla gerçekleşebilir. Örnekler arasında potasyum (K), sodyum (Na) ve kalsiyum (Ca) iyon kanallarının lokalize aktivasyonu, kalsiyum sinyaline yol açan fosfolipaz aktivitesi, G-protein aktivasyonu ve hücre membranındaki kaviterin değişimlerinden kaynaklı sinyalleşme yer alır. Mekanotransdüksiyon aynı zamanda, bağlantı proteinlerinden gelen sinyaller yoluyla da aktive edilir (Şekil 2.2 – B); kuvvetlerin, kortikal ve/veya filament yapısındaki hücre iskeleti yoluyla hücreler arası bağlantı protein komplekslerine iletimi olarak özetlenebilir. Lümen yüzeyinde (Şekil 2.2 – A) veya bağlantı yakınında (Şekil 2.2 – B) bulunan VEGFR2, Akt'yi ve bu konumdaki birincil zar geçiş proteinini (PECAM-1) fosforile etmek için VE-kaderin, β -katenin ve fosfatidilinozitol 3 kinazlarla birleşebilir. Hücre iskeleti kuvvetleri ayrıca adhezyon bölgelerine de iletilir (Şekil 2.2 – C). Hücre dışı matrise bağlı transmembran integrinler deformasyon için bir odak görevi görür. Bu deformasyon, fokal adezyonları (FA) fosforile eden MAP kinazların integrine bağımlı aktivasyonuna yol açan, FA kinazın otofosforilasyonu ile sonuçlanır. Böylece birden çok hedef genin promotorlerinin bağlandıkları çekirdeğe translokasyonu sağlanır. Üçüncü bir integrin aracılı yolak, aktin oluşumunu ve mekanik uyarıların iletimini derinden etkileyen RAS

proteinlerinin aktivasyonunu içerir. Çekirdek zarındaki laminler yoluyla mekanik olarak indüklenen sinyalleşme ile çekirdek deformasyonu ile sonuçlanma ihtimali yüksek olan diğer yolak (Şekil 2.2 – D), gen regülasyonu ile ilgili makromoleküler konformasyon değişikliklerini de içerir. Bu yolakların birbirlerini tetiklediği ve işletim mekanizmalarının muhtemelen birbirleriyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Davies, 2009).

Dinamik bir atardamar modelinin gerekliliğini kavramak için damar içi akışın hücre dışı matrise olan etkisini de iyi anlamak gerekir. Damar yapısının esnekliğini sağlayan elastin proteinleri stabil bir destek yapısı oluşturan kollajen ile sarılıdır. Hücrelerin kanın pulsatif akışı altında çap artışı olarak %10'a kadar esneyen, ancak stabil bir çerçeve içerisinde kalmasını sağlayan bu yapı, hücrelerin maruz kaldığı dairesel germeyi minimize eder. Elastin 50 yıl gibi uzun bir yarılanma ömrüne sahip stabil bir proteinken, damar içi ve dışını saran kollajen yapıların yarı ömrü 2 haftadır. Kardiyak döngü içerisinde devamlı olarak kollajen yapımı ve yıkımı gerçekleşir (Bagchi et al., 2019; Hoskins & Hose, 2017). Özellikle hipertansiyon gibi hastalıklar, yüksek dairesel gerilme ve kayma gerilimi yaratır. Bu yüksek gerilmeler endotel hücreleri arasındaki bağların kopmasına ve yara dokusunun oluşarak damar içinde oluşan bu mikro çatlakların bağ doku hücreleri tarafından doldurulmasına yol açar. Bu yeni oluşan yapılar kollajen temelli olup elastin içermediklerinden damar esnekliğinin geri döndürülemez şekilde kaybolmasına, yara dokusu üzerinde biriken plaklarla skleroz oluşumuna neden olur (Rüfenacht et al., 2004) Orijinal dokusu bozulan damarda akış rejimi bozulur ve basınç farklılıkları meydana gelerek damar çeperine olan kuvvetlerde artış görülür. Hipertansiyonun, özellikle bu kuvvetlere direkt maruz kalan endotel hücrelerinde oluşan stres sonucu Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) oluşması ve enflamasyon kaynaklı yapısal deformasyonların sıkı bağlantı proteinlerinin yıkımı ile damar bütünlüğünün zedelemesine yol açtığı bilinmektedir (Kaisar et al., 2017; Pires et al., 2013). Bütünlüğü bozularak heterojen bir yapıya geçen damarların mukavemet zayıflığı görülen bölgelerinde, artan bu kuvvetler nedeniyle anevrizmalar oluşarak iç kanama meydana gelebilir (Rüfenacht et al., 2004). *In vitro* damar modelleri geliştirilirken katmanlar arasındaki bu mekanik farklar genellikle göz ardı edilerek damar homojen bir tüpmüş gibi düşünülür (Hoskins & Hose, 2017) Akışın hücreler ve yapımında/yıkımında rol aldıkları değişken ECM yapıları ile gösterecekleri

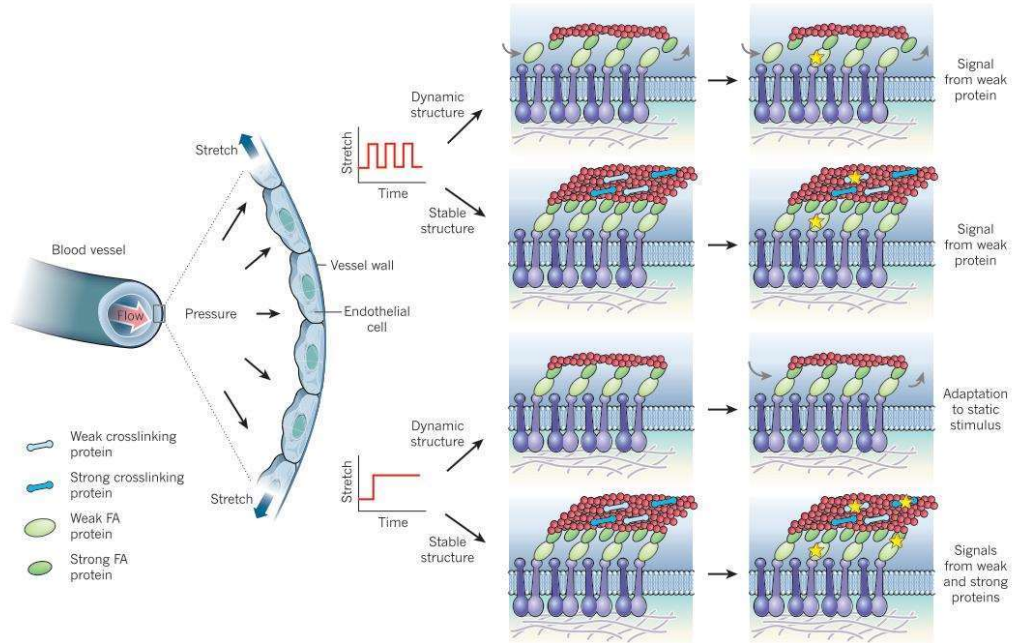
etkileşimler ancak mikroçevrenin kontrolü ve vücutta olduğu gibi farklı hücrelerin modellerde yer alması ile gözlemlenebilir.

Hipertansiyonla birlikte oluşan yeni kardiyak döngüde, damar yapısının sertliği yaklaşık %15 artar. Bu sertleşme ile birlikte, kan basıncının artışına bağlı olarak kanın pulsatif akış hızında artış görülür. Kan basıncı artışı uzun vadede devam ederse, damar dairesel germe etkilerini normalleştirmek için yeniden yapılanmaya gidecektir. Ancak bu yapılanma, sertlikte, kanın pulsatif akış hızında ve kan basıncında uzun vadeli artışa yol açacak olan duvar kalınlaşması yoluyla elde edilir. Bu durum dışarıdan bir müdahale olmadığı sürece kendini tekrarlayan bir yolağı tetikler. İlaç, egzersiz veya psikolojik strese azalma yoluyla kan basıncında orta vadeli bir düşüş, süreci tersine çevirmede yardımcı olacaktır (Hoskins & Wilkinson, 2017). Bu süreçler Şekil 2.3'te özetlenmiştir.



Şekil 2.3 Kan basıncındaki artışla birlikte damarda meydana gelen kısa ve uzun vadeli değişimler (Hoskins & Wilkinson, 2017 'den adapte edilmiştir).

Kan damarı duvarlarını çevreleyen endotel hücreleri hem döngüsel gerilmeye (Şekil 2.4 – üst) hem de statik gerilmeye (Şekil 2.4 – alt) maruz kalır. Sinyal şiddeti dengelendiğinde bile, dinamik olarak farklı mekanik uyarılar, proteinlerin gücüne (özellikle konformasyonel değişikliklere karşı direnç) ve yük taşıyan yapıların dinamik doğasına dayalı olarak ortak veya benzersiz sinyal yollarını etkinleştirebilir. Yeni oluşan adezyonlar gibi dinamik yapılarda ve olgun adezyonlar ve gerilme lifleri gibi kararlı yapılarda dairesel germe, güçlü proteinlerde konformasyonel değişiklikleri indüklemek için yeterli süre boyunca kuvvet uygulamaz; ancak zayıf proteinlerden sinyal oluşumu gerçekleştirecektir (Şekil 2.4 – sarı yıldız). Statik gerilmeye dinamik yapılar kolaylıkla adapte olabilir. Stabil yapılarda, uzun süreli kuvvet uygulaması hem zayıf hem de güçlü proteinlerde konformasyonel değişikliklere neden olur. Bu nedenle, dairesel germe tarafından etkinleştirilen sinyal yolları, muhtemelen yalnızca dinamik yapılara lokalize olan zayıf proteinler tarafından indüklenir. Statik gerilme ile seçici olarak etkinleştirilen yollar, muhtemelen kararlı yapılarda güçlü proteinler olan mekanosensörler aracılığıyla gerçekleşir. Her iki mekanosinyal türü tarafından etkinleştirilen yollar, muhtemelen hem dinamik hem de kararlı yapılarda lokalize olan zayıf proteinleri içerir (Hoffman et al., 2011).



Şekil 2.4 Damar içindeki dairesel germe etkileri (Hoffman et al., 2011).

Sistolik ve diyastolik kan basıncının normal değerler üzerine çıkması kalp-damar hastalıklarının riskini oldukça artırmaktadır ve kan basıncının normal değerler arasında kontrol altında tutulması özellikle inme ve akut koroner sendrom riskini azaltmaktadır (Cengiz et al., 2015). Hipertansiyon küresel anlamda halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir; ABD yetişkinlerinin üçte birini inme, kalp krizi ve kronik böbrek hastalığı gibi hastalıkların temel sebebi olarak etkilemektedir.

Hipertansiyon, yüksek basınçla akan kanın damar çeperini genişleterek sebep olduğu dairesel germe ile endotel hücreler üzerinde stres faktörü oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü 140/90 mmHg'nin üzerindeki kan basıncını hipertansiyon olarak adlandırmaktadır; ancak bu değerler bireylere ve yaşa göre değişiklik gösterebilmektedir. Hipertansiyonun damar yapısı üzerindeki etkisinin incelendiği *in vivo* çalışmalar ile akut hipertansiyonun damar yapısını bozduğunu gösterilmiştir (Ito et al., 1980; Johansson et al., 1970; Mohammadi & Dehghani, 2014; Mueller & Heistad, 1980). Hipertansiyonun, damar yapısındaki sıkı bağlantıları bozarak kan dolaşımındaki zararlı moleküllerin dokulara geçmesine neden olduğu ve buna bağlı hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Akut hipertansiyona bağlı olarak vücudun antioksidan savunma sisteminin çökerek, dokularda reaktif oksijen türevlerinin (ROS) birikmesine neden olarak oksidatif strese yol açtığı öne sürülmüştür (Mohammadi & Dehghani, 2014). ROS ve nitrik oksit (NO) birikiminin peroksinitrit üretimine sebep olarak damar yapısının bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir (Tan et al., 2004).

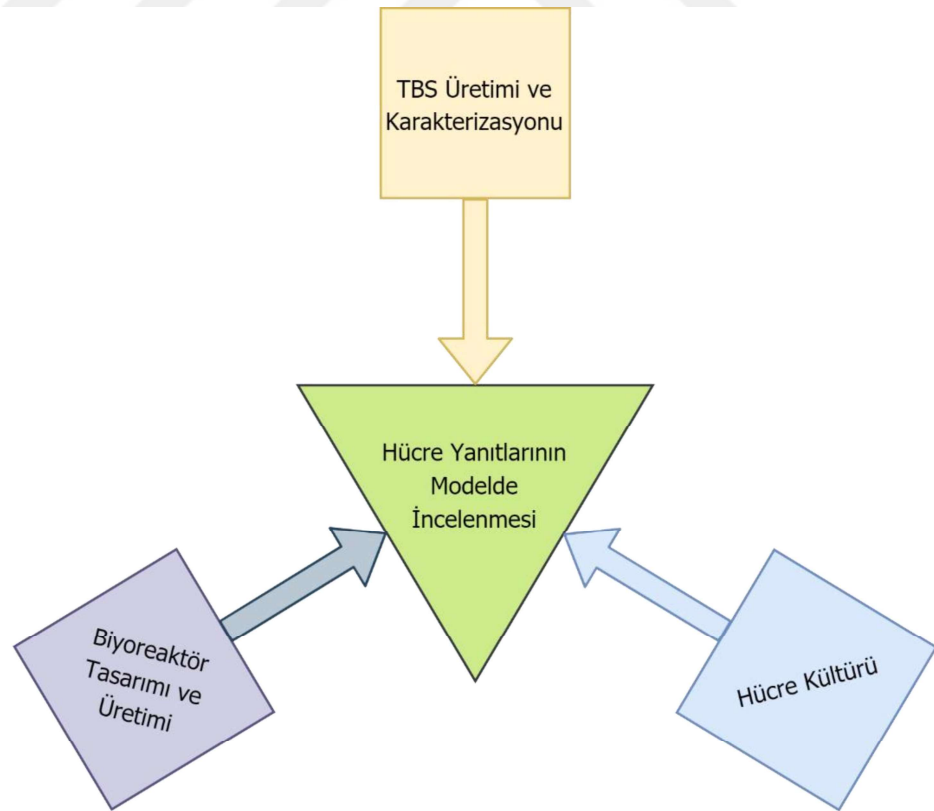
Bu etkilerin dikkate alınması gerçekçi bir *in vitro* damar modeli oluştururken ve damar modelinin etkinliğinin ispatlanması için oldukça önemlidir. Vücut içerisinde kan akışıyla birlikte doğal mekanizmalarla gerçekleşen bu etkilerin kontrollü bir şekilde laboratuvar ortamında sisteme uygulanması, mekanizması tam olarak ortaya konulamamış bazı yolların keşfedilmesi ve etkin bir *in vitro* model oluşturmak için muhtemel sistem adaptasyonlarının yapılabilmesi için kritiktir.

3. MATERYAL VE METOT

Doku mühendisliği prensipleri gözetilerek gerçekleştirilen bu tez çalışması boyunca;

- Modelin görevini yerine getirmesini sağlayan, damar içi fonksiyonların öncüsü endotel hücrelerinin kültürü,
- Hücrelerin vücut içi yapıya benzer bir mikro çevrede yer alabilmesi için seçilen doku iskelesinin (tübüler bakteriyel selüloz) üretimi,
- Biyosinyallerin kontrollü bir makro çevrede hücrelere iletilebilmesi için biyoreaktör tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir.

Böylece doku mühendisliğinin bu üç ana bileşeni (hücreler, biyomalzemeler ve biyosinyaller) bir araya getirilerek hücre yanıtlarının incelenmesi mümkün olmuştur. Tez çalışması boyunca gerçekleştirilen bu dört ana işlemi özetleyen etkileşim diyagramı Şekil 3.1’de gösterilmektedir:



Şekil 3.1 Tez etkileşim diyagramı.

3.1. Doku İskelesi Üretimi ve Karakterizasyonu

Doku mühendisliği yaklaşımında, hücrelerin organizma içindeki mikro çevrelerine en yakın ortamı sağlamak temel gerekliliklerdendir. Bu nedenle doğru doku iskelesinin seçilmesi oldukça önemlidir. Daha önceki çalışmalarda farklı hücreler üzerinde denemeleri gerçekleştirilen bakteriyel selüloz (BS) (Bayir et al., 2018; Bilgi et al., 2016) esnek ama sağlam ve hücrelerin tutunup çoğalmasına yardımcı olan fibröz yapısı nedeniyle (Bayir et al., 2019) bu çalışma için kullanılacak doku iskelesi olarak seçilmiştir. Daha önceki çalışmalarda tabaka halinde üretimi ve denemeleri gerçekleştirilen BS'nin damar içi yapıları doğru modelleyebilmek için tübüler olarak üretilmesi sağlanmıştır.

3.1.1. TBS üretimi

Tübüler bakteriyel selüloz (TBS) üretiminde kullanılan *Glucanoacetobacter xylinus* (ATCC 700178, VA, ABD) suşunun üremesi için Hestrin&Shramm (HS) besi ortamı kullanılmıştır;

- 20 g Glukoz (102415, Merck Millipore, Almanya),
- 2.7 g Na₂HPO₄.2H₂O (106580, Merck Millipore, Almanya),
- 1.15 g sitrik asit (100243, Merck Millipore, Almanya),
- 5 g bakteriyolojik pepton (LP0037B, Oxoid, Thermo Fisher Scientific, ABD),
- 5 g maya özütü (MC001, Lab M, İngiltere)

Bileşenler 1 litre distile su içerisinde çözdürüldükten sonra asidite kontrolü yapılmış (pH 5 – 6), otoklavda/buharlı sterilizatörde (Hirayama, HG-50, Japonya) 121 °C'de 15 dk. boyunca steril edilmiştir.

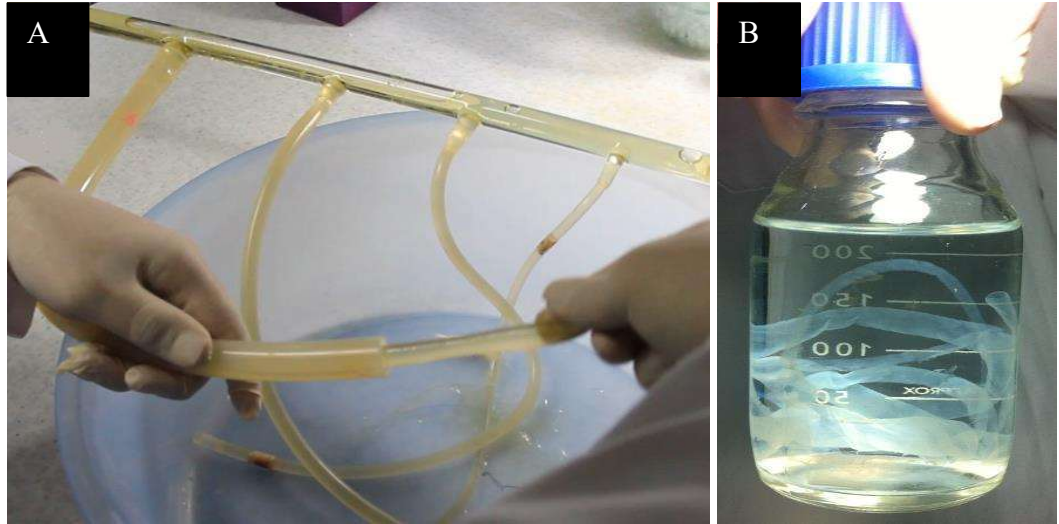
Steril HS besi ortamı içerisine, *Glucanoacetobacter xylinus* suşu -20 °C'de bulunan stoktan alınarak eklenmiş ve aktivasyonu için 2 gün boyunca, 30 °C'de 150 rpm hızda çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir.

Aktive edilen bakterilerin sıvı hava ara yüzeyinde selüloz oluşturduğu bilindiğinden (Bayir, 2018), tübüler yapının oluşturulabilmesi için taze hazırlanan

steril HS besi ortamı içerisinde %3 (v/v) oranında aktif kültür inokülümü yapılmış, 4 mm iç çapındaki hava geçirgen steril silikon hortumlar içerisinde eklenerek hortumun uçları plastik kelepçeler yardımı ile kapatılmıştır. 5 gün boyunca 30 °C’de statik koşullar altında inkübe edilerek bakterilerin hava geçirgen silikon hortumların iç çeperinde selüloz üretmesi ile TBS elde edilmiştir.

3.1.2. TBS’nin saflaştırılması

Üretimi gerçekleştirilen TBS’nin saflaştırılması ve doku iskelesi olarak kullanıma hazırlanabilmesi için; TBS’ler hortumların içerisinde çıkarıldıktan sonra (Şekil 3.2 – A), distile su ile yıkanarak 0.1 M NaOH (106462, Merck Millipore, Almanya) içerisinde 80 °C’de 1 gün bekletilmiştir. Uygulanan alkali işlem ile TBS’lerin üzerindeki bakterilerin ve bakteri kalıntılarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra, TBS’ler, yeni hazırlanan 0.1 M NaOH içerisinde 20 dakika kaynatılmıştır. Ardından NaOH uzaklaştırılarak, distile su ile 20 dakika boyunca kaynatma işlemlerine geçilmiştir. TBS’ler ağarana kadar distile su ile kaynatma işlemi tekrarlanmıştır. TBS’ler ağardığında, saflaştırma işlemi tamamlanmıştır. Son olarak, TBS’ler otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilerek doku iskelesi olarak kullanılmaya hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2 – B).



Şekil 3.2 Tübüler Bakteriyel Selüloz (TBS) üretimi (A) ve saflaştırılması (B).

3.1.3. TBS'nin modifikasyonu

Deneme sürecinde hücrelerin maruz kalacakları devamlı ve pulsatif akış etkisiyle TBS üzerinden süpürülmelerinin önüne geçmek için, TBS yüzeyinin modifiye edilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede hücrelerin yüzeye tutunma veriminin artacağı düşünülmüştür.

Yüzey modifikasyonu denemelerinde ilk olarak doğal polimerler olan ve hücre tutunmasını artırma çalışmalarında sıklıkla kullanılan jelatin (10478, Merck Millipore, Almanya) ve tip 1 kolajen (Santa Cruz Biotechnology, SC-136157) ile kaplama yapılmaya çalışılmıştır. Bunun yanı sıra iki farklı yöntem kullanılarak Glycidyltrimethylammonium Chloride (GTMAC, 50053, Sigma Aldrich, ABD) ile selüloz yüzeyi katyonikleştirilmeye çalışılarak hücre tutunmasının artırılması hedeflenmiştir (Courtenay et al., 2017; Zaman et al., 2012).

3.1.3.1. Jelatin ile yüzey kaplama

Toz haldeki jelatin ultra saf su içinde karıştırılarak %2'lik (w/v) jelatin çözeltisi oluşturulmuştur. Elde edilen çözelti otoklavda, 121 °C sıcaklıkta 15 dakika steril edilmiştir. TBS iskelenin endotel hücre ekimi yapılacak iç (luminal) yüzeyine 200 µL'lik jelatin çözeltisi eklenmiş ve bu şekilde bir gece 37° C inkübatörde kaplanmaya bırakılmıştır. Ertesi gün TBS yüzeyinden jelatin çekilip PBS ile yıkanarak TBS yüzeyi hücre ekimi için hazır hale getirilmiştir.

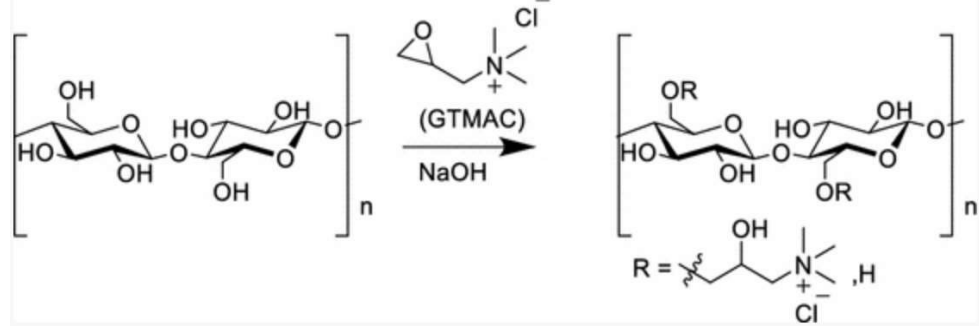
3.1.3.2. Kolajen ile yüzey kaplama

Kolajen miktarı 8 µg/cm² olacak şekilde, steril Tip 1 Kolajen solüsyonu TBS iskelenin luminal yüzeyine eklenmiş ve 4 °C'de bir gece bekletilerek TBS, kolajen ile kaplanmaya bırakılmıştır. Ertesi gün PBS ile yıkanarak TBS'nin hücre ekimine uygun hale gelmesi sağlanmıştır.

3.1.3.3. GTMAC ile yüzey modifikasyonu

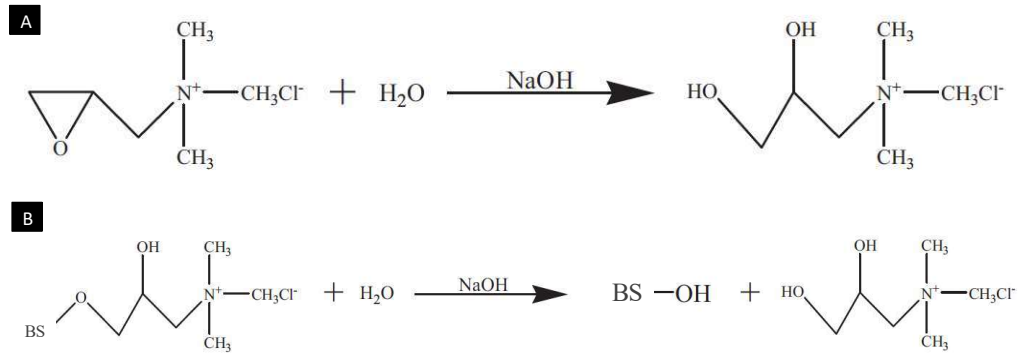
GTMAC ile toz halindeki nano-kristal selülozun eterifikasyon ile modifiye edildiği ve bu şekilde katyonikleşen selüloz yüzeyinde hücre tutunma veriminin artırıldığı bilinmektedir (Courtenay et al., 2017; Zaman et al., 2012).

Literatürdeki çalışmaların aksine, TBS ıslak bir tüp halinde olduğundan, literatürde tanımlanan modifikasyon protokolleri, tez çalışmasına göre uyarlanmıştır.



Şekil 3.3 Selülozun NaOH varlığında GTMAC ile modifikasyonu (Courtenay et al., 2017).

GTMAC ile katyonikleştirme işlemi, Şekil 3.3'te mekanizması gösterilen reaksiyona göre, BS'nin OH gruplarından Hidrojen koparılarak GTMAC içerisindeki radikal grubun (trimetil amonyum) bağlanması ile gerçekleştirilmiştir. Bu kimyasal modifikasyon işlemi sırasında ortamda H₂O miktarının fazla olması kompetitif reaksiyonların gerçekleşmesine neden olmaktadır (Zaman et al., 2012). Bu reaksiyonlar Şekil 3.4'te verildiği gibi sırasıyla GTMAC hidrolizi (Şekil 3.4 – A) ve katyonik BS degradasyonu (Şekil 3.4 – B) şeklinde gerçekleşebilmektedir.



Şekil 3.4 GTMAC ile BS modifikasyonu sırasında meydana gelen kompetitif reaksiyonlar. A: GTMAC hidrolizi, B: katyonik BS degradasyonu (Zaman et al., 2012).

Kompetitif reaksiyonların oluşmasını engellemek ve TBS'nin GTMAC ile etkili bir şekilde katyonikleştirilmesini sağlamak için ortamdaki su miktarını

uzaklaştırmak kritik öneme sahiptir. Bu nedenle modifikasyon hem liyofilize TBS hem de susuzlaştırılmış TBS üzerinde gerçekleştirilmiştir.

TBS'nin susuzlaştırılması için iki farklı yöntem denenmiştir. İlk olarak TBS, içerisinden kuru hava geçirilmek üzere peristaltik pompaya (YZ1515x, Longer Pump, İngiltere) bağlanmış, bu sayede kurutma işlemi sırasında tübüler yapının yapışarak, 3B geometrinin bozulmasının önüne geçilmiştir. TBS kurutma işlemi sırasında tartı üzerine alınmış, bu sayede ağırlık değişimi düzenli olarak takip edilebilmiştir. Literatürde raporlandığı üzere; reaksiyonun optimal gerçekleştiği bilinen %35 sululuk oranına ulaşıncaya kadar kurutma işlemine devam edilmiştir (Zaman et al., 2012).

İkinci bir susuzlaştırma şekli olarak DMSO ile suyun uzaklaştırılması denenmiş, TBS'nin sululuk oranı %65'e gelene kadar kuru hava ile içeriğindeki su uzaklaştırılmış ve kaybedilen su miktarının 2 katı kadar DMSO TBS'ye aktarılarak bir gece 4 °C'de bekletilmiştir (Courtenay et al., 2017).

Susuzlaştırma işleminin ardından liyofilize TBS, sadece susuzlaştırılmış TBS ve DMSO ile susuzlaştırılmış TBS için katyonikleştirme reaksiyonu başlatılmıştır. Bunun için ultra saf suda hazırlanan %5'lik (w/v) NaOH çözeltisinin asiditesi kontrol edilmiş, reaksiyon için 10-13 aralığında istenilen pH 11 olarak ölçülmüştür. Eterifikasyon işleminin maksimum verimle gerçekleşmesi adına, aktif üç -OH grubuna bağlanmak üzere GTMAC molekülü, molar olarak TBS'nin kuru ağırlığından 30 kat daha fazla olacak şekilde hesaplanarak, sisteme damla damla eklenmiştir (3 mL).

Hücreler tübüler yapının luminal yüzeyine tutunacağından, modifikasyonun TBS'nin iç yüzeyinde gerçekleştiğinden emin olmak adına; reaksiyon karışımı 65 °C'deki su banyosuna alınarak, yine peristaltik pompa yardımı ile TBS içerisinden geçirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 TBS'nin GTMAC ile modifikasyonu.

5 saat boyunca 10 rpm'lik akış ile reaksiyonun gerçekleşmesi beklenmiş, ardından reaksiyon sıvısı sistemden uzaklaştırılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için %95 saflıktaki etanol (EtOH) sisteme eklenmiş (70 mL) ve 10 dakika boyunca sirkülasyon sağlanmıştır. Ardından sistemdeki sıvı uzaklaştırılmış, taze etanol eklenerek bu yıkama işlemi 10'ar dakika süre ile toplam 3 kez tekrarlanmıştır.

Reaksiyon artıklarının uzaklaştırılması için sistem boşaltılarak ultra saf su (UPW) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş, bu işlem 2'şer dakikadan toplam 15 kez tekrarlanmıştır. Böylece TBS yüzeyi hücre ekimi için hazır hale getirilmiştir.

3.1.3.4. ATR-FTIR ile yüzey modifikasyon başarısının incelenmesi

Kontrol grubu, GTMAC molekülü ve modifiye edildiği düşünülen GTMAC-TBS gruplarının analize hazır hale gelmesi için TBS'ler kesilip açılarak bir gece kurumaya bırakılmış, tamamen susuzlaştırılmış ve analize hazırlanmıştır. Modifikasyonun başarısı Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki (Ege MATA), ATR-FTIR cihazı (Perkin Elmer Spectrum Two, ABD) tarafından sağlanan transmisyon spektrumları yardımı ile incelenmiştir.

3.2. Biyoreaktör Tasarımı ve Üretimi

İşlevli bir 3B atardamar modeli oluşturabilmek için; TBS'nin sabitlenerek iç kısmından, farklı basınçlarda besi ortamının sirkülasyonuna imkân verebilecek ve

bu sürekli akışla, hücre yüzey reseptörlerinin uyarılmasını sağlayabilecek bir biyoreaktör tasarlanmış ve üretilmiştir. Ön tasarımlar için benzer işlev gösteren piyasadaki mevcut biyoreaktörler incelenmiş (3DCulturePro™, TA Instruments, ABD) ve daha önceki çalışmalarda geliştirilen basit tasarımlar üzerinden yola çıkılmıştır (Şekil 3.6) (Bayir, 2018).

Tasarımların istenilen işlevleri yerine getirdiğinden emin olmak adına, bilgisayar destekli modelleme (CAD) ile oluşturulan biyoreaktör parçaları ve TBS, hesaplamalı akışkanlar dinamiği (CFD) ile *in silico* olarak denenmiştir. Nihai model bu denemelerin ardından ortaya çıkarılmış ve üretilmiştir.

3.2.1. Malzeme seçimi

Biyoreaktörde kullanılacak parçaların tasarım ve modellemesi tamamlandıktan sonra; steril edilebilirlik, paslanmazlık ve biyouyumluluk kriterlerine göre malzemeler seçilmiştir.

Gövde malzemesi olarak sistemi gözlemlemeyi kolaylaştırabilmek adına şeffaf malzemelerin kullanılmasına karar verilmiş, borosilikatlı cam ve polimetil-2-metilpropenoat (pleksiglas) tüpler, farklı uzunluklarda TBS parçalarının takılabilmesi için istenilen uzunluklarda kestirilmiştir (5 cm, 7 cm, 10 cm). Gövde parçaları 121 °C’de 15 dk. steril edilerek malzeme deformasyonu gözlenmiştir.

Biyoreaktör gövde konnektörü, konnektör tüneli, bağlantı rakoru ve manşon için 316L çelik malzeme kullanılmış, korozyon direncine ASTM F1089 uyarınca bakır sülfat testi ile bakılmıştır. Bu test için kullanılan metot, **3.2.1.1 Bakır sülfat testi ile korozyon direncinin gözlenmesi** başlığı altında anlatılmıştır. Yüksek ısıl dayanımı, paslanmaması ve sağlamlığı düşünüldüğünde biyoreaktörlerde sık kullanılan bu paslanmaz çelik tipi tercih edilmiştir.

Sızdırmazlığı sağlayabilmek amacıyla çelik gövde konnektörü içine açılan conta kanallarında ve konnektör tüneline konnektöre sabitlemek için manşon ile konnektör tüneli arasında gıda uyumlu silikon contalar kullanılmıştır. 2 farklı conta tipi temin edilerek sızdırmazlık ve biyouyumluluk performansları incelenmiştir.

Bağlantıda kullanılacak hortumlar için hava geçirgen ve esnek silikon hortumlar tercih edilmiş, peristaltik pompa tarafından sıkıştırılırken deforme olmaması, otoklav dayanım ve biyoyumluluk performansları değerlendirilmiştir. Sızdırmazlığı sağlayabilmek için iç çap ve et kalınlığı farklı hortumlar denenerek, tasarlanan parçalarla uyumlu optimal hortum çap ve kalınlıkları bulunmuştur.

Bütün malzemelerin hücreler üzerinde olumsuz bir sağ kalım etkisi yaratmadığından emin olmak için malzemelerin sitotoksitesine ISO 10993-5:2009 uyarınca bakılmıştır. Biyoreaktörde kullanılması planlanan bütün malzemeler tartılarak, ISO 10993-12:2009 uyarınca 0.2 g/mL oranla ekstraksiyon için serumsuz besi ortamı ile 24 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. Ardından, 1×10^4 hücre/mL oranla 3 tekrarlı olarak 96 gözlü hücre kültürü kabına ekilen hücrelerin üzerine ekstraksiyon sıvıları eklenmiştir. 3 gün boyunca ekstraksiyon sıvısı ile inkübe edilen hücrelerin, ekstraksiyon sıvısı eklenmemiş kontrol grubu ile karşılaştırılması için MTT canlılık analizi yapılmıştır. Canlılık analizinde kullanılan bu yöntem, **3.2.1.2. Kültür kabında hücre canlılığının belirlenmesi** başlığı altında açıklanmıştır.

3.2.1.1. Bakır sülfat testi ile korozyon direncinin gözlenmesi

Tıbbi cihazlarda kullanılacak paslanmaz çelik malzemelerin korozyon direncinin ölçülmesi için kullanılan ASTM F1089 test metodu uyarınca, biyoreaktörde kullanılacak bütün paslanmaz çelik malzemelerin paslanmazlık özellikleri test edilmiştir. Testi gerçekleştirmek için öncelikle bakır sülfat çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 4 gr Bakır Sülfat Pentahidrat (C8027, Sigma Aldrich, ABD) tartılarak 249 mL distile su içerisinde çözündürülmüş, üzerine %96’lık sülfirik asit (30743, Honeywell Riedel de-Haen, ABD) 1 mL eklenmiş ve solüsyon iyice karıştırılmıştır. Ardından çelik malzemelerin yüzeyi %70’lik etanol ile silinerek temizlenmiş ve distile su ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. Malzemeler kuruduktan sonra bakır sülfat solüsyonu içerisinde en az 6 dakika bekletilmiştir. Reaksiyonun ardından malzemeler distile su ile yıkanmış ve herhangi bir kırmızı leke oluşumu olup olmadığı gözlenmiştir.

3.2.1.2. Kültür kabında hücre canlılığının belirlenmesi

Hücre canlılığının belirlenmesi için metabolik aktivite temelli bir test olan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) (M5655, Sigma Aldrich, ABD) sitotoksikite testi ISO 10993-5:2009 Ek C uyarınca gerçekleştirilmiştir. Hücreler tarafından metabolize edilen boyanın, hücre sayısı karşılığını gözlemlemek için denemeler yapılmadan önce, büyüme eğrisi çıkarmak gerekmektedir. Bunu sağlamak için hücreler 1×10^4 hücre/mL konsantrasyondan başlayıp, her seferinde 2 kat daha fazla hücre olacak şekilde $2,4 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyona kadar, 4 tekrarlı olarak 96 gözlü hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Olası sitotoksik etkiler çalışmada kullanılması planlanan hücreler üzerinde gözlemlenmek istendiği için, standartta belirtilen hücre tipleri yerine, çalışmada kullanılacak hücrelerin ekimi yapılmıştır. Hücre sayım ve ekim işlemlerinin nasıl gerçekleştirildiği **3.3 Hücre Kültürü** bölümünde açıklanmıştır. Hücrelerin 96 gözlü kültür kabı tabanına tutunması için en az 3 saat beklendikten sonra MTT testine başlanmıştır.

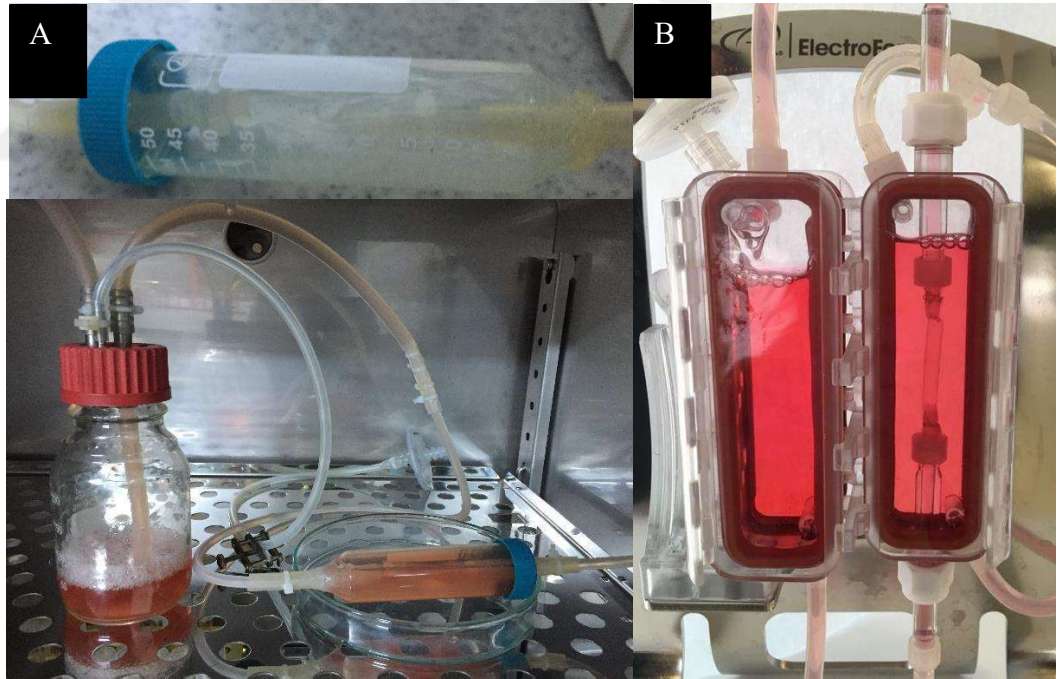
MTT solüsyonu hazırlamak için kabin içerisinde ve ışıksız ortamda toz halindeki MTT kimyasalı UPW içerisinde 5 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde çözündürülmüştür. Oda sıcaklığındaki MTT solüsyonu serumsuz besi ortamı ile seyreltilerek %10'luk (v/v) taze MTT boyama solüsyonu hazırlanmıştır. Ardından hücreler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve hazırlanan MTT boyama solüsyonu hücrelerin üzerine eklenerek, %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren 37 °C'deki inkübatör içerisine ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılarak kaldırılmıştır. 4 saat süren inkübasyonun ardından tüm ortam çekilerek, MTT boyasının hücreler tarafından metabolize edilmesi ile oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için hücrelerin üzerine DMSO (802912, Merck, Almanya) eklenmiştir. Çözünen kristallerin absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda, mikropilaka okuyucuda (Synergy HTX, BioTek, ABD) okutularak kaydedilmiştir. Bu şekilde her hücre tipi için hücre sayısı/absorbans eğrileri elde edilmiş ve denemeler sırasında okutulan değerlerin hücre sayısı karşılığını belirlemek için kullanılmıştır.

3.2.2. TBS'nin CAD modelinin oluşturulması

TBS'nin farklı akış etkileri altında davranışlarının simüle edilebilmesi için üretimi gerçekleştirilen TBS'lerin iç çapı ve et kalınlıkları ölçülmüş, basit bir tübüler yapı olarak SolidWorks 2019 SP 5.0 (Dassault Systemes, ABD) programı ile bilgisayar destekli modellemesi (CAD) gerçekleştirilmiştir. TBS'ye ait teknik resim ekte verilmiştir (Ek 1).

3.2.3. Biyoreaktör parçalarının tasarımı ve modellenmesi

Reaktör parçaları tasarlanırken kullanım ve izleme kolaylığı gözetilmiş, parça geometrileri bu doğrultuda oluşturulmuştur. Ön çalışmalar sırasında kullanılan 50 mL'lik santrifüj tüpünün ölçülerinin ideal olduğu (Şekil 3.6 – A), bağlantı parçaları için ise piyasadan temin edilen biyoreaktör parçalarının ergonomik olduğu (Şekil 3.6 – B) görülmüş tasarımlar bu temeller üzerine inşa edilmiştir.

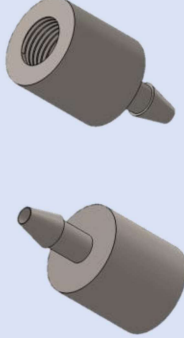
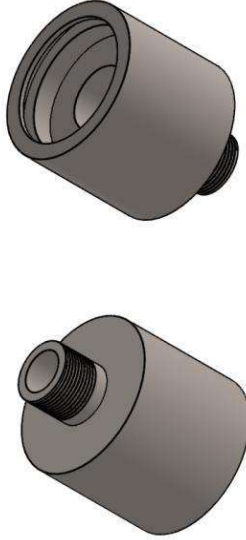


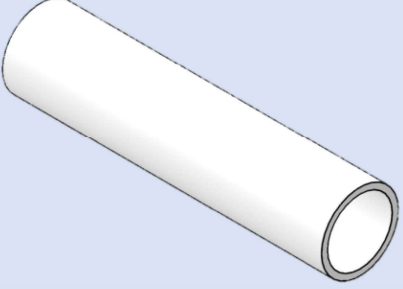
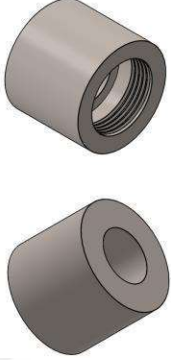
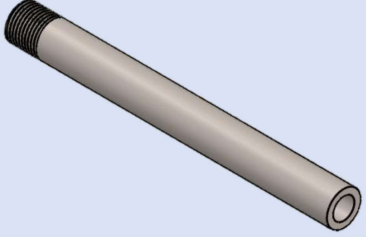
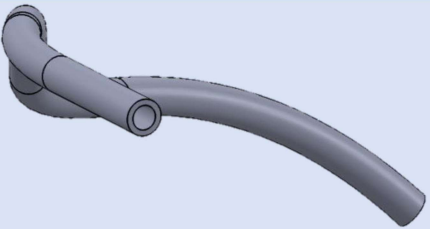
Şekil 3.6 Ön tasarımda kullanılan biyoreaktörler. A: Santrifüj tüpünden elle yapılan biyoreaktör. B: Piyasadan temin edilen benzer amaçlı biyoreaktör (3DCulturePro™, TA Instruments, ABD).

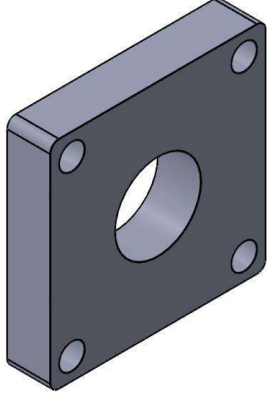
Biyoreaktör kurulum ve hücre ekim işlemleri aseptik koşullar altında, steril kabin içerisinde yapılmak zorunda olduğundan, parçaların tasarımında ana kriter ergonomi ve modülerlik olmuştur. Kompleks bir geometri sızdırmazlık gibi

kriterlerde avantaj sağlayabiliyorsa da kabin içerisinde kontaminasyonun önüne geçebilmek için, biyoreaktörün kolay montajlanabiliyor olması gerekmektedir (Bayir et al., 2020). Bu kriterler gözetilerek geliştirilen ve 7 ana parçadan oluşan tasarım Tablo 3-1’de özetlenmiştir. Parçalara ait spesifik ölçülerin yer aldığı teknik resimler ekte verilmiştir.

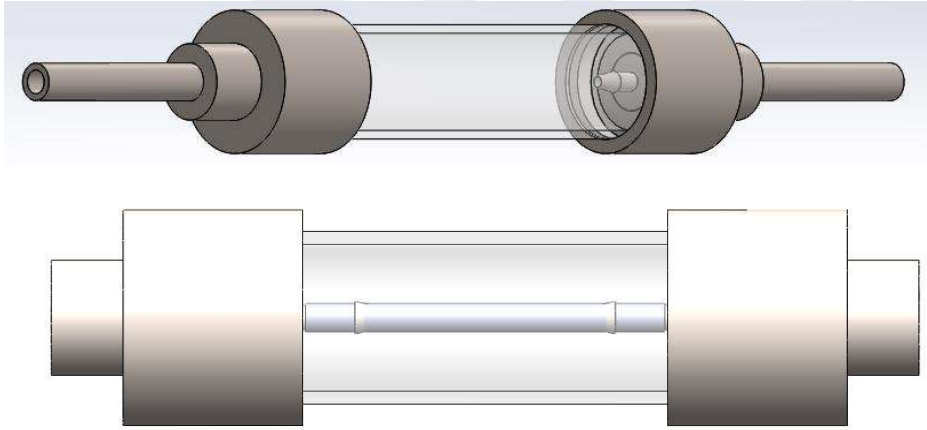
Tablo 3-1 Biyoreaktör parçaları

Teknik Resim	Parça Adı	Parça Görseli
Ek 2	Bağlantı Rakoru	
Ek 3	Gövde Konnektörü	

Ek 4	Gövde	
Ek 5	Manşon	
Ek 6	Konnektör Tüneli	
Ek 7	Sızdırmazlık Contaları	
Ek 8	Bağlantı Hortumları	

Ek 9	Sabitleme Destekleri	
------	----------------------	--

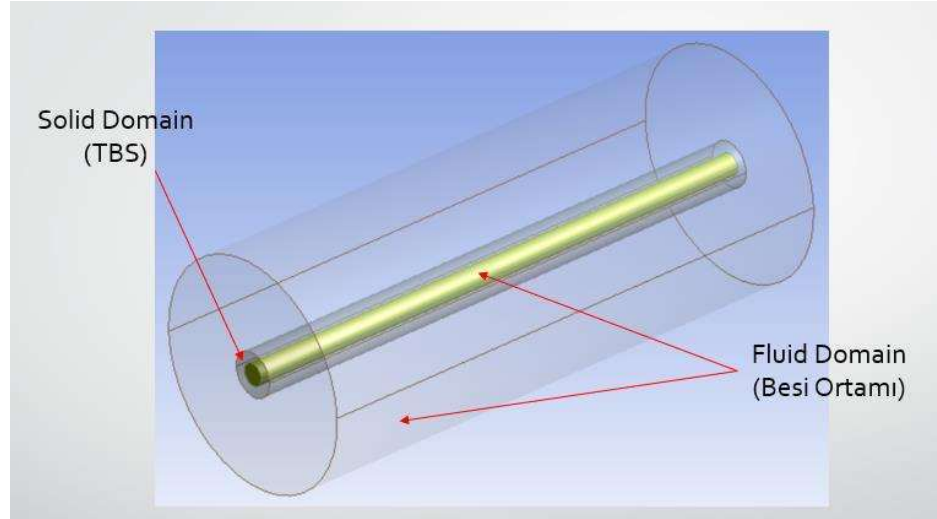
Parça SolidWorks programı üzerinde montajlanarak ölçüler doğrulanmış (Şekil 3.7), teknik resimler program üzerinde oluşturularak işlenmeye hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.7 Biyoreaktörün *in silico* montajı.

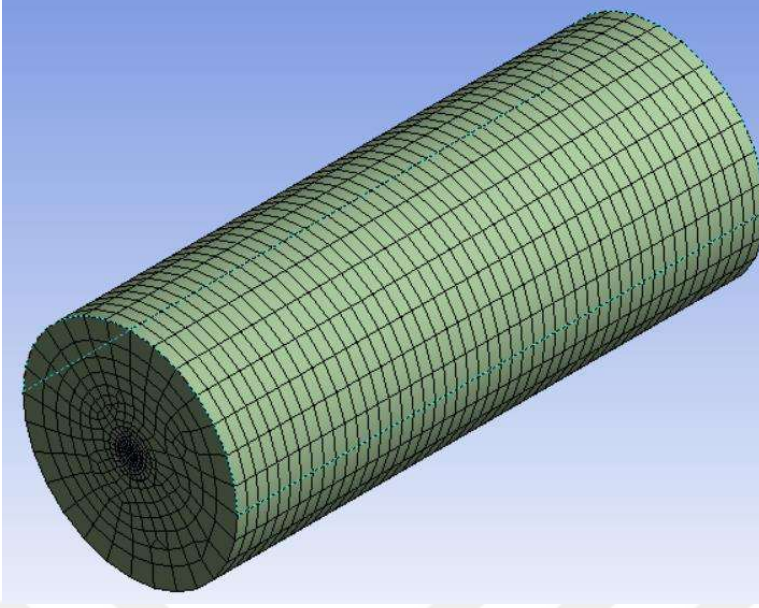
3.2.4. CFD analizi ile akış etkilerinin incelenmesi

Biyoreaktör parçalarının ve TBS'nin CAD modellemeleri tamamlandıktan sonra *in silico* denemeler için modeller ANSYS 2020 Fluent R1 (ANSYS, Inc., ABD) programında basitleştirilmiş (Şekil 3.8), yalnızca akışkanın etkilerinin görüleceği gövde ve TBS modelleri üzerinden ağlama (meshleme) adı verilen işlem yapılmıştır.



Şekil 3.8 CFD analizi için basitleştirilmiş model

Meshleme; görece büyük bir objeyi daha küçük elemanlara parçalama işlemi olarak tanımlanabilir. Bu işlemdeki amaç bir diferansiyel denklemin çözümünü kolaylaştırmaktır. Diferansiyel denklemin *in silico* çözülmesinde kullanılan sonlu elemanlar yönteminde, gerçeğe yakın sonuçlar elde etmenin yolu, optimize bir meshleme yapılmasına bağlıdır. Basitleştirilmiş model için katı ve sıvı ortamların fiziksel özellikleri programa tanımlanmış, çevresel koşullar belirlenerek meshleme işlemine başlanmıştır. ANSYS'de en yaygın iki meshleme seçeneği vardır. Biri altı yüzlü (hexahedral), diğeri ise dört yüzlüdür (tetrahedron). Hexahedral mesh, tetrahedron'dan daha doğru sonuçlar verdiği için bu çalışma için tetrahedron yerine hexahedral mesh yapılmıştır (Moaveni, 2007). Ayrıca, ağ boyutunun sonuçlardan bağımsız olduğundan emin olmak için bir ağ yakınsama çalışması yapılır. Akış simülasyonu için mevcut model, simülasyon süresini kısaltırken sonuç doğruluğunu elde etmek için 33,409 noktanın birleşiminden oluşan 27,719 parçaya bölünmüştür (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Akış simülasyonu için meshlenmiş model

Meshleme işleminin ardından, modelin *in vitro* denemeleri sırasında TBS'nin maruz kalacağı düşünülen etkiler, sabit hızlı iki farklı akış rejimi (sabit ve pulsatif) ve üç farklı basınç etkisi altında simüle edilmiştir. ANSYS yazılımının basınç profili oluşturmak ve farklı basınçlar üzerinden sisteme oluşan etkileri hesaplamak için kullandığı formüller:

Süreklilik denklemi

$$\rho \left(\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} + \frac{\partial w}{\partial z} \right) = 0$$

Momentum denklemleri

$$\rho \left(u \frac{\partial u}{\partial x} + v \frac{\partial u}{\partial y} + w \frac{\partial u}{\partial z} \right) = \frac{\partial}{\partial x} \left(u \frac{\partial u}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(u \frac{\partial u}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(u \frac{\partial u}{\partial z} \right) - \frac{\partial p}{\partial x}$$

$$\rho \left(u \frac{\partial v}{\partial x} + v \frac{\partial v}{\partial y} + w \frac{\partial v}{\partial z} \right) = \frac{\partial}{\partial x} \left(v \frac{\partial v}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(v \frac{\partial v}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(v \frac{\partial v}{\partial z} \right) - \frac{\partial p}{\partial y}$$

$$\rho \left(u \frac{\partial w}{\partial x} + v \frac{\partial w}{\partial y} + w \frac{\partial w}{\partial z} \right) = \frac{\partial}{\partial x} \left(w \frac{\partial w}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(w \frac{\partial w}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(w \frac{\partial w}{\partial z} \right) - \frac{\partial p}{\partial z}$$

TBS üzerindeki basınç dağılımı, akışkanın hız değişimi, duvar kayma gerilimi (WSS) ve dairesel gerilme etkileri bu 3 farklı senaryo için analiz edilmiştir. Bu etkilerin analizi için kullanılan formül ise altta verilmiştir:

$$\sigma = D \times \varepsilon^{el}$$

$$\sigma = \text{gerilim vektörü} = [\sigma_x \times \sigma_y \times \sigma_z \times \sigma_{xy} \times \sigma_{yz} \times \sigma_{xz}]^T$$

$$D = \text{elastisite veya elastik sertlik matrisi veya gerilme - şekil değiştirme eğri matrisi}$$

$$\varepsilon^{el} = \varepsilon \times \varepsilon^{th} = \text{elastik şekil değiştirme vektörü}$$

$$\varepsilon = \text{toplam şekil değiştirme vektörü} = [\varepsilon_x \times \varepsilon_y \times \varepsilon_z \times \varepsilon_{xy} \times \varepsilon_{yz} \times \varepsilon_{xz}]^T$$

$$\varepsilon^{th} = \text{termal şekil değiştirme vektörü}$$

3.3. Hücre Kültürü

Modelde kullanılacak hücrelerin belirlenmesi ve uygun yapının kurulabilmesi için damar modelinde kullanılabilecek 4 farklı endotel hücresi denenmiştir:

- Primer İnsan Beyin Mikrovasküler Endotel Hücreleri (HBMEC) (HEC02, Neuromics, ABD)
- İnsan Endotel Progenitör Hücre Hattı (EPC) (36053-05, Celprogen, ABD)
- İnsan Umbikal Ven Endotel Hücre Hattı (HUVEC) (Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu (HÜKÜK), Türkiye)
- İnsan Beyin Mikrovasküler Endotel Hücre Hattı (HBEC-5i) (CRL-3245, ATCC, ABD)

Soğuk zincir bozulmadan, dondurulmuş şekilde temin edilen hücreler, proliferasyon için çözündürülmüş ve çoğaltılarak pasajlanmış, yeterli stok elde etmek için ise dondurulmuştur. Hücreler üzerinde uygulanan bu işlemlere ait protokoller (çözdürme, pasajlama ve dondurma) aşağıda belirtilmiştir.

3.3.1. Besi ortamı (GFM) hazırlanması

Hücrelere kültür boyunca gerekli besin öğelerini ve farklılaşmaları için ihtiyaç duydukları kimyasalları sağlamak için besi ortamı adı verilen bir karışım hazırlanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan hücrelerin, vücut içi endotellerinin özelliklerini gösterecek şekilde fonksiyonelleşmeleri için özelleştirilmiş bir besi ortamı içeriği hazırlanmış (Bayir et al., 2018), bütün kültür işlemleri bu besi ortamı (Growth Factor Medium - GFM) ile gerçekleştirilmiştir;

- %85.88 (v/v) DMEM HG (45965-039, Gibco, ABD)
- %10 (v/v) Fötal Sığır Serum (FBS, S181G-100, Biowest, Fransa)
- %1 (v/v) L-Glutamin (K0283, Sigma Aldrich, ABD)
- %1 (v/v) Sodyum Pirüvat (S8636, Sigma Aldrich, ABD)
- %1 (v/v) Gentamisin (345814, Merck Millipore, Almanya)
- %1 (v/v) Putrescine (P5780, Sigma Aldrich, ABD) (18.50 µg/mL)
- %0.0557 (v/v) İnsulin (I9278, Sigma Aldrich, ABD) (5.57 µg/mL)
- %0.02 (v/v) Heparin (H1020, Sigma Aldrich, ABD) (2.00 µg/mL)
- %0.02 (v/v) Sığır Derim Albumini (BSA, A9647, Sigma Aldrich, ABD) (1.95 µg/mL)
- %0.01 (v/v) Hidrokortizon (H4001, Sigma Aldrich, ABD) (0.50 µg/mL)
- %0.005 (v/v) Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF, 13256029, Gibco, ABD) (5.00 ng/mL)
- %0.004 (v/v) Sodyum Delenit (214485, Sigma Aldrich, ABD) (5.20 ng/mL)
- %0.003 (v/v) Progesteron (P0130, Sigma Aldrich, ABD) (6.30 ng/mL)
- %0.003 (v/v) Epidermal Büyüme Faktörü (EGF, SRP3238, Sigma Aldrich, ABD) (30.00 ng/mL)

3.3.2. Hücre çözündürme ve çoğaltma

Kuru buz içerisinde kriyotüplerde teslim alınan hücreler, sıvı azot tankına (Locator, Thermo Scientific, ABD) (-196 °C) aktarılmıştır. Çözündürme işlemi için hücreler sıvı azot tankından çıkarılarak kriyotüpler su banyosunda (37 °C) eritilmiş, hücrelerin zarar görmemesi için ise kriyotüp içerisinde ufak bir parça buz kalması

sağlanmıştır. Dondurma çözeltisi sıvılaştığında kriyotüpler Sınıf II biyogüvenlik kabini (LP2-4S1/3, ESCO, ABD) içerisinde besi ortamı ile seyreltilerek santrifüj tüpüne (188271, Greiner Bio-One, Almanya) aktarılmıştır. Hücreler 4 °C, 1000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüjlendikten (5810 R, Eppendorf, Almanya) sonra süpernatant uzaklaştırılmış, santrifüj tüpüne yapışan hücre pelleti hafifçe vurularak tüpten ayrılmış ve besi ortamı ile süspanse edilmiştir. Süspanse haldeki hücreler, hücre kültür kaplarına (690175, Greiner Bio-One, Avusturya) alınmış ve ekim tarihi, ekim yapan kişi, hücre adı ve pasaj numarası gibi tanımlayıcı bilgiler yazılarak etiketleme yapılmıştır. Ardından kültür kapları, hücrelerin çoğalabilmesi için inkübasyona alınmıştır. Vücut içi koşulları yakalamak adına; %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatör (HERA Cell 150i, Heraeus, Almanya) 37 °C’ye ayarlanmış ve hücreler düzenli kontrol edilerek proliferasyonları takip edilmiştir. Üç günde bir besi ortamı çekilerek taze besi ortamı eklenmiş, kültür kabı yüzeyi çoğalan hücreler tarafından %80 oranında kaplandığında (konfluensi) pasajlama işlemine geçilmiştir.

3.3.3. Hücre pasajlama

Hücreler konfluensiye yaklaştıkça kısıtlı bir yüzeyde çoğaldıkları için alan bulamamaya ve strese girerek ölmeye başlarlar. Bu nedenle hücrelerin yüzeyden kaldırılarak yeni yüzeylere aktarılması veya dondurulması gerekmektedir. Pasajlama adı verilen bu işlemde; hücrelerin birbirleri ve yüzeyle yaptıkları protein bağlarının parçalanması gerekmektedir. Protein yıkımını sağlamak için pankreatik bir proteaz olan tripsin enziminden faydalanılır. Besi ortamı içerisinde bulunan Ca⁺² ve Mg⁺² iyonları hücrelerin yüzey proteinlerinin fokal adezyonlarla yüzeye daha sıkı bağlanmasını sağlayarak hücrelerin yüzeyden ayrılmasını zorlaştırdığından ve serum tripsini inhibe ettiğinden, pasajlama işlemine başlamadan önce hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmalıdır (Freshney, 2010). Bunun için; besi ortamı kültür kabından çekilip, besi ortamı artıkları da Ca⁺², Mg⁺² içermeyecek şekilde hazırlanmış ve önceden 37 °C’ye ısıtılmış steril fosfat tuz solüsyonu (PBS) ile yıkanmıştır.

PBS Hazırlanışı (pH 7.4):

- 0.2 g/L KCl (Potassium Chloride, 12636, Sigma Aldrich, ABD)
- 0.2 g/L KH_2PO_4 (Potassium dihydrogen phosphate, 104871, Merck Millipore, Almanya)
- 1.46 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sodium phosphate dibasic dihydrate, 106580, Merck Millipore, Almanya)
- 8 g/L NaCl (Sodium Chloride, 31434, Sigma Aldrich, ABD)

Yıkama işleminin ardından, hücrelerin üzerini kaplayacak kadar tripsin (%0.25)/EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu (SH30042.01, HyClone Cytiva, ABD) eklenerek, protein yıkımının etkin bir şekilde gerçekleşebilmesi için, kültür kabı 37 °C'deki inkübatörde 4 – 5 dakika bekletilmiştir. Fazla bekletme sonucunda hücre membran proteinleri de yıkılmaya başlayarak hücreler öleceğinden, süreç boyunca ters-faz ışık mikroskobu ile kültür kabı gözlemlenmiş ve hücreler kalktıktan sonra serum içeren besi ortamı ile tripsin inhibe edilerek hücreler santrifüj tüpüne toplanmıştır. Hücreler 4 °C, 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış, santrifüj tüpüne yapışan hücre pelleti hafifçe vurularak tüpten ayrılmış ve besi ortamı ile süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyon içerisindeki hücre sayısının nasıl hesaplandığı **3.3.3.1 Hücre sayımı** başlığı altında anlatılmıştır. Hücre süspansiyonu 3 yeni kültür kabına paylaştırılmış, hücreler istenilen sayılarda çoğaltılınca kadar bu işlemler tekrarlanmıştır. Bütün hücreler aynı anda kullanılamadığı ve sonraki çalışmalarda kullanabilmek için stok tutulması gerektiğinden, pasajlama sırasında hücrelerin dondurularak saklanması da gerekmektedir.

3.3.3.1. Hücre sayımı

Hücre sayısının hesaplanması için hemositometre üzerinde tripan mavisi ile hücre boyanması tekniği kullanılmıştır. Pasajlama sırasında yüzeyden kaldırılarak süspansiyon edilen hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak, homojenize edilmiş süspansiyondan alınan en az 20 µL hücre, boya ve/veya PBS ile seyreltilerek tekrar homojenize edilir. Bu işlem yapılırken son hacmin ilk hacme oranı ile seyreltme faktörü belirlenir. Boyar malzeme olarak %0.4'lük tripan mavisi (T8154, Sigma

Aldrich, ABD) solüsyonu kullanılmıştır. Tripan mavisi, hemositometre üzerinde koyu bir arka plan oluştururken, sağlıklı hücrelerin membranından geçemediği için canlı hücrelerin parlak sarı görünmesini sağlar, aynı şekilde ölü hücreleri de koyu mavi renkle boyadığı için canlı hücre sayısını belirlemek için de kullanılabilir. Homojenize edilen hücre-boya süspansiyonu Neubauer Hemositometresi'ne (075.03.002, ISOLAB, Almanya) aktarılır ve hemositometre kareleri içerisinde görülen hücre sayıları not edilir. Sayılan hücrelerin, pasajı yapılan hücre süspansiyonundaki hücrelere gelen karşılığı aşağıdaki formüle göre hesaplanır;

$$\text{Hücre sayısı (mL'de)} = \left(\frac{\text{Hemasitometrede sayılan hücre}}{\text{Sayım yapılan kare sayısı}} \right) \times 10^4 \times (\text{seyreltme faktörü})$$

3.3.4. Hücre dondurma

Pasajlama işleminin devamı olan hücre dondurma işleminde, pasajlama basamakları tekrar edilerek konfluensiye ulaşan hücreler tripsin yardımı ile kaldırılır ve santrifüjlenir. Ancak bu kez amaç hücrelerin çoğaltılması değil, saklanması olduğu için süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti dondurma ortamı ile (%90 FBS + %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (276855, Sigma-Aldrich, ABD) süspanse edilir. DMSO'nun hücrelere zarar vermesini engellemek için homojenize edilen hücre süspansiyonu ışısız ortamda hızlıca dondurma tüplerine (kriyotüp) (123278, Greiner Bio-one, Almanya) aktarılmıştır. Ani ısı değişiminin önüne geçme amacıyla aşamalı dondurma işlemi yapılmış, kriyotüpler önce köpük kutu içerisine konularak derin dondurucuya (-86 °C) konulmuş (MDF-U52V, Sanyo, Japonya), böylece hücrelerin kontrollü olarak soğuması sağlanmıştır. Kriyotüpler derin dondurucuda bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına (-196 °C) kaldırılmıştır. Çalışma boyunca hücre çözündürme, pasajlama ve dondurma işlemleri aralıklarla tekrarlanmıştır.

3.3.5. TBS üzerinde hücre davranışlarının incelenmesi

Hücrelerin gerçek denemelerin yapılacağı 3B çevreye alışmaları için, kültür sırasında kullanılan flasklar yerine, çalışmada kullanılacak doku iskelesi olan BS üzerindeki davranışları incelenmiştir.

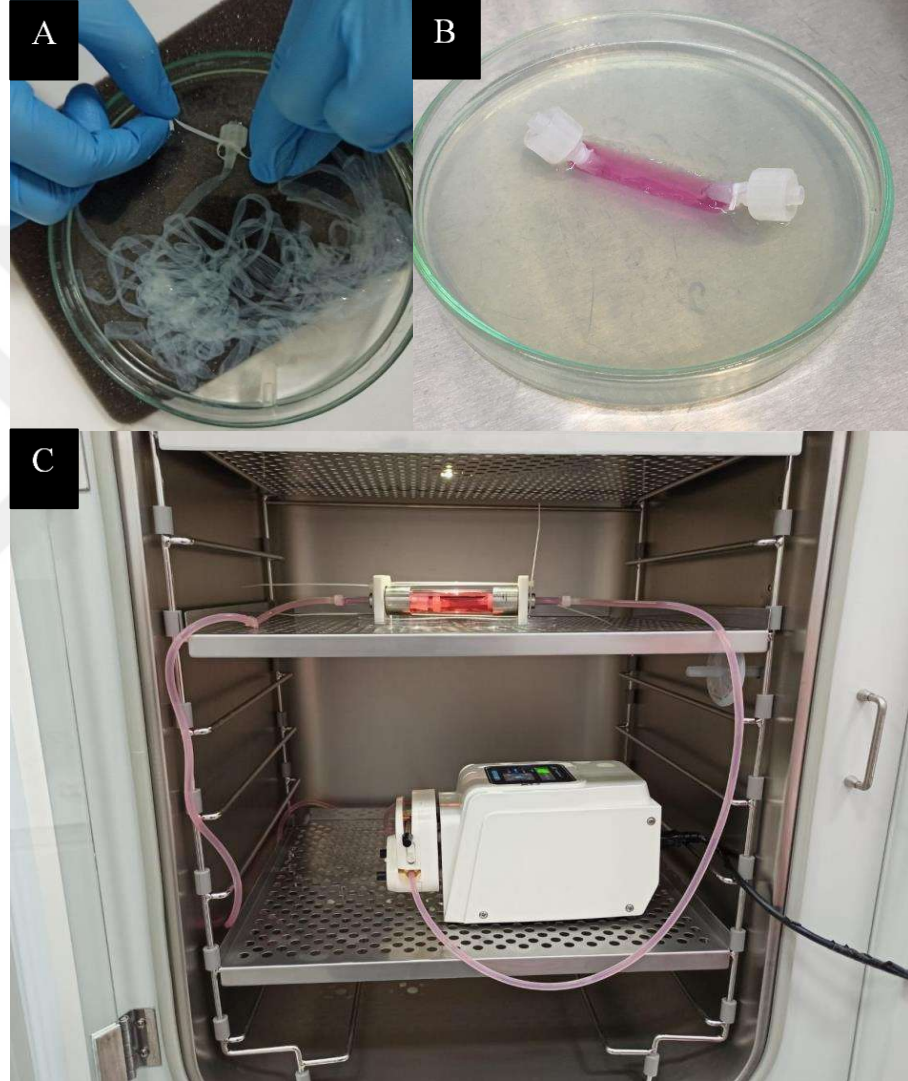
3.3.5.1. TBS'ye hücre ekimi

Hücrelerin TBS yüzeyine tutunmalarını sağlamak için statik ve dinamik yöntemler denenmiş, hücre tutunma verimi belirlenmeye çalışılmıştır.

TBS'lerin ekime hazır hale getirilmesi için; TBS'ler bağlantı rakorlarına dış ipi yardımıyla sabitlenerek (Şekil 3.10 – A) istenilen boylarda kesilmiş ve herhangi bir sızıntı/tıkanıklık olup olmadığı pastör pipeti yardımıyla TBS içerisinden distile su geçirilerek kontrol edilmiştir. Ardından cam petri içerisine alınarak üzerini kaplayacak kadar distile su eklenmiş ve otoklavlanarak steril edilmiştir (121 °C, 15 dakika). Hücre ekimine başlanmadan önce TBS'lerin ekim sıcaklığına getirilmesi (37 °C) gerekmektedir. Hücrelerin yüzeye daha iyi tutunmalarını sağlayabilmek için TBS yüzeyinin şartlandırılması gerekmiştir. Bunun için petri içerisindeki distile su steril kabin içerisinde uzaklaştırılmış, TBS'ler besi ortamı ile (GFM) en azından 1 saat süre ile 37 °C'de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatör içerisinde şartlanmaya bırakılmıştır.

Statik yöntemle hücrelerin TBS doku iskelesine tutunma zamanlarını belirleyebilmek için; hücrelerin TBS dışında bir yüzeye tutunmadığından emin olmak istenmiştir. Bu nedenle %4 (w/v) agar (A9915, Sigma Aldrich, ABD) solüsyonu hazırlanıp steril edilmiş, solüsyon sıcakken petri kabının tabanına kabin içerisinde dökülerek petri yüzeyi kaplanmıştır. İlk katmanın soğuyup katılaşmasının ardından, tabana dökülen agarın üzerine TBS'nin büyüklüğünde steril bir engel koyularak ikinci kat agar dökülmüş, bu ikinci katmanın soğuyup katılaşması ile, engel steril pens yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Böylece TBS'nin içine girebileceği ve hücrelerin TBS yüzeyi dışında herhangi bir yere tutunamayacağı bir küvet elde edilmiştir (Şekil 3.10 – B). Bu agar küvetine yerleştirilen TBS iskelelerin içerisinden taze besi ortamı geçirilmiş, en az 1 saat bekletilerek şartlandırılmaya bırakılmıştır. Ardından besi ortamı mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmış, 1×10^6 hücre/mL konsantrasyonunda 300 µL hücre süspansiyonu TBS içerisine aktarılmıştır. Daha sonra petrinin kapağı kapatılarak, hücreler 12 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde bekletilmiştir. Yerçekimi etkisiyle hücrelerin tek tarafa tutunacağı düşünüldüğünden 12 saat sonra TBS çevrilmiş, yine 1×10^6 hücre/mL

konsantrasyonunda 300 μ L hücre süspansiyonu TBS içerisine aktarılmıştır. İkincil yüzeye de hücrelerin tutunması için 12 saat inkübatörde bekletilmiştir. Toplam 24 saatlik sürenin 2×10^6 hücre/mL konsantrasyonundaki hücrelerin tutunması için yeterli olduğu, daha önce yapılan çalışmalarda görülmüştür (~ 4 saatte %99'luk tutunma) (Bayir, 2018). Bu şekilde hücre ekimi gerçekleştirilen TBS hücreli tübüler bakteriyel selüloz (HTBS) olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.10 TBS'ye hücre ekimi. A:Bağlantı rakorlarına TBS'nin tutturulması. B:Agar küvet içerisinde yerleştirilen TBS'ye statik hücre ekimi. C:Bioreaktörde dinamik hücre ekimi.

Denenen diğer hücre ekim yöntemi olan dinamik ekim için ise, 2×10^6 hücre/mL konsantrasyonda hazırlanan hücre süspansiyonu, 72 saat boyunca 10 rpm'lik hızla 37 °C'de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatörde TBS içerisinden

peristaltik pompa yardımıyla (YZ1515x, Longer Pump, İngiltere) geçirilmiştir (Şekil 3.10 – C).

Hücrelerin tutunma veriminin ve selüloza dağılımlarının gözlenmesi için Live&Dead boyama protokolü uygulanmıştır. Soğuk zincirle temin edilen boya kiti (L3224, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir. Kit içeriğindeki boyalardan Calcein AM, polianyonik bir boyadır. Bu özelliği sayesinde membran içerisinden kolaylıkla geçerek canlı hücreler tarafından tutulur ve hücre içerisinde yoğun yeşil floresans üretir. 4 mM'lık Calcein AM solüsyonundan, konsantrasyonu 2 μ M olacak şekilde alınarak, PBS içerisinde seyreltilmiştir. Kit içeriğindeki diğer boya olan ve canlı hücrelerin sağlam membranlarından geçemeyen Etidyum Homodimer-1 (EthD-1) ise ölü hücrelerin hasarlı membranlarından geçerek nükleik asitlere bağlanır ve parlak kırmızı floresans üretir. Boyama solüsyonu hazırlamak için; PBS içinde hazırlanan 2 μ M'lık Calcein AM solüsyonuna, konsantrasyonu 4 μ M olacak şekilde EthD-1 eklenmiştir. Hücre ekim etkinliğini gözlemlemek için inkübasyon süresi tamamlanan HTBS'lerden besi ortamları uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından HTBS'ler steril bistürü ile kesilerek düzgünce açılmış (Şekil 3.11), HTBS'nin hücreli iç yüzeylerini kaplayacak şekilde Live&Dead boya solüsyonu eklenmiştir.



Şekil 3.11 Analizlerin gerçekleştirilmesi için inkübasyon sonrası kesilerek açılan HTBS.

Ardından hücreler oda sıcaklığındaki ışıksız ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Boyama işleminin tamamlanmasıyla HTBS'ler boya kalıntılarının yanlış ışığa yapmasını engellemek için yeniden PBS ile yıkanmış ve hücreler floresans mikroskop (DFC 3000G, Leica, Almanya) altında incelenmiştir. Canlı hücreler (Calcein AM) ~495 – 515 nm aralığında, ölü hücreler (EthD-1) ise ~495 – 635 nm aralığında floresans ışığa vermektedir. Hücreleri gözlemek için Live&Dead boyama protokolü çalışmanın birçok aşamasında kullanılmıştır.

3.3.5.2. HTBS üzerinde hücre canlılığının belirlenmesi

Bu çalışma sırasında malzemelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin ölçülmesi ve hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan MTT testi, önceki bölümlerde bahsedildiği gibi hücrelerin boyayı metabolize ederken oluşturduğu formazan kristallerinin DMSO eklenerek çözünmesi prensibine dayanmaktadır. Kültür kabı içerisinde bu kristallerin çözünmesi ve absorbansının ölçülmesi oldukça kolay ve pratik olmakla birlikte, TBS'nin yapısı gereği, kristallerin HTBS yüzeyinden çözündürülmesi ve saf bir absorbans ölçümü yapılması mümkün olmamaktadır. Bunun önüne geçebilmek ve MTT'nin aksine, canlılığı tayin etmeye çalışırken hücreleri öldürmemek adına, HTBS üzerinde hücre canlılığı ölçümlerinde Alamar Blue (30025-1, Biotium, ABD) boyası kullanılmıştır. Bu test; hücrelerin, boya içeriğindeki Resazurin kimyasalını metabolize edip, metabolizma artışı olarak hücre dışına verdikleri resafurin adlı, absorbans ölçümüne olanak sağlayan bir kimyasala dönüştürmesi prensibi ile çalışmaktadır. Bu süreçte hücre kaybı yaşanmadığı ve boyalı besi ortamının uzaklaştırılıp taze besi ortamı eklenmesi ile hücreler kültüre devam edebildiği için (Bonnie et al., 2015) HTBS üzerinde hücre canlılığının ölçülmesi adına kolorimetrik Alamar Blue boyamasından kinetik olarak faydalanılmıştır.

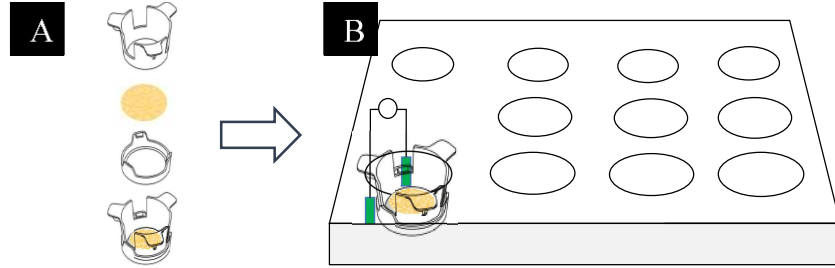
MTT testine benzer şekilde, **3.2.1.2. Kültür kabında hücre canlılığının belirlenmesi** başlığında açıklandığı gibi, Alamar Blue için de öncelikle hücre sayısı/absorbans eğrisi elde edilmiş, boyama işleminin sonuçları bu eğri kullanılarak hesaplanmıştır.

Boyama işlemi için ortamdaki besi ortamı uzaklaştırılarak, %10 boya içeren serumsuz besi ortamı eklenmiştir. Boya solüsyonu en az 2 saat boyunca HTBS ile muamele edilerek ortamdan uzaklaştırılmış ve taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir. Hücreler tarafından metabolize edilen boya solüsyonu en az 5 tekrarlı olacak şekilde 96 gözlü kültür kabına, her göze 100 µL gelecek şekilde aktarılmıştır. Metabolize olmayan resazurinin tespiti için spektrofotometrede (Synergy HTX, BioTek Instruments, ABD) önce 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmış, ardından resafurinin tespiti için 570 nm’de tekrar absorbans ölçümü yapılmıştır. Elde edilen resafurin absorbansından (570 nm), resazurinin absorbans değeri (600 nm) çıkarılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir.

3.3.5.3. TEER ölçümü

Hücrelerin TBS yüzeyine tutunma ve vücut içi yapılara benzer olarak hücreler arası sıkı bağlantı yapma verimi gözlemlemek için Trans Endotelyal Elektrik Direnci (TEER) değerleri ölçülmüştür. Bu ölçüm için kabin içerisine alınan HTBS’ler dikkatlice kesilerek CellCrown™ (Z742380-12EA, Scaffdex, Finlandiya) adı verilen insertler arasına sıkıştırılmış ve 24 gözlü kültür kabına alınmıştır (Şekil 3.12 – A). CellCrown™’ın içine (luminal kısım) ve dışına (abluminal kısım) besi ortamı eklenerek 37 °C’de %5 CO₂ ve %95-98 nem içeren inkübatöre kaldırılmış, bu sayede pH, sıcaklık gibi ölçümü etkileyen parametrelerin her ölçümde sabit kalması amaçlanmıştır. İnkübasyonun ardından kültür kabı kabin içerisine alınmış ve ölçüme başlanmıştır. TEER ölçümünün yapılmasını sağlayan Ag/AgCl elektrotlar (STX2, WPI, ABD) işlem öncesinde 15 dakika %70’lik etanol içerisinde bekletilerek dezenfekte edilmiş, ölçüm kalibrasyonunu sağlamak için volt/ohm metre cihazı üzerinde (EVOM2, WPI, ABD) 0 değeri görünene kadar besi ortamı içerisinde bekletilmiştir. Ölçüm için STX2 elektrotların kısa ucu hücrelere temas etmeyecek şekilde HTBS’li kısımdaki besi ortamına (luminal kısım), uzun ucu ise kültür kabı zeminine değecek şekilde dıştaki besi ortamına (abluminal kısım) daldırılmıştır (Şekil 3.12 – B). Elektrotların bağlı olduğu volt/ohm metre cihazı üzerinde değerler sabitlenene kadar elektrotlar dik ve sabit bir şekilde tutulmuş, CellCrown™’a tutturulmuş her HTBS’nin 3 farklı noktasından TEER değerleri ölçülmüştür. Farklı gruplar arasında geçiş yaparken elektrotlar besi ortamına bırakılarak tekrar sıfırlanması beklenmiştir, böylece hatalı ölçümlerin

önüne geçilmiştir. Hücre ekimi yapılmamış TBS yüzeyinden de aynı şekilde ölçümler alınmış, bu ölçümler arka plan ölçümü olarak kullanılmıştır. Deney gruplarının ölçümlerinden arka plan değeri çıkarılarak elde edilen sonuçlar, kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.12 HTBS’lerde TEER ölçümü. A: HTBS’lerin kesilerek CellCrown™’lara tutturulması. B: STX2 elektrotlarla birlikte 24 gözlü kültür kabı içinde ölçümün gerçekleştirilmesi (Bayir et al., 2018).

3.3.5.4. SEM ile görüntüleme

Hücrelerin TBS yüzeyiyle olan etkileşimi gözlemlemek amacıyla hücreler, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (EGE-MATAL) Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Bu görüntüleme öncesi SEM takibi adı verilen hazırlık protokolü izlenmiştir. Görüntüleme yapılmak istenen HTBS’ler kültürden alınmış ve kesilerek PBS ile yıkanmıştır. Yıkama sonrasında, HTBS’lerin üzerine 0.1 M sodyumkakodilat (BP293225, Fisher Scientific, ABD) içerisinde hazırlanan %5’lik (v/v) glutaraldehit (G5882, Sigma Aldrich, ABD) çözeltisi eklenmiş, 30 dakika boyunca beklenmiştir. 30 dakikanın sonunda HTBC’lerin üzerine 1 M sodyumkakodilat içerisinde hazırlanan %7 süktroz (1.07651, Merck, Almanya) çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. Ardından süktroz çözeltisi uzaklaştırılmış, %2’lik ozmiyum tetroksit (201030, Sigma-Aldrich, ABD) çözeltisi, 1 M sodyumkakodilat içinde hazırlanarak HTBC’lerin üzerine eklenmiştir. 30 dk. Bekletildikten sonra, örnekler 2 kez distile su ile 5 dakika yıkanmıştır. Fiksasyon adımlarının ardından susuzlaştırma basamağına geçilmiştir. Bunun için her bir alkol serisinde 5 dakika olacak şekilde, örnekler sırayla %35-%50-%70-%85-%95 ve 2 kez %100’lük etanol içerisinde bekletilmiştir. Susuzlaştırmanın son basamağı

olarak, örnekler heksametildisilazan (HMDS, 440191, Sigma Aldrich, ABD) içerisinde bekletilmiş ve 15 dakika sonrasında HDMS uzaklaştırılmıştır. Görüntüleme öncesi HTBC'ler tamamen kurumaları için önce çeker ocak içerisinde bekletilmiş, ardından nemlenmeleri için desikatör içerisinde görüntüleme gününe kadar tutulmuştur. Görüntülemenin doğru yapılabilmesi için örneklerin iletken bir yüzeye sahip olması gerekmektedir. Bu nedenle SEM görüntüleme yapılmadan önce 15 nm kalınlıkta Au-Pd kaplamayla iletken hale getirilmiştir. Bütün bu işlemlerin ardından örneklerin üzerine gönderilen elektronların geri yansımaları SEM cihazı (Apreo S, Thermo Scientific, ABD) tarafından kaydedilmiş, örneklerin yüzey yapısı farklı büyütmelemlerle incelenmiştir.

3.4. Hücre Yanıtlarının *In Vitro* Modelde İncelenmesi

Doku mühendisliği kapsamında gerçekleştirilen bu çalışmada, hücrelerin oluşturulan mikroçevre ve biyosinyallere verdikleri yanıtın görülebilmesi için geliştirilen biyoreaktöre hücreler aktarılmış, mekanotransdüksiyon ile verecekleri yanıtlar incelenmiştir.

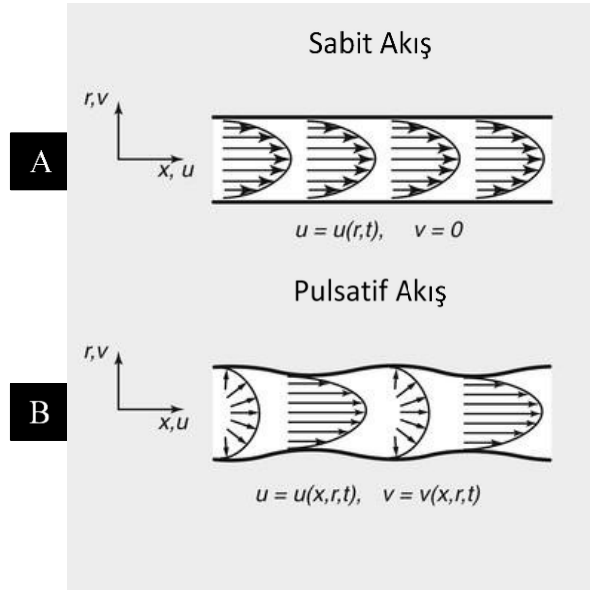
Bu denemeler planlanırken vücut içerisindeki damar sisteminin maruz kaldığı etkiler gözlemlenmiş, insan atar damarına benzer fiziksel uyarılar ile biyoreaktör içinde sistemin kültüre edilmesi ve damara tesir eden baş etkenlerin (duvar kayma gerilimi ve dairesel germe) sistemde yarattığı yanıtların doğru gözlemlenebilmesi için denemeler üç farklı kurgu ile gerçekleştirilmiştir.

Damar içi akışta, endotel hücrelerinin mekanoreseptörlerine etki eden fiziksel etkenlerin başında gelen duvar kayma gerilimi (WSS), çalışmada sabit tutulacak parametre olarak belirlenmiştir. Vücut içerisinde endotel hücrelere etki eden WSS'nin 1 – 20 dyne/cm² olduğu bilindiğinden (Booth et al., 2014; Cucullo et al., 2002, 2011; DeStefano et al., 2017; Kadry et al., 2020), sistemin sınırlayıcı etkileri değerlendirilmiş; TBS'nin optimal üretildiği en küçük çap 4 mm üzerinden hesaplamalar gerçekleştirilmiş, kalan parametreler fiziksel imkanlar ve eldeki cihaz kapasiteleri düşünülerek Tablo 3-2'de verilen formüller üzerinden hesaplanmıştır.

Tablo 3-2 TBS üzerindeki fiziksel etkilerin hesaplanmasında kullanılan formüller (Humphrey, 2008).

A – Duvar Kayma Gerilimi	B – Dairesel Germe
$\tau = 32 \cdot \mu \cdot \frac{Q}{\pi \cdot d^3}$	$\sigma = \frac{P \times a}{h}$
τ = Kayma gerilimi μ = Akışkanın viskozitesi Q = Akışkanın debisi π = Pi sayısı d = TBS'nin luminal çapı	σ = Dairesel germe P = Akışkanın duvara uyguladığı basınç a = Tüpün luminal kesit alanı h = Tüpün duvar kalınlığı

Hesaplamalar yapıldıktan sonra; gerçekçi bir *in vitro* model elde edebilmek için ulaşılmaması gereken WSS değerinin 4 dyne/cm² olmasına karar verilmiş, üç farklı sistem kurgusunda da WSS değerini sabit tutarak diğer parametrelerde değişiklik yapılmıştır.



Şekil 3.13 Sabit (A) ve Pulsatif (B) akış rejiminde kayma gerilimi ve dairesel germe etkileri (Zamir, 2016).

İstenilen duvar kayma gerilimi değerlerini elde etmek için gerekli debi, TBS'nin içinden geçen akışkan üzerinden Haagen-Pouisseuille formülü ile hesaplanmıştır (Tablo 3-2 – A). Akış hızı, dolayısıyla WSS sabit tutularak, dairesel germedeki farklılığın sisteme etkisi incelenmek istenmiştir. Sabit akış rejiminde sadece kayma geriliminin hücreler üzerine etki göstermesi beklenirken (Şekil 3.13 – A), pulsatif akışta hem kayma gerilimi hem de farklı basınç denemeleriyle birlikte dairesel germe etkilerinin görülmesi beklenmiştir (Şekil 3.13 – B).

Buna göre kurgulanan üç farklı akış rejiminin; sabit dairesel germe etkisinde (sabit akış), sağlıklı kan akış basıncındaki pulsatif dairesel germe ile (sistolik) ve hipertansiyon basıncındaki pulsatif dairesel germeye karşılık gelmesi için gereken hesaplamalar yapılmış, hesaplama sonuçları Tablo 3-3'te verilmiştir. TBS'nin ölçüleri bilindiğinden (Ek 1), hesaplamalar için gerekli olan diğer parametrelere ait bilgiler literatürden bulunarak hesaplamalara dahil edilmiş, tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3-3 Farklı akış etkilerinde sistemin maruz kalacağı kuvvetlerin hesaplanması.

Akış Kurgusu	Hesaplama Sonuçları	
	Duvar Kayma Gerilimi	Max. Dairesel Germe
Sabit Akış	Besi ortamı viskozitesi $\mu=0,00095$ Pa.s (Poon, 2020) 4 dyne/cm ² (0.4 Pa)	Max. Basınç = 45 mmHg ~95,000 dyne/cm ² (9.5kPa)
Sistolik Akış		Max. Basınç = 120 mmHg ~ 256,000 dyne/cm ² (25.6 kPa)
Hipertansiyonda Akış		Max. Basınç = 180 mmHg ~385,000 dyne/cm ² (38.5 kPa)

Hesaplama sonuçları literatür verileri ile kıyaslandığında vücut içerisindeki değer aralığında sonuçların elde edilebildiği görülmüştür (Humphrey, 2008; Axel R. Pries et al., 2005; Whittaker et al., 2009). Bu hesaplamalar sonucunda sistem kurguları kesinleştirilmiş, çalışma parametreleri belirlenmiştir. Bundan sonraki aşamalarda *in vitro* modeldeki yanıtların incelenmesi için bu parametreler kullanılmıştır.

Sabit akış rejimini sağlayabilmek için, geniş iç haznesine peristaltik pompadan gelen pulsatif akışı alarak, sabit akış olarak çıkmasını sağlayan dampener isimli bir akış dönüştürücü kullanılmıştır (Masterflex Pulse Dampener, EW-07596-20, Cole Parmer, ABD) (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Pulsatif akışı sabit akışa dönüştüren dampener (Masterflex Pulse Dampener, EW-07596-20, Cole Parmer, ABD).

İstenilen basınç değerlerinin sisteme adapte edilmesi, silikon hortum çaplarının ve bağlantı parçalarının değiştirilmesi sayesinde gerçekleştirilmiş, temin edilen vana (Şekil 3.15), akış hızı ve basınç üzerindeki kontrolün tekrarlanabilir olarak sağlanmasını mümkün kılmıştır.



Şekil 3.15 Sitemde basınç kontrolünü sağlayabilmek için kullanılan vana.

Biyoreaktör denemeleri; sistemin vücut içerisindeki benzer performans gerçekleştirdiğini görmek ve farklı akış profillerinde olası değişimleri takip edebilmek için dört ana kategoride gerçekleştirilmiştir:

- Endotel hücrelerinin, hücre içinde salgıladıkları proteinlerle sitoskeletlerle sağlamlaştırdığı yapının sertliğini tayin etmek için; Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılmış,
- Hücrelerin damar içinde birbirleri arasında ve yüzey ile oluşturdıkları protein bağlantılarını sistemde de yapabildiklerini görmek için; İmmünofloresans (IF) boyama ve Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (q-PCR) ile genetik ekspresyona bakılmış,
- Olumsuz etkilerin görülmesi için; akış etkisinin hücreler üzerinde yarattığı bilinen oksidatif stres etkilerinin (Charbonier et al., 2019; Cunningham & Gotlieb, 2005; Pires et al., 2013) incelenmesi ROS ve NO türlerinin tayini ile gerçekleştirilmiş,
- Sistem performansının değerlendirilmesi için; yüzey görüntülemelerin yanında, geçirgenlik (permeabilite) testi sonuçları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiştir.

Elde edilen verilerin yorumlanması bilimsel geçerlilik açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve raporlanmıştır.

3.4.1. Biyoreaktörün kurulumu

Üretimi gerçekleştirilen biyoreaktör parçalarının çalışmaya başlamadan önce steril edilmesi gerekmektedir. Kabin içerisinde rahat çalışabilmek adına biyoreaktör ön montajlanarak (parçalar alüminyum folyoya sarılmış, 15 dakika boyunca otoklavda yüksek sıcaklıkta buharla (121 °C) steril edilmiştir. Ön montaj basamakları görsellerle birlikte Tablo 3-4’te detaylandırılmıştır.

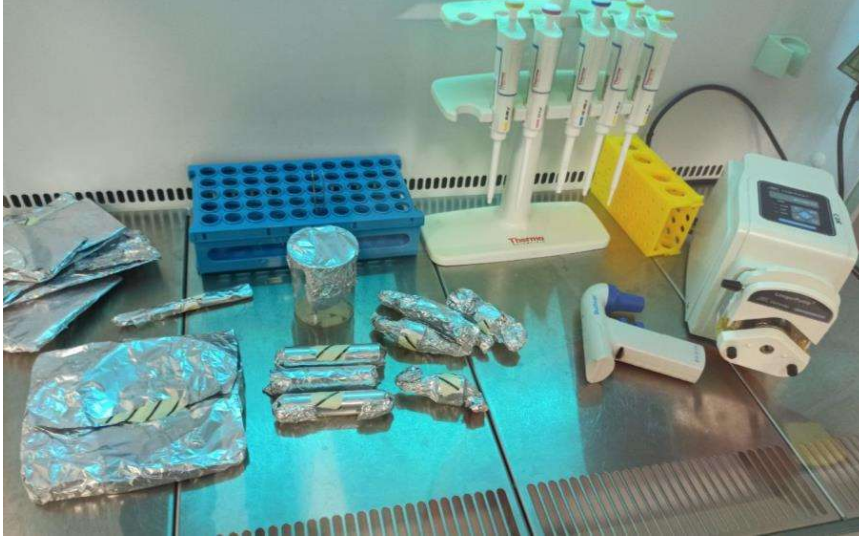
Tablo 3-4 Biyoreaktörün ön montaj basamakları.

İşlem No	İşlem Açıklaması	İşlem Görseli
1	Konnektör contası, gövde konnektörü içerisindeki yuvasına yerleştirilmiş ve sabitlenmiştir.	
2	Manşon contası, konnektör tüneline geçirilmiştir.	
3	Konnektör tüneli, gövde konnektörü içerisinden vida adımlı tarafı içeriye bakacak şekilde geçirilmiştir.	

4	Manşon, vida adımlı kısmı içe bakacak şekilde konnektör tünelinin düz tarafından geçirilmiştir.	
5	Manşon ile gövde konnektörü, konnektör tünelinin hareket edebilmesi için yarı sıkılarak, gövde konnektörünün ön montajı tamamlanmıştır.	
6	Biyoreaktörün pompa ile bağlantısını yapabilmek için gaz geçirgen silikon Bağlantı Hortum'u kullanılmış, konnektör tünelinin düz tarafına yaklaşık 4 cm uzunluğunda Bağlantı Hortum'u geçirilerek konnektör tüneli dış bağlantıya hazır hale getirilmiştir.	
7	Biyoreaktör – pompa bağlantısını sağlayan gaz geçirgen İletim Hortum'u 2.5 ve 0.5 metrelik iki parça halinde kesilip*, cam gövde ve çelik biyoreaktör malzemeleri ile birlikte alüminyum folyoya	

	sarılarak sterilizasyona hazır hale getirilmiştir. <i>*Hipertansiyonda Akış Sistemi için 2.5 metre İletim Hortum'u, 0.5 metre Hipertansiyon Hortum'u kullanılmıştır.</i>	
8	Otoklav dayanımı düşük olan parçalar (vana, dampener, bağlantı ve destek parçaları) %70'lik etanol içerisinde en az bir gece bekletilerek steril edilmiştir.	
9	HTBS'nin ön hazırlık basamakları 3.3.5.1 TBS'ye hücre ekimi başlığında açıklanmıştır.	

Kurulumu rahat yapabilmek ve aseptik koşulları riske etmeden çalışabilmek için sterilizasyondan çıkan bütün parçalar, alkolde bekletilen parçalar ve peristaltik pompa (YZ1515x, Longer Pump, İngiltere) %70'lik etanol ile silinerek kabin içerisine yerleştirilmiş, HTBS'ler kabin içerisine alınmadan önce kabinde UV lamba açılarak 15 dakika beklenmiş ve kabin içerisindeki asepsi tekrar sağlanmıştır (Şekil 3.16).



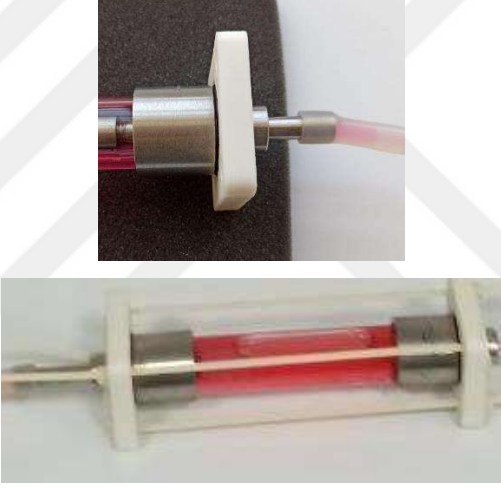
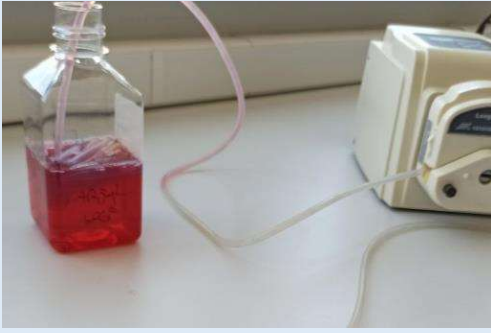
Şekil 3.16 Biyorektör kurulumu öncesi kabin içerisindeki hazırlıklar.

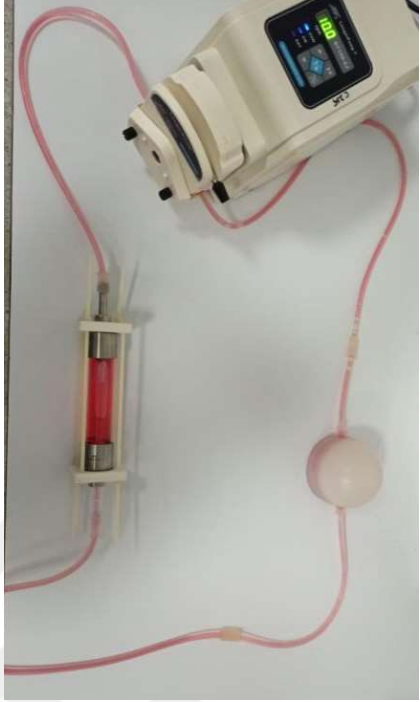
Bütün malzemelerin içeri alınmasının ardından HTBS'ler, kabin içerisine petrinin dış yüzeyi %70'lik etanol ile silinerek alınmış ve çalışmanın kalanına steril eldivenlerle devam edilmiştir. Ön montajı yapılan parçalara HTBS'nin takılması, yapıya zarar vermemek adına özenle ve dikkatlice gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-5).

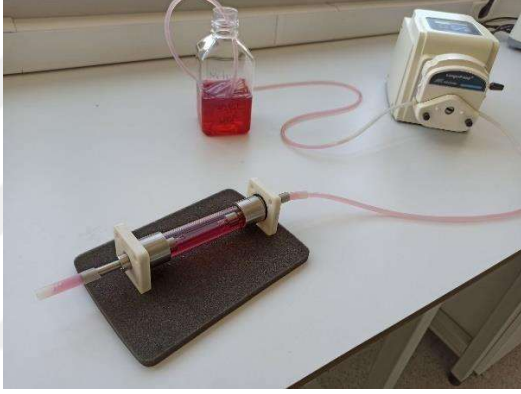
Tablo 3-5 Biyoreaktörün kurulum basamakları.

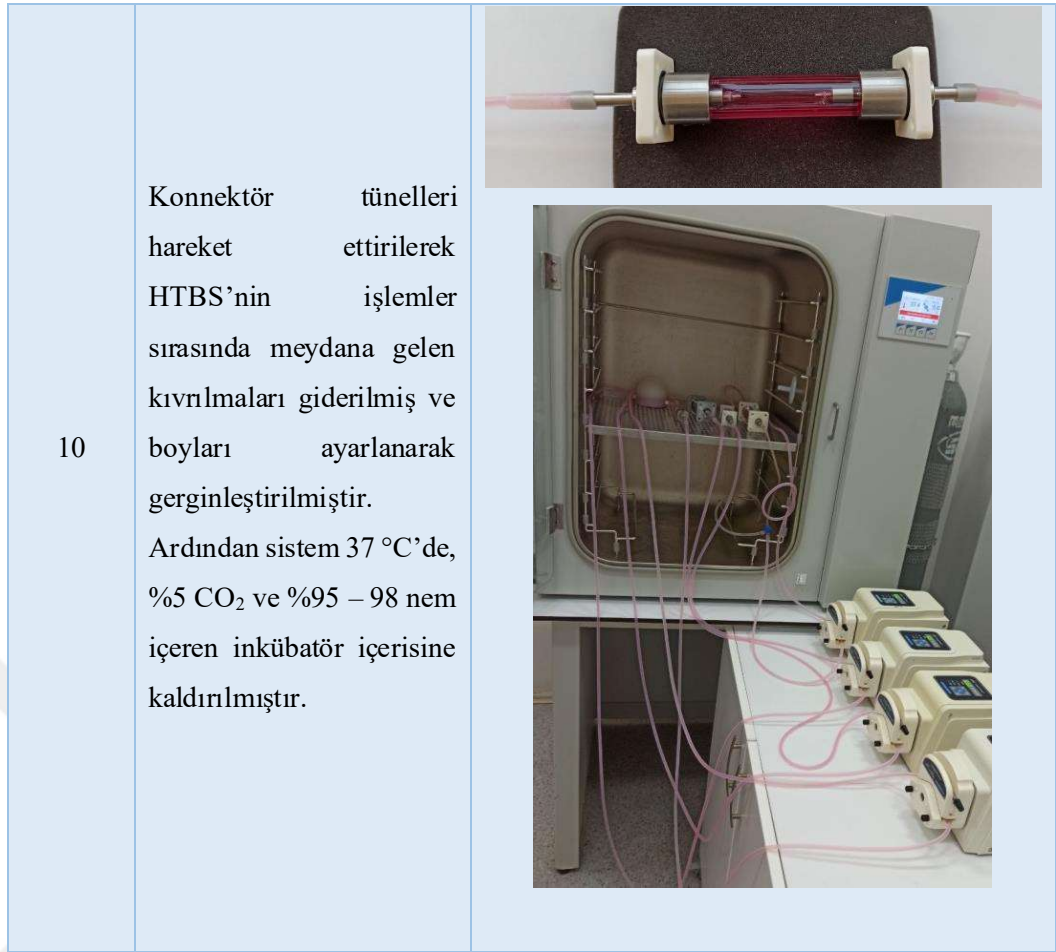
İşlem No	İşlem Açıklaması	İşlem Görseli
1	Konnektör tünelinin vida adımlı kısmına HTBS'nin takılı olduğu bağlantı rakorlarından biri vidalanmış ve parçanın sıkılığından emin olunmuştur.	

2	Gövde konnektörü dikkatlice tutularak yukarı kaldırılmış, bağlantı rakoruna bağlı HTBS sarkıtılırken boro silikatlı cam gövde yavaşça konnektöre oturtulmuştur.	
3	HTBS'nin sarkan ucuna bağlı duran bağlantı rakoru için 1. işlem tekrarlanmıştır. İşlemler gerçekleştirirken gövde konnektörleri sayesinde HTBS hareket ettirilerek montajın rahatça gerçekleştirilmesi ve HTBS'ye zarar verilmemesi sağlanmaktadır.	

4	İkinci gövde konnektörü cam gövde ile kapatılmadan önce serolojik pipet yardımı ile cam gövdenin içerisi (abluminal kısım) GFM ile doldurulmuş (~25 mL), gövde konnektörü cam gövde ile birleştirilerek biyoreaktör kapatılmıştır.	
5	Gövde konnektörlerinin dışta kalan uçlarından sabitleme destekleri Bağlantı Hortumları'na temas etmeyecek şekilde geçirilmiş, desteklerin köşelerindeki kanallardan plastik kelepçeler geçirilerek dikkatlice sıkılmıştır. Bu sayede olası sızırmaların önüne geçilmiştir.	
6	Gövde tamamen sabitlendikten sonra, İletim Hortum'u nun bir ucu GFM içerisine daldırılarak peristaltik pompa içerisine sabitlenmiş, açıkta ucuna besi ortamı gelene kadar pompa çalıştırılmıştır. Bu sayede hortumların içerisindeki hava	

	boşaltılırken HTBS'ye zarar verilmemiştir.	
7	Sabit Akış Sistemi için, İletim Hortumu'nun açık ucu dampenera bağlanmıştır. Dampener çıkışına 0.5 m'lik İletim Hortumu takılmış ve dampenerin çıkışı havaya kaldırılarak içeriye GFM dolması sağlanmıştır (130 mL).	
8	Sistolik ve Hipertansiyonda Akış Sistemlerinde basınç kontrolünü sağlayabilmek için İletim Hortumu'nun açıktaki ucu (basınç ölçümü yapılacaksa ek İletim Hortumları ile T bağlantı eklenmesinin ardından) vanaya takılmıştır. Vana çıkışına ise Systolik Akış için 0.5 m'lik İletim Hortumu, Hipertansiyonda Akış Sistemi için 0.5 m'lik Hipertansiyon Hortumu	

	takılmıştır. Hipertansiyon Hortumu ile Bağlantı Hortumu çapı uyumsuz olduğundan araya kısa bir İletim Hortumu geçirilerek bağlantı tamamlanmıştır.	
9	Sistemdeki hortumlar tamamen GFM ile doldurulduktan sonra, açtaki ucu Bağlantı Hortumu içerisinde geçirilerek biyoreaktör – pompa bağlantısı sağlanmıştır. Ardından HTBS içerisinde de besi ortamı geçirilip sistemin tamamında hava kalmayana kadar hücrelere zarar vermemek için pompa 10 rpm’de çalıştırılmıştır.	



Biyoreaktörün kurulumunun tamamlanmasıyla, hücrelerin akış ile kademeli tanıştırılması için, peristaltik pompalar 10 rpm'den başlayarak ve 4 saatte bir 10 rpm hızlandırılarak hesaplanan debiye ulaşılmıştır (Tablo 4-2). Bu şekilde kurulumu tamamlanan biyoreaktörde, HTBS'nin 1. günden itibaren maruz kaldığı etkilere verdiği yanıtlar, sistemler durdurulup demonte edilerek incelenmiştir.

3.4.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile hücre yanıtlarının mekanik ölçümü

Hücrelerin 3B yapısını sürdürebilmek için salgıladıkları sitoskelet proteinlerinin mekanik uyarılarla oluştuğu veya güçlendiği bilinmektedir. Bu proteinlerin varlığı ve miktarı, adherent hücrelerin mekanik özelliklerini etkilediği, fiziksel etkilerle oluşan stres fiberlerinin hücre içindeki miktarının hücre sertliği ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Gavara & Chadwick, 2016; Kuznetsova et al., 2007; Schwartz, 2010). Bu sebeple farklı şiddet ve şekildeki

mekanik uyaranlarla birlikte biyoreaktörde kültive edilen ve statik koşullar altında kültive edilen hücrelerin, hücre sertliği arasındaki farklılıkları görmek ve hücre elastik modülünü incelemek amacıyla AFM tekniği kullanılmıştır.

Hücreler yüzeyden kaldırılmadan HTBS'ler kesilerek açılmış ve taze besi ortamı içerisinde %5 gluteraldehit ile 1 saat boyunca  alkalıyıcı üzerinde (300 rpm) oda sıcaklığında fiksede edilmiştir. Fiksasyon sonrasında, hücreler PBS ile 3 kez 5'er dk yıkandıktan sonra analiz edilene kadar (maksimum 2 hafta) sodyum azidli (%0.1) PBS içerisinde +4  C'de bekletilmiştir. Ölçümler İzmir Yüksek Teknoloji  niversitesi'nde Core AFM (Nanosurf AG, İsviçre) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için 50  m x 50  m'lik bir alana, ContAl-G probu (BudgetSensors, Bulgaristan) ile 0.2 N/m'lik kuvvet uygulanmış, ortalama adhezyon kuvvetleri ve ortalama Young modüllerinin ölçümü gerçekleştirilirken, 3B topografik görüntüleri de elde edilmiştir. Elde edilen verilerin yorumlanması bilimsel geçerlilik açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve raporlanmıştır.

3.4.3. İmmünofloresans (IF) boyamalar

Hücrelerin vücut içi yapıyla benzer özellikler gösterdiklerini gözlemlemek adına, sitoiskelet proteinleriyle birlikte, yüzey tutunma (AJ) ve hücreler arası sıkı bağlantı (TJ) proteinleri salgılayıp salgılamadıklarına bakılmıştır. Sitoiskelet proteini olan Aktin ve sitoiskelet proteinlerinin TJ ve AJ proteinleri ile olan bağlantısını sağlayan  -Katenin'le birlikte, TJ ve AJ'den sorumlu proteinler olan; ZO-1, Okludin, Klaudin-5, VE-Kaderin ve JAM-A'nın varlığı iki aşamalı IF boyama yapılarak incelenmiştir (Molino et al., 2014; T. Ronaldson & P. Davis, 2012; Weksler et al., 2005).

Boyamanın ilk aşamasında; proteinler hedef proteine özgü primer bağlayıcılar F-Aktin (PA5-11570, Thermo Fisher, ABD), Anti- -Katenin (13-8400, Thermo Fisher, ABD), Anti-ZO-1 (33-9100, Thermo Fisher, ABD), Anti-Okludin (33-1500, Thermo Fisher, ABD), Anti-Klaudin-5 (35-2500, Thermo Fisher, ABD), Anti-VE-Kaderin (MA1-198, Thermo Fisher, ABD), Anti-JAM-A (SC-53623, Thermo Fisher, ABD) ile işaretlenmiştir. İkinci aşamada primere bağlanıp ışıma yapacak sekonder antikörlerle (A32723, A32727, Thermo Fisher, ABD) boyama

yapılmış ve floresans mikroskop altında (Axio Vert.A1, Zeiss, Almanya) protein varlığı gözlemlenmiştir. Boyama basamakları altta açıklanmıştır:

Boyamaları gerçekleştirmek için üç solüsyona ihtiyaç vardır:

- **Solüsyon A – TrisBS :** Tris Tamponlu Salin (TBS) Solüsyonu hazırlamak için 6.05 g Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 154563, Sigma Aldrich, ABD) ve 8.76 g NaCl (Sodium Chloride, 31434, Sigma Aldrich, ABD) 800 mL UPW içinde çözündürülmüştür (pH 7.6).
- **Solüsyon B –Triton Çözeltisi :** Solüsyon A'nın bir kısmına %0.2'lik (v/v) Triton X – 100 (A4975, AppliChem, ABD) eklenerek hazırlanmıştır.
- **Solüsyon C – Triton-BSA Çözeltisi :** Solüsyon B çözeltisinden bir miktar alınıp üzerine %3 BSA (w/v) eklenip çözündürülerek hazırlanmıştır.

1. HTBS'ler kesilip açılarak petri kabına alınmış, Solüsyon A ile hücreleri kaldırmamaya özen gösterilerek 2 kez yıkanmıştır.
2. Fiksasyon basamağı farklı proteinler için ikiye ayrılmıştır. Hücre içerisindeki yapıların görülmesi istenilen Grup 1 boyamalarında (Aktin ve β -Katenin) Solüsyon A içerisinde hazırlanan ve hazırlandıktan sonra +4 °C'de bekletilen %4'lük (w/v) paraformaldehit (PFA) (158127, Sigma Aldrich, ABD) çözeltisi, petrilere HTBS yüzeyine kaplayacak şekilde eklenmiş ve çalkalayıcı üzerinde (Titramax 100, Heidolph, Almanya) 300 rpm'de 15 dk boyunca çalkalanan hücreler oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Grup 2 boyamaları için (TJ ve AJ proteinleri) protokolün 6. basamağından devam edilmiştir.
3. PFA çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra, petrilere Solüsyon A ile 2 kez yıkanmış, ardından 50 mM NH₄Cl (Ammonium Chloride, A9434, Sigma Aldrich, ABD) solüsyonu ile 7 dk boyunca, çalkalayıcı üzerinde, söndürme (quenching) işlemi için oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Permeabilizasyon için, NH₄Cl solüsyonu uzaklaştırılmış, petrilere Solüsyon B ile 5'er dakikadan 2 kez, oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde yıkanmış ve Solüsyon B uzaklaştırılmıştır. Ardından Solüsyon A ile yıkama işlemine devam edilmiştir.

5. Bloklama için; Solüsyon A çekildikten sonra, Solüsyon C eklenerek, 1 saat boyunca, çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından Solüsyon C çekilerek, 8. işlem basamağına geçilmiştir.
6. Yüzeyde ve hücreler arasında bulunan proteinleri görüntülemek için ise; hücrelerin üzerine -20 °C'de bekletilen saf metanol (32213, Sigma Aldrich, ABD) eklenmiş petriler 10 dakika boyunca -20 °C'de bekletilerek fiksasyon basamağı tamamlanmıştır. Ardından metanol uzaklaştırılarak, petriler çalkalayıcı üzerine alınmış Solüsyon A ile 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir Solüsyon A tazelenerek oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
7. Bloklama işlemi için; Solüsyon A içerisinde homojenize edilen %20'lik (v/v) FBS ve %1'lik (v/v) BSA çözeltisi, hücrelerin üzerine eklenerek 30 dakika boyunca, çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. İnkübasyon devam ederken, boyamanın ilk aşaması için kullanılacak primer antikörlerin dilüsyonları hazırlanmıştır. Primerlerin seyreltme oranları altta verilmiştir:

Grup 1 (Solüsyon B içerisinde)

- Anti-Aktin 1:50
- Anti- β -Katenin 1:50

Grup 2 (Solüsyon A içerisinde)

- Anti-ZO-1 1:100
- Anti-Okludin 1:200
- Anti-Klaudin-5 1:50
- Anti-VE-Kaderin 1:50
- Anti-JAM-A 1:50

9. Bloklama işlemi tamamlanınca hücreler üzerine primer antikörler koyularak, ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılmış ve nemli ortamda, 4 °C'de, bir gece süre ile inkübe edilmiştir. Bundan sonraki basamakların hepsine ışıksız ortamda devam edilmiştir.
10. Primer antikörler ile inkübasyonun ardından, Grup 1'deki hücreler Solüsyon B ile 15 dakika çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında yıkanmış, ardından Solüsyon B uzaklaştırılmıştır. Bu işlem toplam 3 kez tekrarlanmıştır. Grup 2'deki hücreler Solüsyon A ile 10 dk süreyle,

oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde yıkanmış, ardından Solüsyon A uzaklaştırılmıştır. Bu işlem toplam 6 kez tekrarlanmıştır.

11. Bu sırada primerleri boyayarak floresan ışımaya yapılmasını sağlayacak sekonder antikorlar ile hücre çekirdeklerini boyayacak DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, D1306, Thermo Fischer, ABD) solüsyonları hazırlanmıştır. Grup 1 için Solüsyon B içerisinde, Grup 2 için Solüsyon A içerisinde; 1:500 oranda sekonder antikorların ve 1:1000 oranda DAPI boyasının dilüsyonu hazırlanmıştır.
12. Boyama işleminin ikinci basamağı için hücreler; yıkama basamağının ardından DAPI – sekonder antikor solüsyonu içerisinde, 45 dk boyunca çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
13. Sekonder antikorlar ile inkübasyon sonunda Grup 1'deki hücreler Solüsyon B ile 10 dk süreyle, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde toplam 3 kez; Grup 2'deki hücreler ise Solüsyon A ile 10 dk süreyle oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde toplam 6 kez yıkanmıştır.
14. Son basamakta tüm hücreler Solüsyon A ile bir kez 10 dk süreyle oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde yıkanarak görüntüleme için hazır hale getirilmiştir.

3.4.4. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) çalışmaları

Endotel hücrelerinin sistemde göstermesi beklenen sıkı ve adherens bağlantı proteinleri olan ZO-1, Okludin, Klaudin-5, JAM-A ve VE-Kaderin proteinlerinin ve sitoskelet proteinleri olan aktin ve β -katenin proteinlerinin, Mesajcı Ribo Nükleik Asit (mRNA) düzeyindeki ekspresyonunu ve olası değişimleri incelemek için HTBS'ler kesilip açılmış, hücrelere zarar vermeden PBS ile yıkanmıştır. Ardından TBS'nin luminal yüzeyi hücre kazıyıcı ile dikkatlice kazınarak hücreler TBS'den ayrılmıştır. Hücreler daha sonra steril PBS ile kriyotüplere konularak analizler gerçekleştirilene kadar -20 C'de saklanmıştır. İlk olarak örneklerdeki toplam Ribo Nükleik Asit (RNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam RNA izolasyonu için MasterPure RNA saflaştırma kiti (MCR85102, Epicentre, ABD) kullanılmıştır. İzole edilen RNA konsantrasyonu nanovetli spektrofotometrede (DU 730, Beckman Coulter, ABD) 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans

ölçümleri oranlanarak hesaplanmıştır. A260/A280 oranının 1,6-2 arasında olması, RNA izolasyonun doğru şekilde yapıldığını göstermektedir. Örneklerden elde edilen toplam RNA miktarı ProtoScript®-M-MuLV First Strand cDNA sentez kiti (E6300 L, New England BioLabs, ABD) kullanılarak tersine transkripsiyon (reverse transcription) yöntemiyle Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit'e (cDNA) tamamlanmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri web tabanlı Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, ABD) programı ile belirlenmiştir (Tablo 3-6). Web tabanlı *in silico* Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) programı ile primerlerin uygunluğu doğrulanmıştır (Primer-BLAST, NCBI, ABD).

Tablo 3-6 Kantitatif PCR (qPCR) ile analiz edilen gen dizileri.

Gen	Gen Bank Numarası	Primerler (F:İleri, R:Geri)	PCR ürünü uzunluğu (bp)
Aktin (ACTB)	NM_001101.3	F:5'-CTCACCATGGATGATGATATCGC-3' R:5'-AGGAATCCTTCTGACCCATGC-3'	163
β-Katenin (CTNNB1)	NM_001904.3	F:5'-TTGTGCGGCGCCATTTTAAG-3' R:5'-TCCTCAGACCTTCCTCCGTC-3'	102
ZO-1	NM_001301025.1	F: 5'-GTGCTGGCTTGGTCTGTTG-3' R: 5'-CTGAGCCCTTCAGATGAGCA-3'	190
Okludin (OCLN)	NM_002538.3	F: 5'-CCAAGGTTCATCCGAAGCA-3' R: 5'-GCGCTGTAAAGGAACCGC-3'	146
Klaudin-5 (CLDN5)	NM_001130861.1	F: 5'-GAGCAGCCCCTGTGAAGATT-3' R: 5'-GTCTCTGGCAAAAAGCGGTG-3'	108
VE-Kaderin (VE- Cadherin)	NM_001795.3	F: 5'-CTTCACCCAGACCAAGTACACA-3' R: 5'-AATGGTGAAAGCGTCCTGGT-3'	154

JAM-A	AF172398.2	F:5'-CCGGGATATCGTCGACCC-3' R:5'-CAGTTTCCTCTCGACTTGCG-3'	134
-------	------------	--	-----

PCR reaksiyonu için cDNA örnekleri 1:5 oranında, ileri (forward) ve geri (reverse) primerler ise 15 pmol konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz içermeyen suyla seyreltilmiştir. 1 µL seyreltilmiş cDNA ve 1'er µL primerler, 7 µL nükleaz içermeyen suyla karıştırılmıştır. Üzerine 10 µL SYBR Green qPCR karışımı (1725121, BioRad, ABD) eklenmiştir. Başlangıç denatürasyonu (95 °C'de 3 dk) ardından gelen toplam 40 döngülük denatürasyon (94 °C'de 20 sn) ile bağlanma ve zincir uzaması (60 °C'de 20 sn) olacak şekilde PCR programı oluşturulmuştur. Erime eğrisi analizi için programın sonuna 95 °C'de 1 dk, 55 °C'de 30 sn ve 95 °C'de 30 sn. olacak bir segment daha eklenmiştir. Elde edilen verilerin yorumlanması bilimsel geçerlilik açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve raporlanmıştır.

3.4.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve nitrik oksit (NO) birikiminin incelenmesi

Hücrelere uygulanan mekanik uyarıların oksidatif stres faktörü yarattığı ve hücrelerde Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Nitrik Oksit (NO) birikimine neden olduğu bilinmektedir. ROS ve NO birikimi damarın iç yapısının bozulmasına yol açtığından, mekanik uyarı olan ve olmayan tüm denemelerde ROS ve NO üretimlerinin analiz edilmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle HTBS'ler kesilip açılarak steril petri içine alınmış, hücrelere zarar vermeden PBS ile yıkanmıştır. Ardından TBS'nin luminal yüzeyi hücre kazıyıcı ile dikkatlice kazınarak hücreler TBS'den ayrılmış, TBS yüzeyine ve kazınan hücrelere, üzerlerine kaplayacak kadar tripsin eklenmiş ve 37 °C'deki inkübatörde 4 – 5 dakika bekletilmiştir. Tripsini inhibe etmek için serum içeren besi ortamı ile TBS yüzeyi ve petri kabı yıkanmış, besi ortamı çekilerek santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücreler 4 °C, 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış, santrifüj tüpüne yapışan hücre pelleti hafifçe vurularak tüpten ayrılmış ve besi ortamı ile süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyon içerisindeki hücre sayısının nasıl hesaplandığı **3.3.3.1 Hücre sayımı** başlığı altında anlatılmıştır. Hücre sayıları belirlendikten

sonra ROS tayini için gereken sayıda hücre (10^6) yeni bir santrifüj tüpüne alınarak, iki tüp de santrifüjlenmiştir (4 °C, 1000 rpm'de 5 dk).

3.4.5.1. ROS tayini

Hücre sayısı belirlendikten sonra ROS tayini için; oksidatif stres varlığında hücre yapısındaki lipidlerin yıkımıyla oluşan malondialdehit (MDA) ile reaksiyona giren Lipit Peroksidasyon kiti (MAK085, Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. MDA ile reaksiyon sonucu floresans ışımaya veren kitin kullanımı için izlenen protokol aşağıda belirtilmiştir:

1. Test uygulanmadan önce, kitin içinde tiyobarbiturik asit (TBA) 7,5 mL glacial asetik asit (100063, Merck Millipore, Almanya) içerisinde çözündürülerek, sonike edilmiştir. Ardından, karışıma 17.5 mL UPW eklenerek, son hacmi 25 mL olan Reaksiyon Solüsyonu elde edilmiştir.
2. Kit içeriğindeki MDA Standart Solüsyonu'nu (4.17 M) UPW ile seyreltilmiş, bu seyreltmeler sonunda 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 ve 2 nmol'lük standart çözeltiler hazırlanmıştır. Blank için yalnızca UPW kullanılmıştır.
3. Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant uzaklaştırılmış, santrifüj tüpüne yapışan hücre pelleti hafifçe vurularak tüpten ayrılmış ve hücre çeperlerini parçalamak için üzerlerine %1 butile hidroksitolüen (BHT) içeren RIPA Lizis Tamponu (SC-24948, Santa Cruz Biotechnology, ABD) eklenmiştir (300 µL).
4. Santrifüj tüpleri homojenizasyon için vortekslenerek, -20 °C'deki buz dolabına kaldırılmış 10 dakika boyunca lizis işleminin sona ermesi beklenmiştir.
5. Daha sonra, hücreler 13,000 g, 4 °C'de 10 dakika santrifüjlenmiş, süpernatanttan, UPW'den ve standart çözeltilerden 200'er µL alınıp mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur.
6. Ardından, her bir tüpe hazırlanan Reaksiyon Solüsyonu eklenmiş (600 µL) ve tüpler 95 °C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon sonrası her bir tüpten 200 µL alınıp 3 tekrarlı olacak şekilde 96 gözlü florometrik kültür kabına (4ti-0263, Brooks Life Sciences,

ABD) aktarılmış ve mikropłaka okuyucuda (Synergy HTX, BioTek Instruments, ABD) floresans ışma yoğunluğu ölçölmüştür (Ex = 532 nm / Em = 553 nm).

8. Her örnekten blank okuma değeri çıkarılmış, standart çözeltilerden elde edilen değerler kalibrasyon için kullanılarak MDA miktarı (nmol)/Absorbans eğrisi elde edilmiştir. Bu eğrilerden örneklerdeki MDA miktarı nmol cinsinden elde edilmiş, örnek hacmi ile çarpılarak da örneklerdeki MDA yoğunluğu, dolayısıyla ROS'un yol hasar miktarı belirlenmiştir.

3.4.5.2. NO tayini

Hücre sayısı belirlendikten sonra NO tayini için, nitrik oksit ile reaksiyona girerek floresans ışma yapan DAF-FM'e dönüşen DAF-FM diasetat (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein diacetate, D-23842, Thermo Fischer, ABD) kiti kullanılmış, izlenen protokol aşağıda belirtilmiştir:

1. Kit içerisindeki 50 µg'lık DAF-FM diasetat, andhidroz DMSO (A3672, Applchem, ABD) içerisinde çözdürölerek 5 mM'lık stok solüsyon hazırlanmıştır.
2. Stok solüsyon, son konsantrasyon 5 µM olacak şekilde Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS içerisinde seyreltilerek reaksiyon solüsyonu oluşturulmuştur.
3. Santrifüjlenen hücreler üzerinden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler homojen bir şekilde yeniden süspanse edilmiştir. Ardından üzerlerine 5 µM'lık reaksiyon solüsyonu eklenmiş ve 40 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS ile 20 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
5. Hücre süspansiyonu mikropłaka okuyucuda (Ex = 532 nm / Em = 553 nm) analiz edilmiştir. Elde edilen görelı florens birimler (RFU) değeri, bilimsel geçerlilik açısından istatistiksel olarak değeriendirilmiş ve raporlanmıştır.

3.4.6. Geçirgenlik testleri

Model oluşturulduktan sonra model başarısını ölçmek için; kan dolaşımı sırasında damar çeperlerinden rahatlıkla geçerek dokulara nüfuz edebilen Kafein (C0750, Sigma-Aldrich, ABD) ile, çeper geçişinin çok daha düşük olduğu bilinen Sükroz (S1888, Sigma-Aldrich, ABD) molekülleri sistemde sirküle edilmiştir. Bunun için sistemdeki besi ortamı uzaklaştırılarak GFM içerisine kafein (100 µg/mL) ve sükroz (100 mg/mL) eklenerek 60 dk boyunca luminal yüzeyden, biyoreaktör gövdesine maddelerin geçmesi beklenmiştir. Ardından biyoreaktör gövdesindeki besi ortamından (abluminal kısım) ve sistemde sirküle edilen ortamdan (luminal kısım) örnek alınarak sükroz ve kafein varlığı HPLC cihazı (1260 Infinity II, Agilent Technologies, Inc., ABD) ile Ege-MATAL bünyesinde analiz edilmiştir.

Abluminal kısma geçen madde konsantrasyonunu hesaplamak için ilk olarak kafein ve sükroza ait kalibrasyon eğrilerinin belirlenmesi gerekmiştir. Referans moleküllerin stok solüsyonlarının enjeksiyonuyla elde edilen alan değerlerinin (mAU), derişime (µg/mL) oranlanması ile istenilen eğriler elde edilmiştir.

Kafeine ait kalibrasyon eğrisini çıkartmak için; standart çözeltiden stok solüsyonlar hazırlanmış (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 25000, 50000 ve 100000 ng/mL), bu solüsyonlar Agilent Eclipse Plus C18 (4,6×250 mm, 5 µm partikül) kolonda, 274 nm dalga boyunda, diyot dizi dedektörü (DAD) kullanılarak, mobil fazda geçirilmiştir. Enjeksiyon ortamı için %85 H₂O ve %15 asetonitrilden (ACN) oluşan (v/v) sıvıdan 5 µL alınarak, 1 mL/dk akış hızında 40 °C fırın sıcaklığındaki kolonda yürütülmüştür.

Sükroza ait kalibrasyon eğrisi çıkartmak için ise; standart sükroz çözeltisinden oluşturulan solüsyonlar (100, 250, 500, 1000, 2500 ve 5000 µg/mL) Waters Spherisorb NH2 (4,6×250 mm, 5 µm partikül) kolondan 195 nm dalga boyunda DAD kullanılarak mobil fazda geçirilmiştir. Enjeksiyon ortamı %75 H₂O ve %25 asetonitrilden (ACN) oluşturulmuş (v/v), 20 µL enjeksiyon hacmiyle, 1.5 mL/dk akış hızında 40 °C fırın sıcaklığındaki kolonda yürütülmüştür.

Numunelerdeki kafein ve sükroz konsantrasyonları, elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Numunelerin hazırlanmasında herhangi bir seyreltme uygulanmamıştır. Abluminal kısma geçen madde miktarını tespit etmek için hem luminal hem de abluminal kısımdan alınan örnekler aşağıdaki formüle göre hesaplanarak moleküllerin permeabilite değerleri elde edilmiştir.

Permeabilite değeri (P) =

$$\frac{\text{Abluminal kısımdaki besi ortamı hacmi (V)} \times \text{Abluminal kısımdaki madde konsantrasyonu değişimi } (\Delta[C]_a)}{\text{TBS'nin yüzey alanı (A)} \times \text{Luminal kısımdaki madde konsantrasyonu } ([C]_l) \times \text{Madde geçiş zamanı } (\Delta t)}$$

3.4.7. İstatistiksel analiz

İstatistiksel ve bilimsel anlamlılık için tüm deneyler en az üç tekrarlı yapılarak, elde edilen tüm kantitatif verilerin öncelikle normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk analizi ile belirlenmiştir. Normal dağılıma uyan ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırıldığı veriler arasındaki istatistiksel farklar tek yönlü ANOVA (varyans analizi) yöntemi ile, %95 güven aralığında ($p \leq 0.05$) değerlendirilmiş ve gruplar arasında ikili ilişkiler uygun çoklu karşılaştırma (post – hoc) yöntemiyle saptanmıştır. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırıldığı veriler için uygun parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanılarak istatistiksel analizler yapılmıştır. Gerçekleştirilen bütün istatistiksel analizler IBM SPSS 11 (IBM, ABD) programı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Statik TBS Üzerinde Hücre Davranışlarının İncelenmesi

Hücrelerin TBS yüzeyinde gösterdiği davranışların incelenmesi üç farklı süreçte (statik, modifikasyon sonrası, dinamik) gerçekleştirilmiş olup, öncelikle hücrelerin statik TBS yüzeyine tutunma ve sağ kalım süresi ortaya çıkarılmıştır.

4.1.1. Hücre ekim yönteminin belirlenmesi

Hücrelerin TBS üzerine nasıl ekileceği üzerine yapılan çalışmalar sonucunda dinamik yöntemle ekim sırasında;

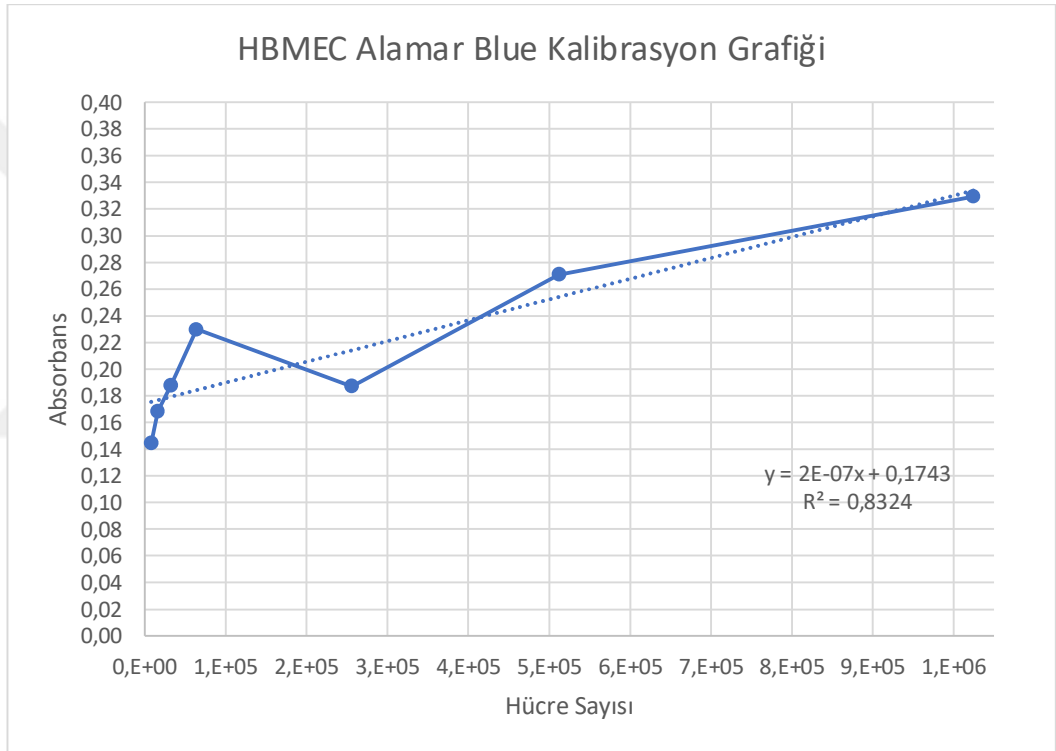
- Besi ortamı ile TBS yüzeyine taşınan hücrelerin, sistemdeki hareketi sırasında hücre kaybı yaşanması,
- Sistemdeki havanın tamamen boşaltılamaması ve bu nedenle hücrelerin TBS yüzeyinin tamamına getirilmesinin başarılamaması,
- Ekim sırasında yaşanan sistemsel zorluklar nedeniyle aseptik şartlarda biyogüvenlik seviye II kabin içerisinde çalışmanın zorlaşması,
- Bu yaşanan zorlukları gidermeye çalışırken sterilitenin tehlikeye girmesi,
- SEM ve Live&Dead sonuçları incelendiğinde, hücrelerin akışla birlikte tutunma veriminin statik ekime göre düşük olması nedeniyle dinamik ekim yönteminden vazgeçilmiştir.

Kısım **3.3.5.1 TBS'ye hücre ekimi** başlığında açıklandığı şekilde HTBS oluşturma tekniği olarak statik ekim yapılmasına karar verilmiştir.

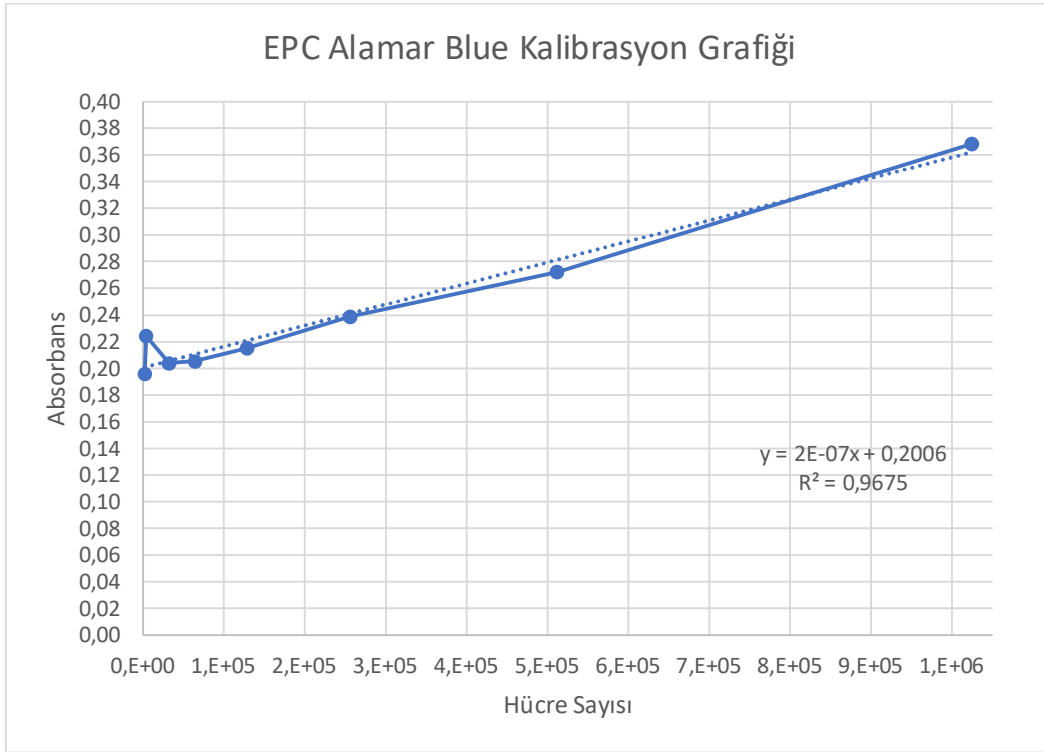
4.1.2. Hücre sağ kalım veriminin belirlenmesi

Sistemde kullanılması planlanan hücrelerin kültür ortamında üreme devamlılığının görülebilmesi ve kültür sınırlarının belirlenebilmesi için, 4 farklı endotel hücresi de TBS yüzeyine ekilerek **3.3.5.2 HTBS üzerinde hücre canlılığının belirlenmesi** başlığında anlatıldığı gibi kinetik Alamar Blue boyaması ile kinetik olarak takip edilmiştir.

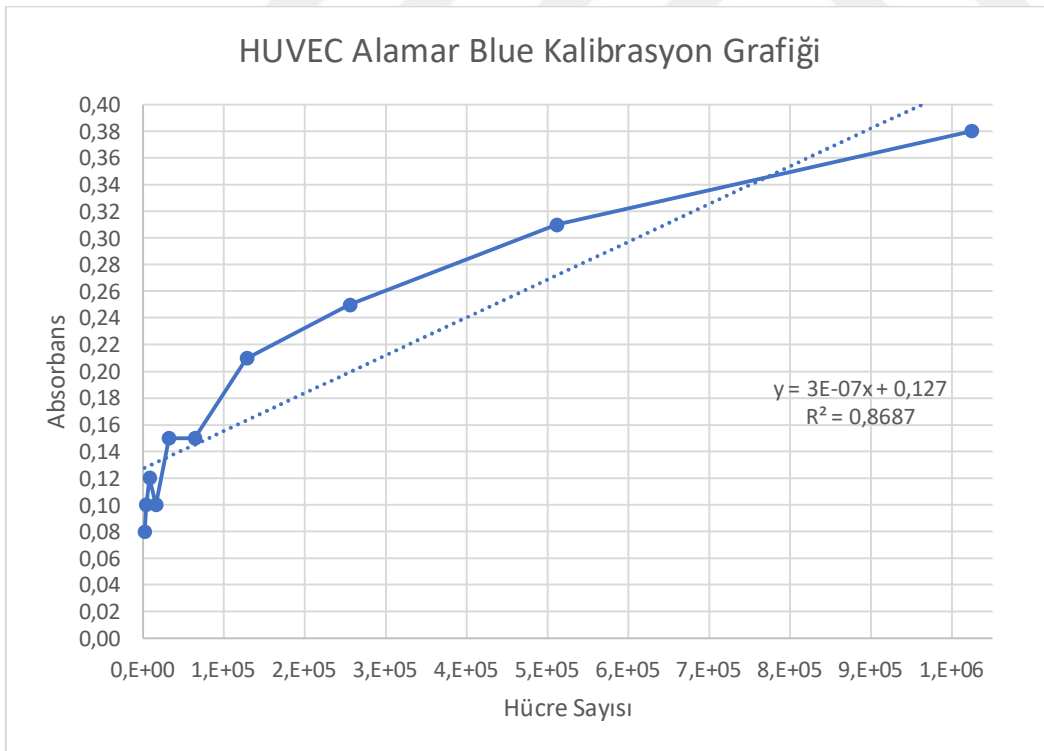
Bunun için öncelikle her hücre tipi için kalibrasyon eğrişi çıkarılmış, kültür ortamında hücrelerin üremesi bu kalibrasyonlar üzerinden değerlendirilmiştir. Bu basamakta farklı kültür sürelerinde sonuçlar değerlendirilmiş, hücre yoğunluğuna bağlı olarak 2 – 6 saat %10 boya solüsyonu içeren serumsuz besi ortamı ile hücrelerin inkübe edilebileceği görülmüştür (Bonnier et al., 2015). 2 – 4 – 6 saat için denemeler gerçekleştirilmiş, yüksek hücre sayılarında en tutarlı sonuçların 2 saat sonucunda alındığı görülmüştür. Absorbans okumaları bu aşamadan sonra 2 saatlik inkübasyon sonrasında gerçekleştirilmiş ve kalibrasyon grafikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1 – 4).



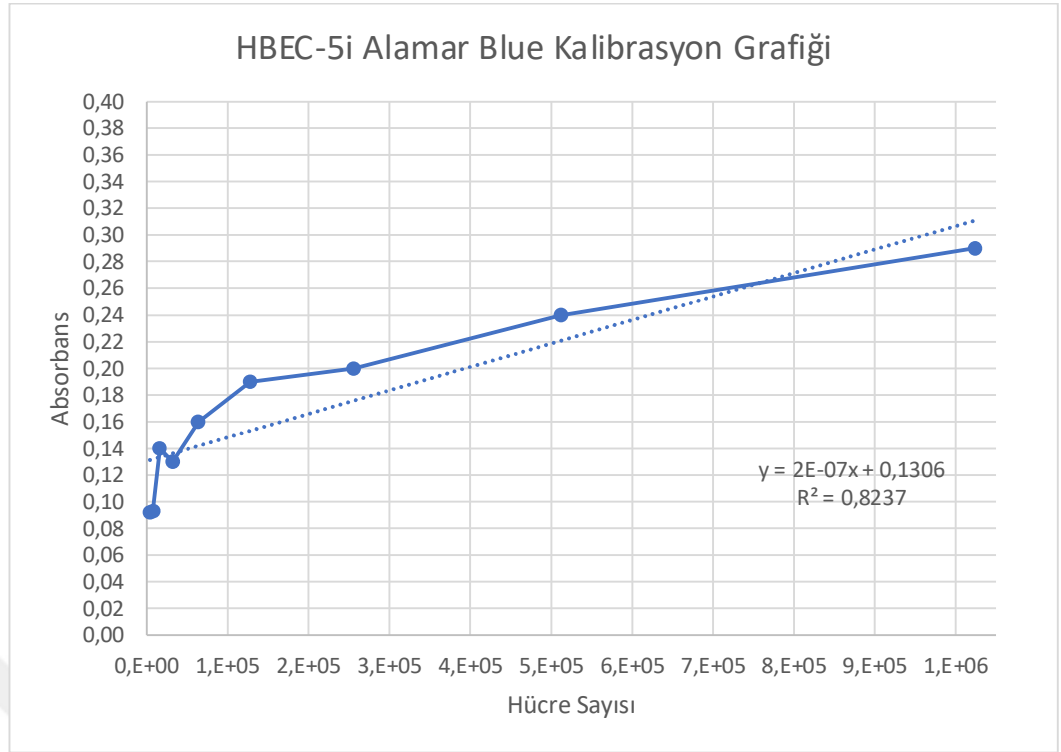
Şekil 4.1 HBMEC Alamar Blue kalibrasyon grafiği (2 saat).



Şekil 4.2 EPC Alamar Blue kalibrasyon grafiği (2 saat).



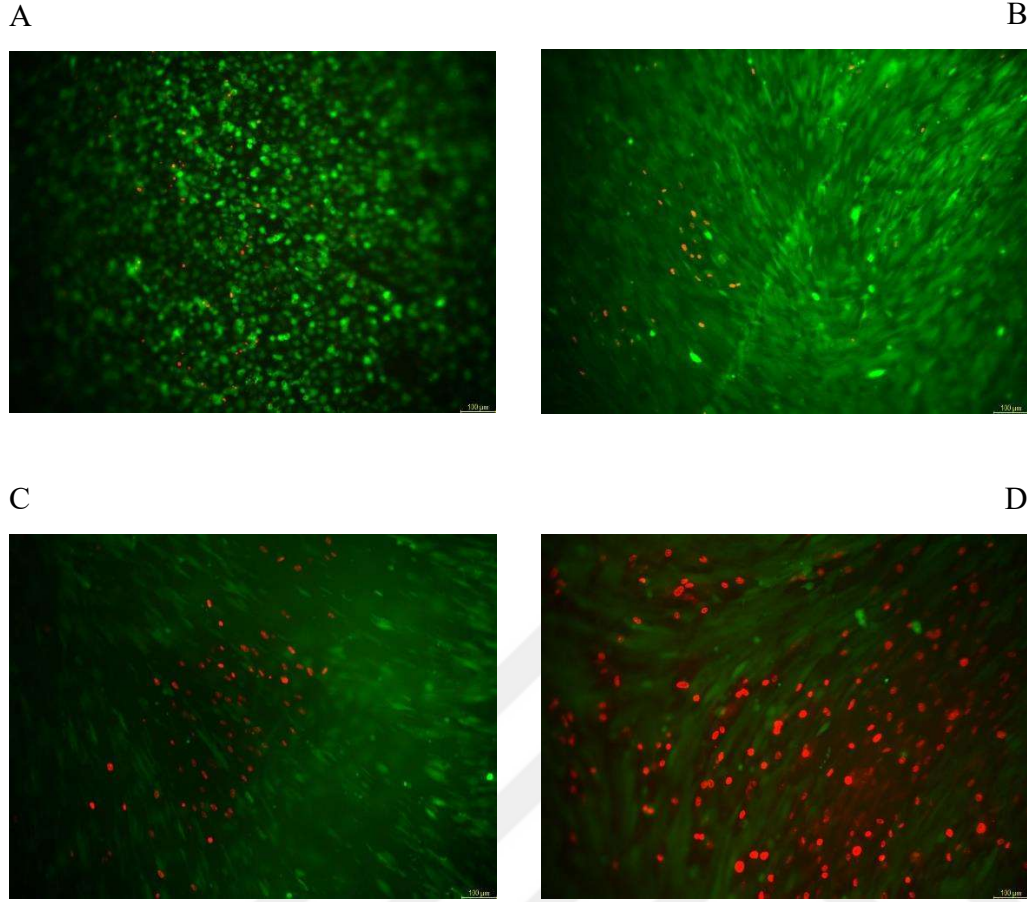
Şekil 4.3 HUVEC Alamar Blue kalibrasyon grafiği (2 saat).



Şekil 4.4 HBEC-5i Alamar Blue kalibrasyon grafiği (2 saat).

Dört hücre tipi için de kalibrasyonların yapılmasının ardından 15 gün boyunca hücreler TBS yüzeyinde inkübe edilmiş, her gün Alamar Blue boya solüsyonunun hücreler tarafından 2 saat boyunca metabolize edilmesi beklenmiş ve boya solüsyonu çekilerek GFM eklenmiştir. Metabolize olan boya solüsyonu mikro plaka okuyucuya alınarak absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Bu deneme sonucunda hücrelerin 15 gün boyunca TBS yüzeyinde canlı kaldıkları, 5. – 7. günde maksimum hücre sayısına ulaştıkları ve 8. – 10. günden itibaren alan stresinden dolayı ölmeye başladıkları görülmüştür.

Bu ölçümlerin görsel doğrulaması için hücrelere **3.3.5.1 TBS'ye hücre ekimi** başlığında anlatıldığı gibi Live&Dead boyaması yapılmış, Alamar Blue sonuçlarıyla tutarlı olarak 10. günden hücrelerin ölmeye başladığı, 15. günde ölü hücre sayısında belirgin bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 HBMEC’lerin TBS üzerindeki Live&Dead boyama sonuçları. A – 1. Gün, B – 5. Gün, C – 10. Gün, D – 15. Gün fotoğrafları. Ölçek çizgileri 100 μm ’ye denk gelmektedir.

Statik TBS üzerindeki bu denemeler sonucunda hücrelerin 10 günden fazla kültürde tutulmamasına, en verimli sonuçların alınabildiği 5. gün ile denemelerin devam etmesine karar verilmiştir.

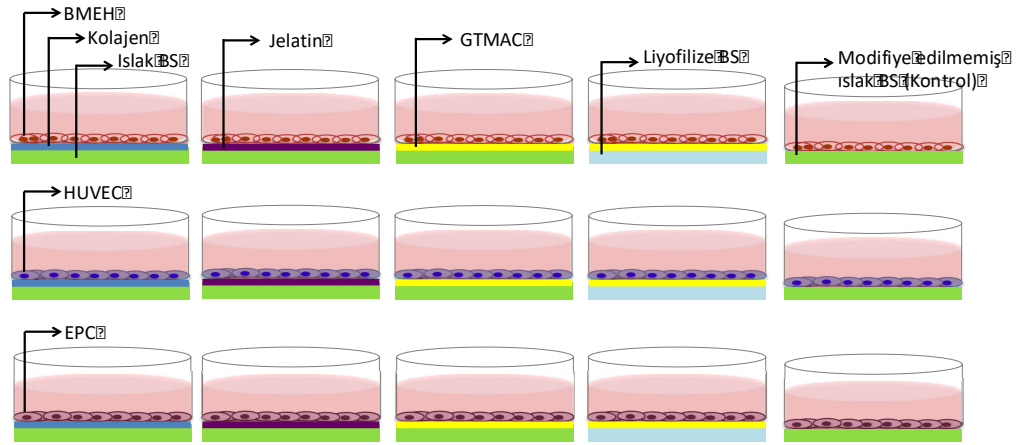
4.2. TBS Modifikasyon Başarısının İncelenmesi

Daha önceki denemelerde hücrelerin BS yüzeyine tutunma eğilimleri ve sağ kalım oranları gözlemlenmiş, inkübasyon sırasında bu çalışmada planlanan kültür sürelerinden daha kısa bir süre sonra (3 – 5 gün) yüzeyden kalkmaya başladıkları görülmüştür (Bayir, 2018). Bu nedenle biyoreaktör denemelerine geçmeden önce, TBS yüzeyinde çeşitli modifikasyonlar denenerek hücrelerin daha iyi tutunabilmesi sağlamak ve akış etkisi altında süpürülmelerini engellemek amaçlanmıştır.

İlk deneme grupları, hücre tutunma etkinliğinde artış gösterdiği bilinen doğal polimerler olan Tip-1 Kollajen ve Jelatin (Lizundia et al., 2016; Ramos et al., 2016) ile yüzeyin kaplanmasıyla oluşturulmuştur. Ayrıca selülozu katyonikleştirerek, hücre membran yüküyle fiziksel bir etkileşime giren hücrelerin, yüzeye tutunma verimini %70 oranında artırdığı raporlanan GTMAC molekülünün (Courtenay et al., 2018; Zaman et al., 2012) TBS ile reaksiyonu sonucu, yüzeyin kimyasal yapısının değiştirilmesi planlanmıştır.

Doğal polimerlerle kaplanan (jelatin ve kolajen) ıslak TBS, susuzlaştırılmış ve liyofilize olarak GTMAC ile kimyasal olarak fonksiyonelleştirilmiş TBS iskelelerin üzerine 3 farklı tip hücre ekilerek farklı modifikasyonların farklı hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bütün gruplar, kontrol grubu olan modifikasyon yapılmamış TBS ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.6).

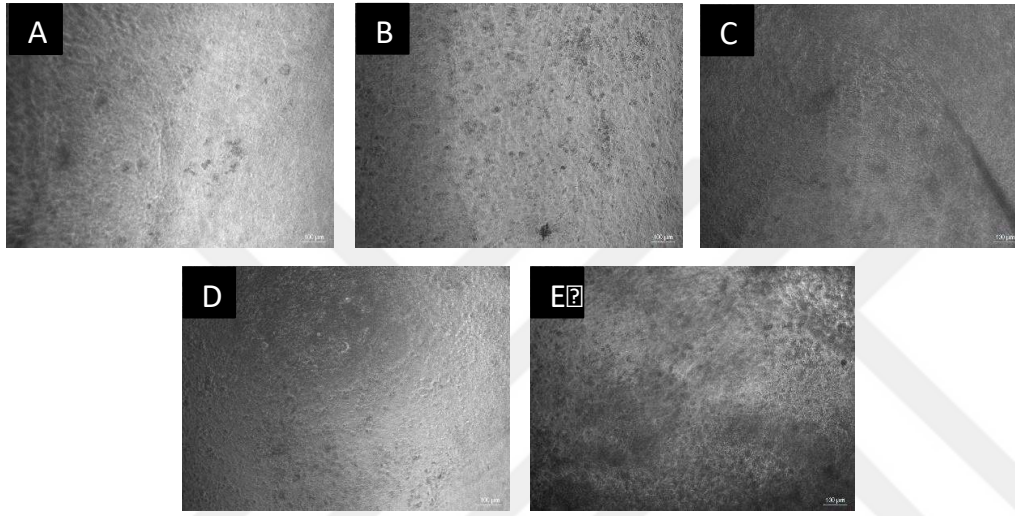
GTMAC ile kimyasal modifikasyonun gerçekleşip ise ATR-FTIR spektroskopisi ile belirlenmiştir. Modifikasyon etkilerinin izlenebilmesi için öncelikle hücreler 10 gün boyunca ters faz ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Bu günlerde hücreler arası bağlantıların gözlenebilmesi için her gün TEER ölçümü yapılmıştır.



Şekil 4.6 TBS doku iskelelerinin farklı malzemeler (tip 1 kolajen, jelatin ve GTMAC) ile yüzey modifikasyonu denemelerinin farklı hücreler (HBMEC, HUVEC ve EPC) üzerindeki etkilerinin incelenmesi.

4.2.1. Modifiye TBS yüzeyine hücre tutunma veriminin görsel takibi

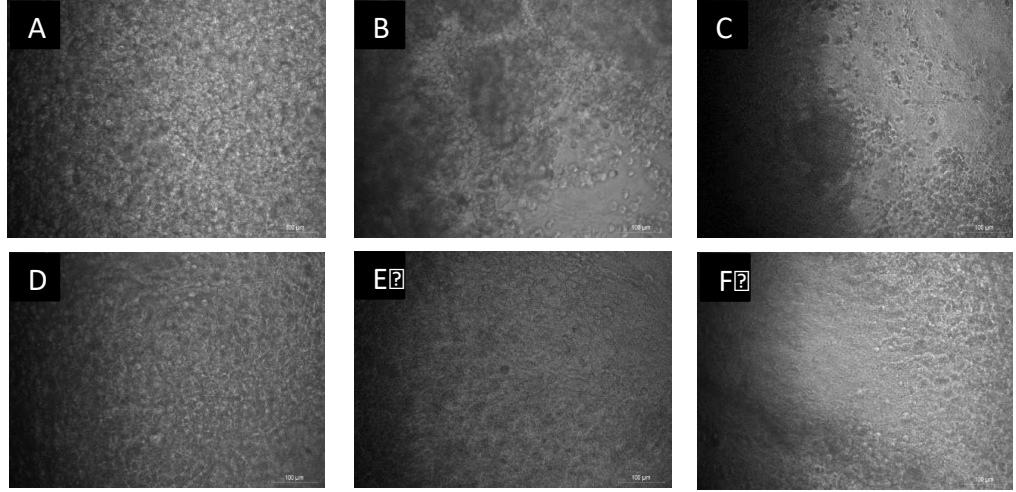
3.3.5.3. TEER ölçümü başlığında açıklandığına üzere kesilerek CellCrown™'lara tutturulan ve sonrasında ekim yapılan bakteriyel selülozlara (BS), hücrelerin tutunma veriminin izlenebilmesi için; 10 günlük kültür süresi boyunca her gün hücreler ters faz ışık mikroskobu altında incelenmiş, kaplamaların ve hücrelerin davranışları kaydedilmiştir (Şekil 4.7).



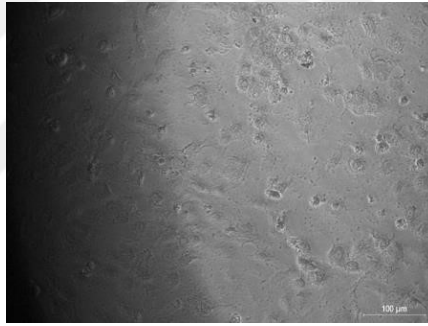
Şekil 4.7 HBMEC'lerin 10.gün fotoğrafları. A. Kontrol BS, B. Kolajen kaplı BS, C. Jelatin kaplı BS, D. GTMAC ile modifiye edilmiş ıslak BS ve E. GTMAC ile modifiye edilmiş liyofilize BS.

Ölçek çizgileri 100 µm'ye denk gelmektedir.

Doğal polimerle kaplı BS'lerin üzerinde EPC ve HUVEC'ler için artan bir hücre tutunması ve çoğalması görülmüşse de bu kaplamaların zamanla kalkmaya başladığı ve hücrelerin de bu kalkan tabaka ile uzaklaştığı görülmüştür (Şekil 4.8). Statik durumdaki BS üzerinden uzaklaştıkları için, bu kaplamaların akış etkisiyle süpürüleceği düşünülerek bu çalışma için uygun olmadığı belirlenmiştir. Kimyasal olarak fonksiyonelleştirilmiş GTMAC modifiyeli selülozlar üzerinde ise hücre morfolojileri görülebilmiş, (Şekil 4.9) doğal polimerle kaplanan grupların aksine hücrelerin süpürüleceğine dair bir gözlem gerçekleştirilmemiştir.



Şekil 4.8 Üst sıra, kolajen kaplı BS üzerinde EPC hücrelerinin zamanla uzaklaşması. A: 5. gün, B: 6. gün ve C: 8. gün ters faz ışık mikroskobu fotoğrafları. Alt sıra, jelatin kaplı BS üzerinde HUVEC hücrelerinin zamanla uzaklaşması. D: 7. gün, E: 8. gün ve F: 9. gün ters faz ışık mikroskobu fotoğrafları. Ölçek çizgileri 100 µm'ye denk gelmektedir.



Şekil 4.9 GTMAC ile modifiye edilmiş liyofilize BS üzerinde HBMEC morfolojisi. 3. gün ters faz ışık mikroskobu fotoğrafı, ölçek çizgisi 100 µm'ye denk gelmektedir.

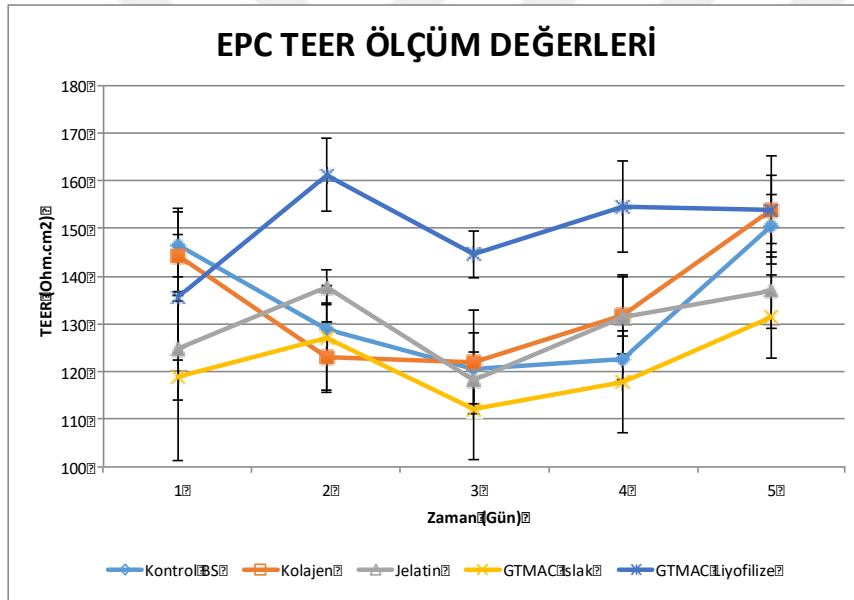
4.2.2. Modifiye TBS yüzeyindeki hücrelerin TEER ölçümleri

Hücrelerin selüloz yüzeyine daha iyi tutunarak yapacakları (AJ) ve daha fazla üredikleri için kendi aralarında yapacağı (TJ) protein bağlantılarının varlığını ölçebilmek amacıyla, TEER ölçümü yapılmış, TBS modifikasyonlarına hücrelerin verdiği yanıtların nicel olarak kaydedilmesi planlanmıştır.

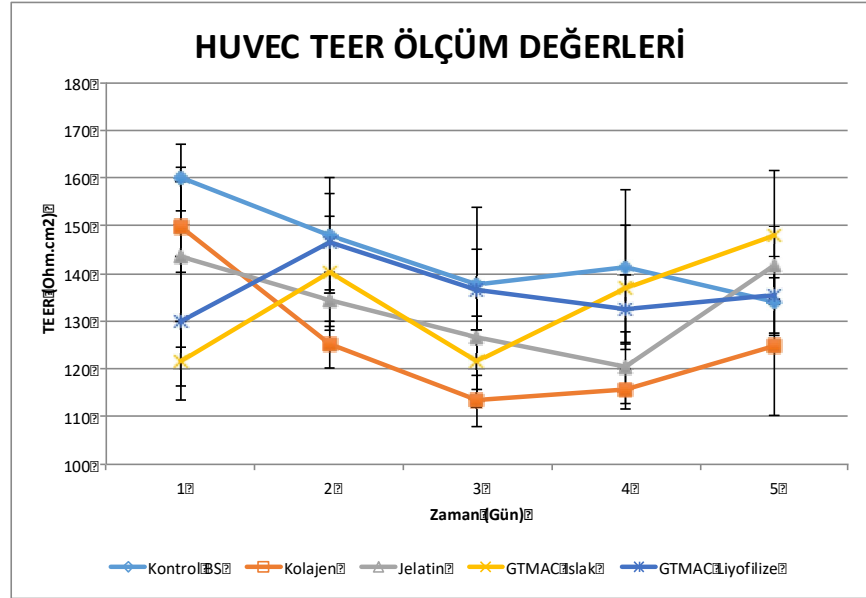
TEER ölçüm sonuçlarından elde edilen grafikler Şekil 4.10 – 12'de verilmiştir. Grafiklerde görüleceği üzere 5 günlük inkübasyon süresi boyunca EPC ve HBMEC'ler için en yüksek TEER değerlerinin GTMAC ile modifiye edilmiş

liyofilize BS'de, HUVEC'ler için ise kontrol BS grubunda elde edildiği belirlenmiştir. Morfolojik incelemelerde görüldüğü üzere, HUVEC en iyi kontrol BS üzerinde morfoloji gösterirken, HBMEC'ler en iyi morfolojiyi GTMAC ile modifiye edilmiş liyofilize BS üzerinde göstermektedir (Şekil 4.13). Bu nedenle TEER sonuçlarının ışık mikroskobu ile gerçekleştirilen gözlemlerle örtüştüğü düşünülmektedir.

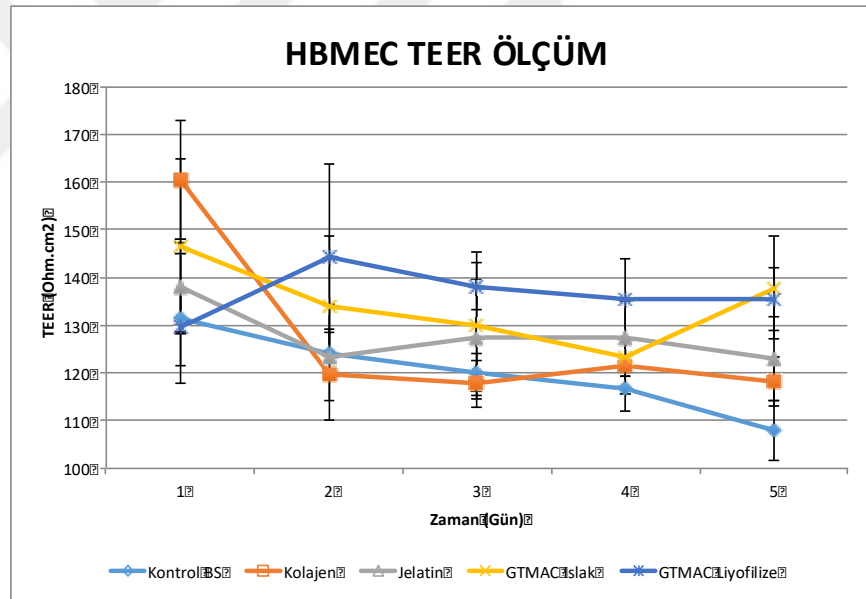
Günlük TEER ölçümleri sırasında HBMEC'lerin kontrol grubuna göre daha az da olsa süpürülerek BS üzerinden uzaklaştığı belirlenmiştir. Buna rağmen TEER değerleri incelendiğinde yüzeyi tamamen kaplamış olan EPC ve HUVEC'lerden elde edilen veriler yüzeyi tamamen kaplamamış olan HBMEC'ler ile benzer sonuçlar verdiği görülmüştür.



Şekil 4.10 EPC'lerin 5 günlük kültivasyonu sonucunda elde edilen TEER değerleri.



Şekil 4.11 HUVEC'lerin 5 günlük kültivasyonu sonucunda elde edilen TEER değerleri.



Şekil 4.12 HBMEC'lerin 5 günlük kültivasyonu sonucunda elde edilen TEER değerleri.

BS'yi doğal polimerle kaplama ve kimyasal olarak modifiye etme çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular altta özetlenmiştir:

- İnkübasyon süresi arttıkça kolajen ve jelatin kaplamaların BS yüzeyinden ayrıldıkları, bunun sonucunda bu kaplamalara tutunmuş olan hücrelerin de uzaklaştıkları belirlenmiştir. Statik kültür sırasında

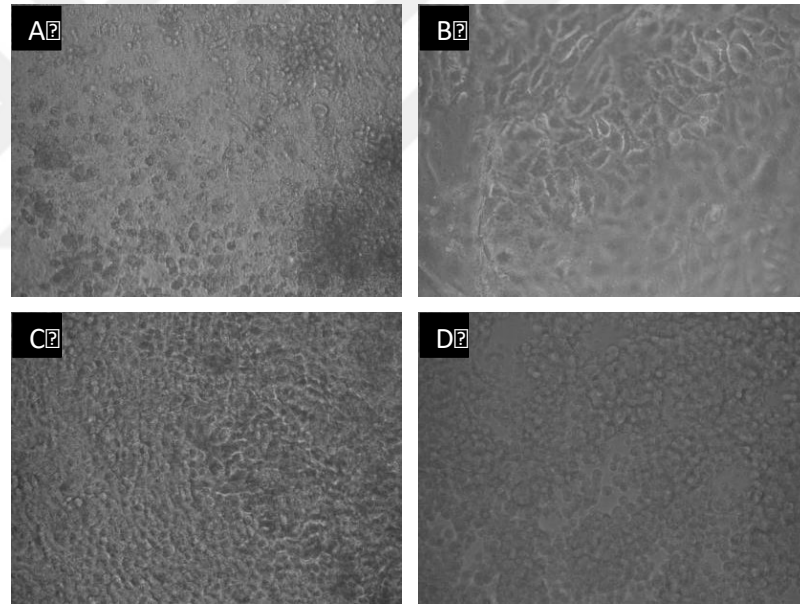
gözlemlenen bu kalkmanın, akış etkisi altında da gerçekleşeceği düşünüldüğünden, kolajen ve/veya jelatin kaplama yapılmasının bu çalışma için uygun olmadığına karar verilmiştir.

- GTMAC ile modifiye edilen gruplardan, liyofilize edilmiş BS'de HBMEC'lerin morfolojik olarak en iyi sonucu gösterdiği düşünülmektedir. Liyofilize BS'nin GTMAC ile modifikasyonunun daha başarılı gerçekleşmesi, daha önce açıklandığı üzere yan reaksiyonların, tamamen susuzlaştırılmış (liyofilize) selüloz üzerinde gerçekleşmeyeceği düşünüldüğünden beklenen bir durumdur (Bkz. **3.1.3.3 GTMAC ile yüzey modifikasyonu**). Ancak liyofilizasyon sırasında esnekliğini kaybederek incelen BS'nin, dinamik modelde istenen mekanik dayanıma sahip olamayacağı ve hipertansiyon modeli için gerekli olan dairesel germenin bu iskelede modellenemeyeceği düşünüldüğünden, GTMAC modifikasyonunun ıslak BS'nin kuru hava ile susuzlaştırılmasıyla gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.
- EPC'lerin tüm BS tipleri üzerinde; yüzeye yayılmayan, yuvarlak bir morfoloji gösterdiği, sıkı bir şekilde yüzeye tutunmadıkları, hücreler arası mikroskop altında dahi gözlemlenebilen boşluklar olduğu görülmüş, birbirleri ile sıkı bağlantı (TJ) yapmadıkları belirlenmiş, bu sebeple bu çalışma için uygun hücreler olmadıklarına karar verilmiştir.
- HUVEC'lerde; özellikle kolajen kaplı BS iskele ve kontrol gruplarında endotel hücre morfolojisi görülmüş ve istenilen TJ ve AJ proteinlerini salgılayabilecekleri düşünülerek HUVEC'ler ile denemelere devam edilmesine karar verilmiştir.
- Primer hücre olarak temin edilen HBMEC'lerin BS grupları üzerinde tam yayılım göstermemesi ve kültür koşullarında zamanla morfolojilerini terk ederek yüzeyden kalkmaları nedeniyle bu çalışma için uygun olmadıkları görülmüştür. HBMEC'lerin yerine, yine insan mikrovasküler endotel hücresi olan; ölümsüzleştirilmiş hücre hattı HBEC-5i'ler ile denemelere devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2.3. TBS modifikasyonunun optimizasyonu

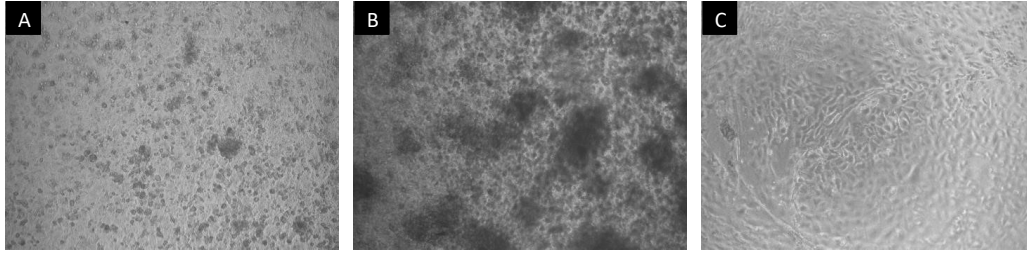
Daha önceki veriler ışığında, modifikasyon şekline ve kullanılacak hücreye karar vermek için çalışmaya daha önce iyi sonuç alınan iki tip iskeleye (DMSO ile susuzlaştırılarak modifiye edilen BS ve sadece kuru hava ile susuzlaştırılmış BS) hücre ekimi (1×10^6 hücre/cm²) gerçekleştirilerek devam edilmiştir. HUVEC ve HBEC-5i'lerin BS yüzeyinde gösterdikleri morfoloji 5 gün boyunca ters faz ışık mikroskopunda yapılan gözlemlerle takip edilmiştir.

HBEC-5i'lerin ilk günden itibaren kontrol grubuna kıyasla, diğer selüloz yüzeylerine daha iyi tutunma gösterdiği ancak özellikle sadece kuru hava ile susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen iskele üzerinde tutunma ve morfoloji konusunda en iyi sonucu verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.13 – B).



Şekil 4.13 Hücrelerin 1. gün ters faz ışık mikroskobu görüntüleri (20X). HBEC-5i'lerin A. Kontrol BS ve B. Susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilmiş BS üzerindeki morfolojileri. HUVEC'lerin C. Kontrol BS ve D. Susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilmiş BS üzerindeki morfolojileri. (Büyütme 5x).

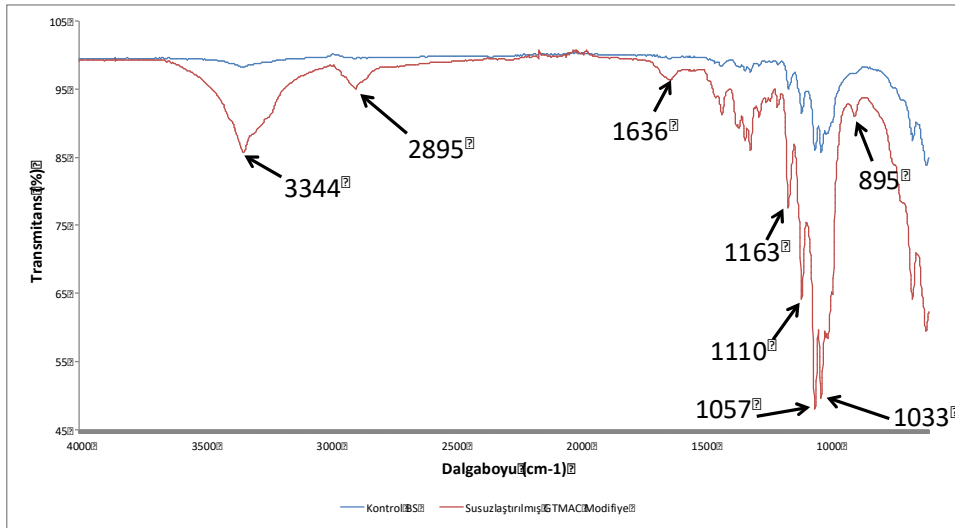
HUVEC'ler ise kontrol grubuna ilk günden itibaren tutunmuşsa da modifiye selüloz yüzeyinde belirli bölgelere tutunarak adacıklar oluşturmuştur (Şekil 4.14).



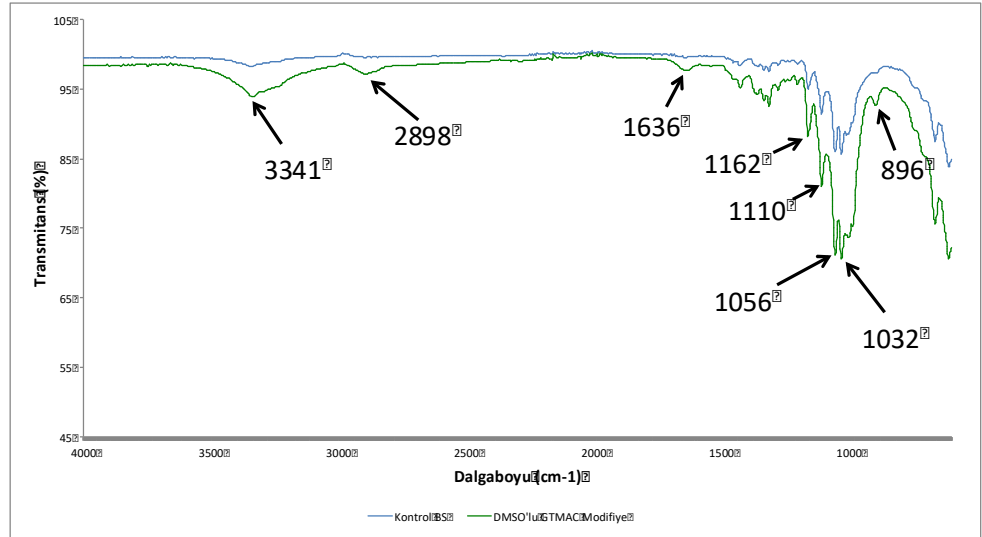
Şekil 4.14 A. Kontrol BS, B. DMSO varlığında GTMAC ile modifiye edilmiş BS, C. Susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilmiş BS üzerinde kültüre edilen HUVEC'lerin 5. gün ters faz ışık mikroskobu fotoğrafları (10X).

4.2.4. Modifikasyon başarısının ATR-FTIR ile tespiti

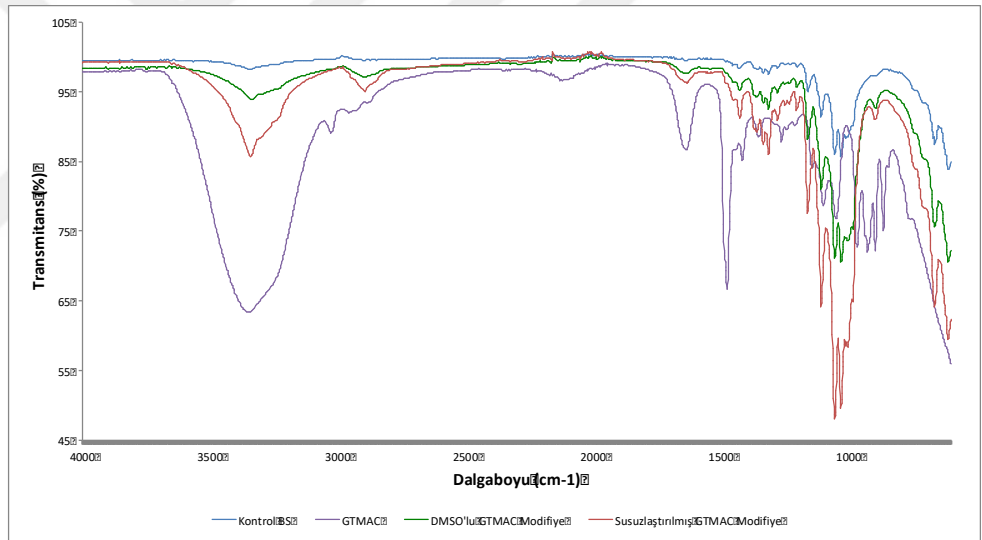
Modifikasyonun başarısı ATR-FTIR cihazı (Perkin Elmer Spectrum Two, ABD) yardımı ile incelenmiştir. Modifiye edilen iki tip BS ve kontrol BS kesilip açılarak inkübatörde (37 °C) bir gece bekletilip tamamen kurutulmuş, böylece örnekler FTIR analizine hazır hale getirilmiştir. Şekil 4.15'de Kontrol BS ile sadece kuru hava susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS'nin, Şekil 4.16'da Kontrol BS ile DMSO yardımıyla susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS'nin, Şekil 4.17'de ise tüm BS türlerinin ve GTMAC kimyasalının karşılaştırmalı FTIR spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.15 Kontrol BS ile kuru havayla susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS'nin FTIR spektrumları



Şekil 4.16 Kontrol BS ile DMSO yardımıyla GTMAC ile modifiye edilen BS'nin FTIR spektrumları.



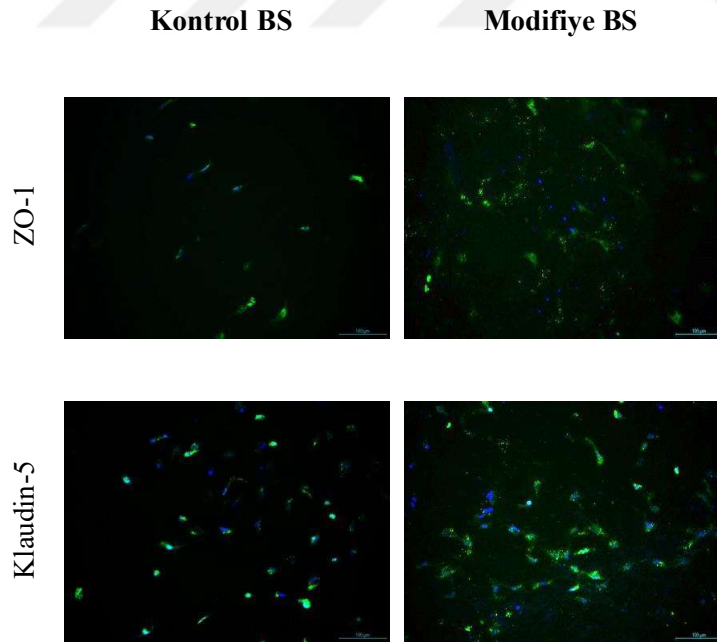
Şekil 4.17 Kontrol BS, kuru hava ile susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS, DMSO ile susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS ve saf GTMAC'ın FTIR spektrumları.

Modifiye edilen BS'lerde hidroksil grubunun (-OH) gerilmesinden kaynaklanan güçlü bir bant $3341 - 3344 \text{ cm}^{-1}$ dalga boylarında ortaya çıkmıştır (Sarwar Jahan et al., 2012; Zaman et al., 2012) $2895-2898 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler, simetrik C-H titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Sarwar Jahan et al., 2012; Sun et al., 2002; Zaman et al., 2012). 1636 cm^{-1} 'de görülen bant, modifiye edilmemiş BS'nin absorbe edilen neminden kaynaklanmıştır. $895 - 896 \text{ cm}^{-1}$ 'deki pik, glikoz birimleri arasındaki glikosidik bağın C - H deformasyon modundan kaynaklanmaktadır

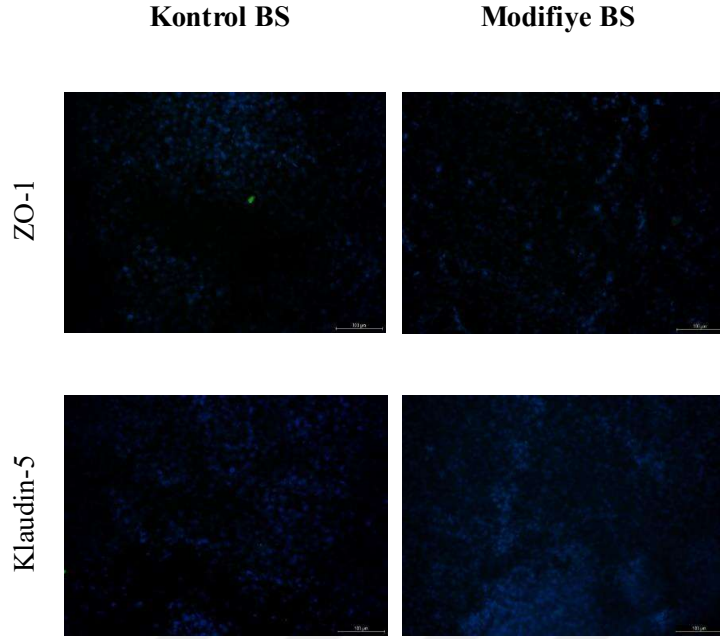
(Kačuráková et al., 2002; Ren et al., 2006; Zaman et al., 2012). 1030 cm^{-1} ila 1163 cm^{-1} arasındaki pikler BS'deki ana eter bantlarındaki C – O gerilmesinden kaynaklanır. Bu bölgedeki ana eter bantlarının yoğunluğundaki artış, BS'nin GTMAC ile modifiye edildiğine dair kanıt sağlar (Z. Liu et al., 2010; Zaman et al., 2012). Bu veriler doğrultusunda BS'nin sadece kuru hava susuzlaştırılarak, DMSO'lu yöntemden daha başarılı şekilde GTMAC ile modifiye edildiği görülmüştür.

4.2.5. Modifiye HTBS'lerin IF boyamaları

Modifiye edilen iskeleler üzerinde, endotel hücrelerinin gerçekçi bir damar modelinde olması gerektiği gibi sıkı bağlantı (TJ) oluşturup oluşturmadıklarını incelemek amacıyla inkübasyonun 5. gününde IF boyamalar gerçekleştirilmiştir. Hücreler arası sıkı bağlantı proteinleri olan ZO-1 ve Klaudin-5'in boyamaları, önceki gözlemlerde en iyi sonuçları verdikleri için sadece kuru hava susuzlaştırılarak GTMAC ile modifiye edilen BS iskelelerde ve kıyaslamak için kontrol BS iskelelerde yapılmıştır (Şekil 4.18 – 19).



Şekil 4.18 Modifiye edilmemiş ve edilmiş BS üzerinde HBEC-5i'lerin sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1 ve Klaudin-5) gösterilmesi. DAPI (mavi) ve antikor boyamalar (yeşil) floresans mikroskop altında gözlemlenmiştir. Ölçek çizgileri $100\text{ }\mu\text{m}$ 'ye denk gelmektedir.



Şekil 4.19 Modifiye edilmiş BS üzerinde HUVEC'lerin sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1 ve Klaudin-5) gösterilmesi. DAPI (mavi) ve antikor boyamalar (yeşil) floresans mikroskop altında gözlemlenmiştir. Ölçek çizgileri 100 μ m'ye denk gelmektedir.

HBEC-5i'ler ile gerçekleştirilen IF sonuçları incelendiğinde kontrol BS üzerinde bile sıkı bağlantıların varlığı görülebilmektedir (Şekil 4.18). Ancak modifiye BS'ler üzerinde kültive edilen HBEC-5i'ler incelendiğinde morfolojilerinin kontrol BS'ye göre çok daha iyi olduğu ve daha yüksek miktarda sıkı bağlantı proteini sentezledikleri görülmektedir.

Ayrıca yüzeyi tamamen kapladığı bilinen HUVEC'ler ile yapılan IF boyamalarda hiçbir sıkı bağlantı proteininin varlığı görülmemiş yalnızca DAPI ile çekirdekler boyanabilmiştir (Şekil 4.19). Bu denemeler sonucunda HUVEC'lerin tez çalışması için kullanılmaması gerektiğine karar verilmiştir.

Tüm BS modifikasyon ve hücre seçim denemeleri sonucunda nihai olarak BS'nin yalnızca kuru hava ile susuzlaştırılarak (%35) GTMAC ile modifiye edildikten sonra doku iskelesi olarak kullanılmasına ve HBEC-5i hücreleri ile tez çalışmasına devam edilmesine karar verilmiştir.

4.3. Biyoreaktör Parçalarının Üretimi

Biyoreaktörde kullanılacak parçaların kullanım kolaylığı gözetilerek gerçekleştirilen tasarımlarının fiziksel forma dönüştürülmesi sırasında kullanılacak malzeme adayları; steril edilebilirlik, paslanmazlık, sızdırmazlık ve biyouyumluluk kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

4.3.1. Otoklav dayanım testleri

Biyoreaktörde kullanılması planlanan bütün malzemeler 121 °C’de 15 dakika boyunca otoklavlanmış ve deformasyona uğramamaları beklenmiştir. Bu denemeler sonunda borosilikatlı cam ve pleksiglas tüpler, 316L çelik malzemeler ve iki farklı silikon conta malzemenin hepsi aynı ölçülerde ve dayanımda sterilizasyondan çıkmış ve kullanıma uygun bulunmuştur. Ancak pleksiglas gövdenin yumuşamaya müsait olduğu ve zaman içerisinde fiziksel yapısından ödün vererek sızdırmaya yol açabileceği düşünülmüş, bu nedenle gövde malzemesi olarak borosilikatlı cam kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.2. Korozyon dayanım testi

Biyoreaktörün ana parçaları için 316L çelik malzeme kullanılmasına karar verilmiş, üretimi gerçekleştirilen çeliğin istenilen kalitede paslanmaz çelik olduğu test edilmiştir. Bu nedenle bakır sülfat ile korozyon dayanım testi **3.2.1.1 Bakır sülfat testi ile korozyon direncinin gözlenmesi** başlığında anlatıldığı üzere; çelik malzemeler için gerçekleştirilmiş, ASTM F1089 uyarınca sonuçlar değerlendirilmiş ve çelik malzemelerin herhangi birinde kırmızı leke veya çizikler görülmediği için paslanmazlık özelliklerini koruyacaklarından emin olunmuştur.

4.3.3. Malzemelerin sitotoksik etkilerinin gözlenmesi

Biyoreaktörde kullanılacak bütün malzemeler besi ortamı ve dolayısıyla hücrelerle temas edeceğinden sitotoksik etki göstermemelidir. Kullanılacak malzemelerin seçiminde oldukça önemli olan bu testler ISO 10993-5:2009 ve ISO 10993-12:2009 uyarınca **3.2.1.2 Kültür kabında hücre canlılığının belirlenmesi** başlığında anlatıldığı gibi MTT testi ile gerçekleştirilmiştir.

Bütün malzemeler steril edildikten sonra besi ortamı içerisine alınmış, 24 saat ekstraksiyon için bekletildikten sonra her malzemeden alınan ekstraktlar, üçer tekrarlı olarak 96 gözlü kültür kabına ekilmiş olan HBEC-5i hücrelerinin üzerine eklenmiş, üç günlük inkübasyonun ardından hücrelerin canlılığı MTT testiyle ölçülmüştür. Kontrol grubu ile deney grupları kıyaslandığı sonuçlar IBM SPSS 11 programında tek yönlü ANOVA testi ile analiz edilmiş, post-hoc yöntemi olarak Tukey seçilmiştir ($p < 0.05$).

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde conta malzemesi olarak kullanılacak silikonların ikisi de hücreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki göstermemiştir ($> \%85$). Malzemelerin otoklavlanabilirlikleri de kontrol edildikten sonra kullanılacak malzeme olarak Silikon 1 seçilmiştir. AISI 316L çelik malzemelerin de biyouyumlu olduğu bilindiğinden (Komorowski et al., 2020; Sunthornpan et al., 2018), malzeme seçim kriterlerini karşılayan; bağlantı hortumları, borosilikatlı cam, conta silikonu 1 ve 316L çelik ile biyoreaktör parçaların işlenmesine karar verilmiştir.

4.3.4. Parçaların işlenmesi

Biyoreaktör parçalarının malzeme seçimi tamamlandıktan sonra teknik resimlere uygun olarak işlenebilmeleri için Surgylight (Inter Medkom, Türkiye) firmasının tesisleri kullanılmış, temin edilen AISI 316L çelik çubuklar CNC-torna tezgahında teknik resimlerde belirtildiği şekilde işlenmiş, vida adımları açılarak parlatma adı verilen işlemle yüzey pürüzleri giderilmiştir.

Borosilikatlı cam gövdeler için Ege Teknopark bünyesindeki cam atölyesinden faydalanılmış, istenilen ölçü ve sağlamlıkta cam tüpler farklı uzunluklarda kestirilmiş ve ağız kısımları körleştirilerek contalara zarar vermeleri engellenmiştir.

Bütün parçalar işlendikten sonra sistemin kurulumu **3.4.1 Biyoreaktörün kurulumu** başlığında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş, peristaltik pompa ile sistem 5 gün boyunca en yüksek devirde akışla (100 rpm) test edilmiş, herhangi bir sızma tespit edilmemiştir.

4.4. CFD Analiz Sonuçları

Biyomekanik sinyallerin etkisini görebilmek için kurgulanan üç farklı akış rejiminin; gerçekçi bir *in silico* model ile hesaplanabilmesi için CFD analizlerinden faydalanılmıştır. Daha önce hesaplanan verilerin tutarlılığını test etmek amacıyla gerçekleştirilen denemelerde CAD modellemesi yapılan parçalar ve TBS'nin, ANSYS Fluent programında tanımlanması gerekmiştir. Bunun için sisteme tanıtılacak bütün malzemelerin fiziksel özellikleri belirlenerek (Tablo 4-1) yazılıma aktarılmıştır. Akış hızı, istenilen shear stress değerlerini (4 dyne/cm^2) (Booth et al., 2014; Cucullo et al., 2002, 2011; DeStefano et al., 2017; Kadry et al., 2020) elde edebilmek için sabit tutulmuş, Haagen-Poiseuille formülü (Tablo 3-2 – A) üzerinden hesaplanarak her akış için 0.185 mL/s olarak belirlenmiştir.

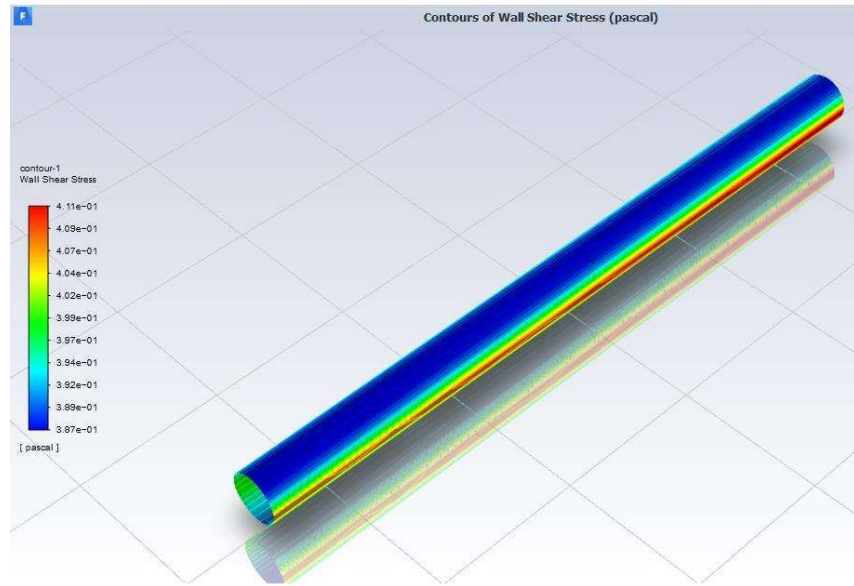
Tablo 4-1 CFD analizinde kullanılan malzemelerin özellikleri

Malzeme	Fiziksel Özellikleri
Boro silikatlı cam	Uzunluk = 10 cm Dış çap = $\varnothing 2.4 \text{ cm}$ İç çap = $\varnothing 2.3 \text{ cm}$
TBS (Bayir et al., 2019)	Young's Modulus = 447 MPa Poisson's Ratio = 0.01 Bulk Modulus = 152.04 MPa Shear Modulus = 221.29 MPa Uzunluk = 5 cm Dış çap = $\varnothing 0.4 \text{ cm}$ İç çap = $\varnothing 0.35 \text{ cm}$
Besi Ortamı (Poon, 2020)	Viskozite = 0.00095 Pa.s Yoğunluk = 1010 kg/m^3

Sabit akışta kasılıp gevşeme hareketinin olmaması beklendiği için, analizler gerçekleştirilirken ANSYS ortamında devamlı ve sabit bir akış etkisi tanımlanmış; sistolik ve hipertansiyon basınçlarında ise kasılıp gevşeme frekansları, TBS'nin bir bütün olarak boyunca kasılması (30 sn) ve gevşemesi (30 sn) ile oluşturulmuştur. Sabit akış sisteminde ortalama 45 mmHg basınç yaratıldığı, biyoreaktör üzerinde yapılan basınç ölçümleri ile belirlenmiştir. Biyoreaktör denemelerinde sistolik/normal sistem basıncının 120 mmHg ve hipertansiyondaki basıncın 180 mmHg olması planlandığı için sistem maksimumda bu basınçlara erişecek şekilde simüle edilmiştir. *In silico* denemeler bu basınç değerleri üzerinden diferansiyel matematiksel modeller kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar formül üzerinden gerçekleştirilen hesaplamalarla karşılaştırılmıştır.

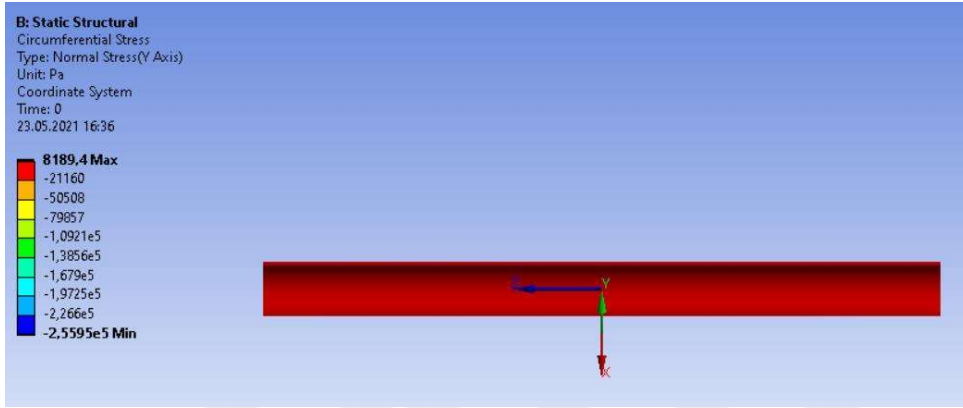
4.4.1. Sabit akışın TBS üzerindeki etkilerinin analizi

Sabit akışta duvar kayma gerilimi (WSS) sonuçları incelendiğinde sabit 0.185 mL/s debi ile hareket eden besi ortamının TBS üzerinde homojen bir kayma gerilimi yaratmadığı, tabanda yüksek WSS görülürken, yan ve üstte düşük kayma gerilimi etkisi olduğu görülmüştür (Şekil 4.20). Ortalama WSS değeri ise sistemde 3.99 dyne/cm^2 olarak hesaplanmış ve istenilen kayma gerilimi değerinin (4 dyne/cm^2) sistemde sağlanabildiği görülmüştür.



Şekil 4.20 Sabit akışın TBS yüzeylerinde oluşturduğu WSS (görüntü yan çevrilmiştir).

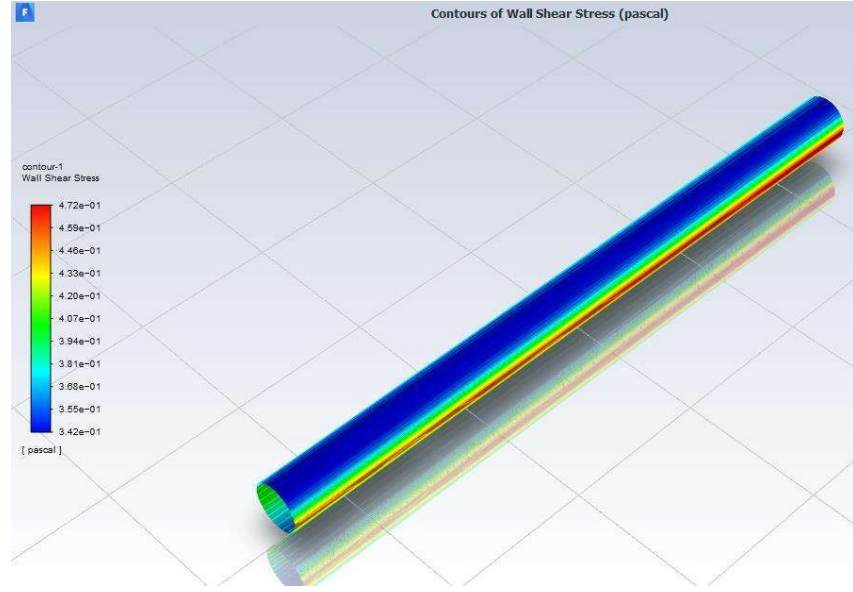
Sabit akışta çalışma basıncı olan 45 mmHg (~6,000 Pa) ile hareket eden akışkanın, TBS çeperine uyguladığı basınç etkisi sonucu oluşan dairesel germe etkileri Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Sabit akışın yarattığı maksimum dairesel germe CFD analiziyle 8.2 kPa olarak hesaplanmış ve bu değerin formül ile yapılan hesaplama değeri olan 9.5kPa’a yakın olduğu görülmüştür.



Şekil 4.21 Sabit akışta dairesel germe etkileri.

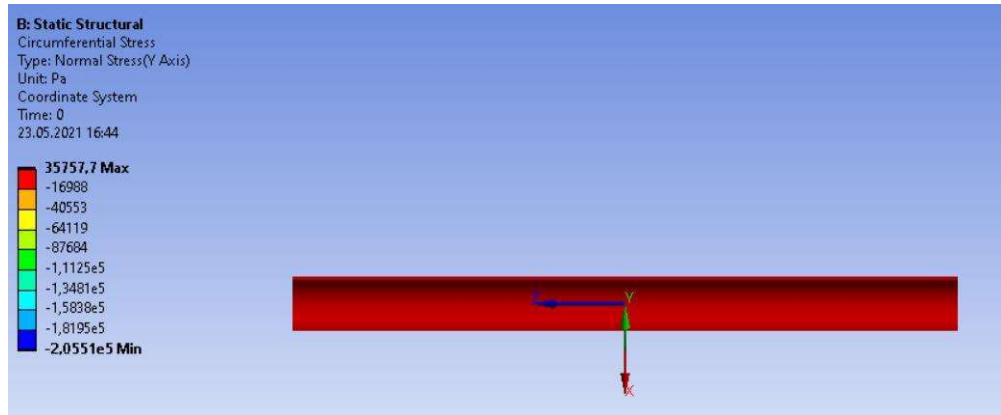
4.4.2. Sistolik akışın TBS üzerindeki etkilerinin analizi

Sistolik basınçtaki akışta WSS sonuçları incelendiğinde, besli ortamı hareketinin Sabit Akış Sistemine benzer şekilde TBS üzerinde homojen bir kayma gerilimi yaratmadığı, tabanda yüksek WSS görülürken, yan yüzeylerde düşük kayma gerilimi etkisinde kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Elde edilen ortalama WSS değerinin (4.07 dyne/cm^2), hesaplamalarla ulaşılması beklenen değer olan 4 dyne/cm^2 'ye oldukça yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca sistemdeki pulsatif hareketin minimum ve maksimum değerler arasında 1.3 dyne/cm^2 'lik bir farka yol açtığı hesaplanmıştır.



Şekil 4.22 Sistolik akışın TBS yüzeylerinde oluşturduğu WSS (görüntü yan çevrilmiştir).

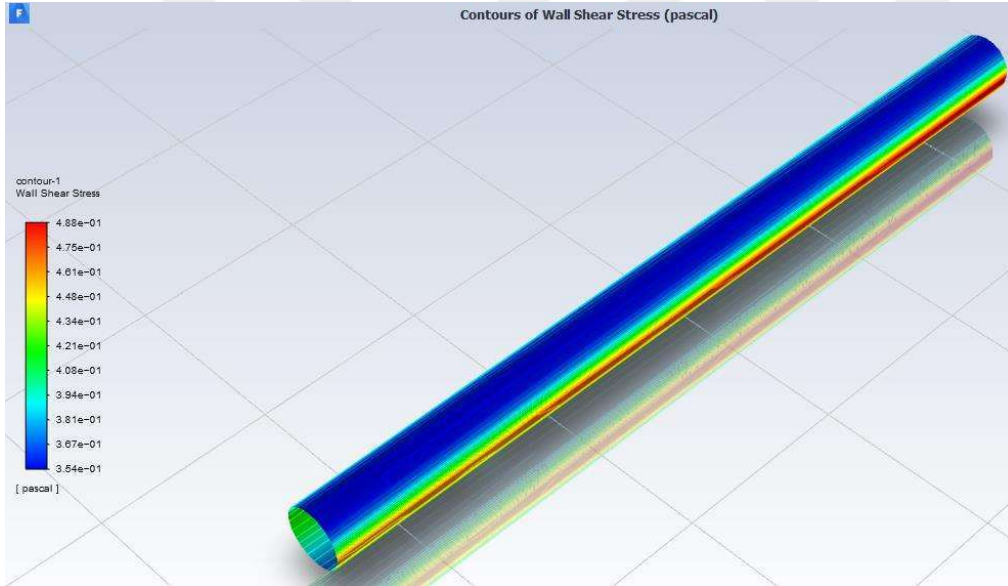
Sistolik Akış Sisteminde çalışma basıncı olan 120 mmHg (~16,000 Pa) ile hareket eden akışkanın, TBS çeperine uyguladığı basınç etkisi sonucu oluşan dairesel germe etkileri Şekil 4.23'ye gösterilmiştir. Dairesel germenin formül ile hesaplanması sonucu elde edilen 25.6 kPa değerinin, CFD analiz sonuçlarında 35.8 kPa olarak bulunduğu görülmüştür.



Şekil 4.23 Sistolik akışta dairesel germe etkileri.

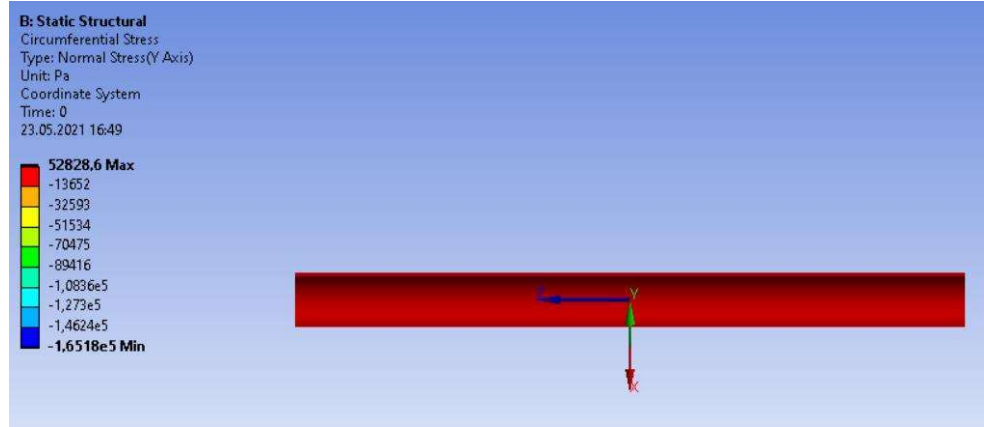
4.4.3. Hipertansiyondaki akışın TBS üzerindeki etkilerinin analizi

Hipertansiyon basıncındaki akışta duvar kayma gerilimi (WSS) sonuçları incelendiğinde besi ortamı hareketinin diğer sistemlerde olduğu gibi, TBS üzerinde homojen bir kayma gerilimi yaratmadığı, tabanda yüksek WSS görülürken, yan yüzeylerde kayma gerilimi etkisinin düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24). Elde edilen ortalama WSS değerinin (4.21 dyne/cm^2), hesaplamalarla ulaşılması beklenen değer olan 4 dyne/cm^2 'den %5 daha yüksek sonuç verdiği görülmüştür. Sistemdeki pulsatif hareketin, TBS yüzeyindeki minimum ve maksimum WSS değerleri arasında, Sistolik Akış Sistemine benzer şekilde 1.3 dyne/cm^2 'lik bir farka yol açtığı hesaplanmıştır.



Şekil 4.24 Hipertansiyondaki akışın TBS yüzeylerinde oluşturduğu WSS (görüntü yan çevrilmiştir).

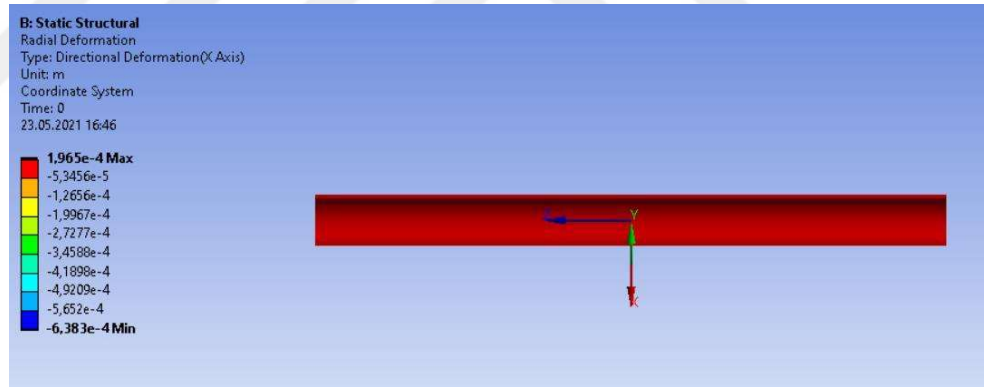
Hipertansiyon basıncındaki (180 mmHg) pulsatif hareketle birlikte esneme/büzülme hareketlerinin yarattığı dairesel germe etkileri Şekil 4.25'te gösterilmiştir. Daha önceki bölümlerde formül ile yapılan hesaplamalar sonucunda maksimum 38.5 kPa dairesel germe etkisinin sistemde görülmesi beklenirken, CFD analizi ile elde edilen sonucun 52.8 kPa olduğu görülmüştür.



Şekil 4.25 Hipertansiyondaki akışta dairesel germe etkileri.

4.4.4. Akış hesaplamalarının değerlendirilmesi

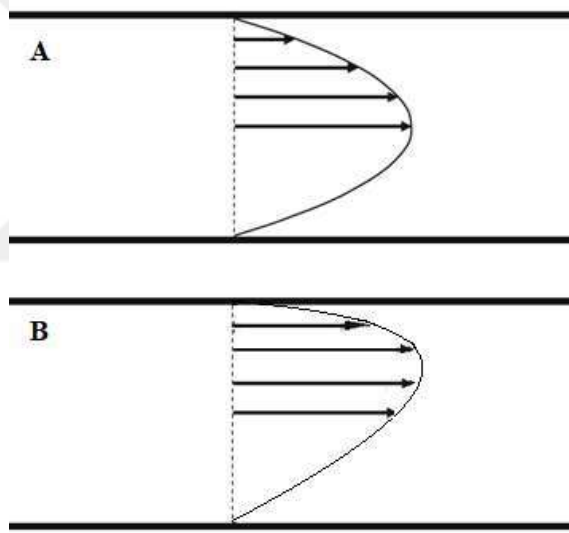
Sisteme etkisinin en çok olacağı düşünülen ve her akış grubu için de sabit tutulan duvar kayma gerilimi (WSS) değerlerinin, üç akış grubunda da planlandığı gibi 4 dyne/cm^2 (0.4 Pa) değerine oldukça yakın sonuçlar verdiği görülmüştür.



Şekil 4.26 Hipertansiyon basıncının TBS’de yol açtığı radyal deformasyon.

Sistemden besli ortamı geçerken, damar çeperlerine uygulanan basınç etkisiyle HTBS’nin çap olarak %5 – 6 genişlediği görülmüştür (Şekil 4.26). CFD analizi sonucunda Sistolik ve Hipertansiyonda Akış Sistemlerinde formül ile gerçekleştirilen hesaplamaların biraz üzerinde ortalama WSS değerleri elde edilme nedeninin, akış rejiminde bu genişlemeye bağlı oluşan değişim olduğu düşünülmektedir. Genişlemenin Hipertansiyonda Akış Sisteminde daha yüksek olmama nedeni, TBS’nin boyuna germe etkileri altında daha fazla esnememesi olabilir (Hoskins, 2017).

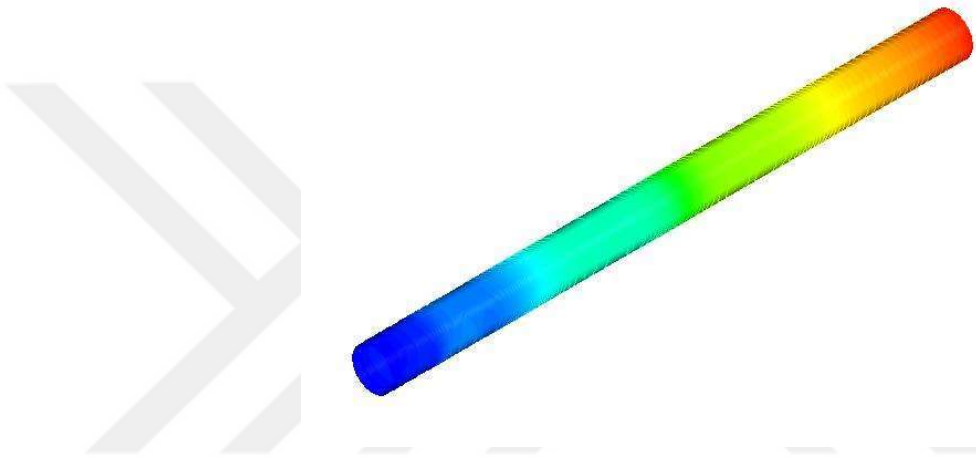
WSS değerlerinin TBS'nin alt yüzeyinde daha yüksek sonuç göstermesi, akışkanın simülasyondaki hareketinin simetrik parabolik (Şekil 4.27 – A) olmadığına işaret etmektedir. Yer çekimi etkisindeki besi ortamı partiküllerinin TBS'nin alt yüzeyinde daha fazla sürtünme etkisine maruz kaldığı ve asimetrik bir parabolik hareketle (Şekil 4.27 – B) TBS içerisinde hareket ettiği düşünülmektedir (Hoskins & Hardman, 2017). Üst yüzeylerdeki besi ortamının daha hızlı hareket etmesine yol açan bu hareket şekli, yan yüzeylerden daha yüksek WSS görülmesine yol açmaktadır. Yer çekimiyle partiküllerin TBS'nin alt yüzeyinde birikmesi viskoziteyi arttırmakta ve alt yüzey ile diğer yüzeylerdeki WSS farkı meydana gelmektedir. Yüzeyler arasındaki WSS farkının Sabit Akış Sisteminde daha düşük görülmesi, basınç artışı ve pulsatif hareketin, meydana gelen etkiyi artırdığı şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.27 Damar içindeki akışkanın hareketi. A – Simetrik parabolik hareket. B – Asimetrik parabolik hareket.

Dairesel germe sonuçları incelendiğinde duvar kalınlığının TBS deformasyonu sonucu incelendiği ve basınç etkisiyle esneyerek genişleyen TBS'nin iç çapının arttığı, bu nedenle formül üzerinden yapılan hesaplamalar ile CFD analizi sonuçları arasındaki farkın oluştuğu düşünülmektedir. Sistolik Akış Sisteminde bu fark %39 iken, Hipertansiyonda Akış Sistemindeki farkın hesaplanan değerden %38 daha fazla olduğu hesaplanmıştır. Bu farkın, iç çaptaki artış ve duvar kalınlığındaki azalmanın daha fazla olmasının yanında basınç değeri de Sistolik

Akış Sistemine göre %50 daha yüksek olan Hipertansiyonda Akış Sisteminde, oransal olarak daha fazla olması beklenmelidir. Diferansiyel matematik modelleri kullanarak hesaplamaları gerçekleştiren ANSYS programında yapılan bu hesaplamalarda, iki sistem arasındaki farkın benzer seviyelerde kalmasının, TBS içerisinde geçen akışkanın damar içerisinde hareketini tamamlayana kadar basıncında gerçekleşen düşüş ve buna bağlı akışkanın davranışlarında oluşan değişim olabileceği düşünülmüştür (Şekil 4.27) (Hoskins & Hose, 2017).



Şekil 4.28 TBS yüzeyine uygulanan basıncın, sistemi terk ederken gösterdiği değişimi.

3.4 Hücre Yanıtlarının In Vitro Modelde İncelenmesi başlığında yapılan hesaplamalar ve ANSYS programı üzerinden elde edilen CFD sonuçları, biyoreaktör ile sistemlerde uygulanması istenilen fiziksel etkilerin, hücreler üzerinde mekanotransdüksiyon yaratabileceğini göstermiştir. CFD analizi ile elde edilen dairesel germe değerlerinin, atardamarlarda vücutta görülen değerlere hesaplamalardan daha yakın olduğu Endotel hücrelerinin vücut içerisinde maruz kaldığı duvar kayma gerilimi hücrelere iletilirken, sistolik ve hipertansiyon basınç değerleri TBS üzerinde minimal deformasyon yaratmıştır. Simülasyon sonuçlarının gösterdiği üzere, TBS damar yapısına benzer şekilde kasılma ve gevşeme hareketlerini gerçekleştirmektedir (Hoskins, 2017). Yapılan bu analizler neticesinde, gerçekçi bir *in vitro* doku mühendisliği modeli oluşturabilmek için, TBS sayesinde endotel hücrelerine doğala yakın bir makro çevre sağlanabildiği görülmüştür.

4.5. Biyoreaktör Denemeleri

Hesaplamaları gerçekleştirilen ve sistemde denenmesi planlanan akış kurgularının gerçeğe dönüştürülebilmesi ve istenilen akış hızı, basınç ve akış rejimlerini sağlayabilmek için, biyoreaktörde kullanılacak farklı çaplardaki hortumların, bağlantı elemanlarının ve akış dönüştürücülerin biyoreaktör ile, **3.4 Hücre Yanıtlarının In Vitro Modelde İncelenmesi** başlığında detaylıca açıklandığı gibi doğru şekilde bir araya getirilmesi gerekmektedir.

Kullanılacak hortum çapları ve boyları, bağlantı elemanlarının konumu ve sayısı gibi parametreler sabitlenmiş, aynı marka ve model pompalar temin edilerek tekrarlanabilir ve stabil sonuçlar elde edilebilmiştir.

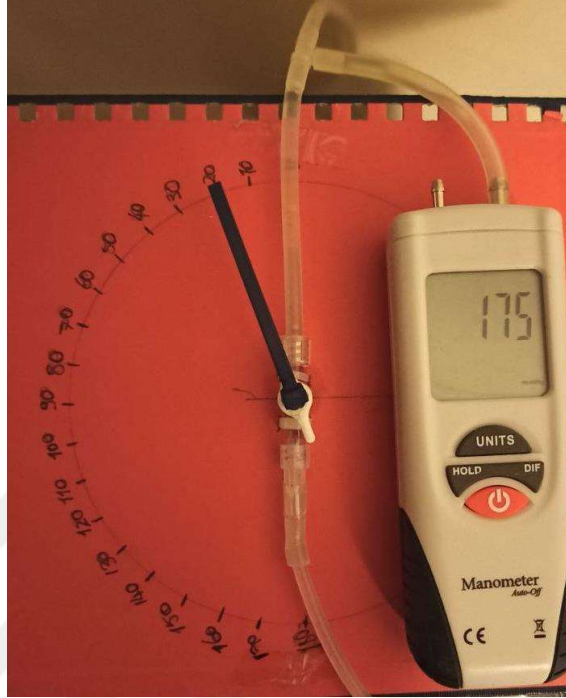
4.5.1. Akış kurgularının sistem üzerinde optimizasyonu

Sistemde hücreler üzerinde uygulanacak duvar kayma gerilimi (WSS) sabitlendiği için, ilk olarak kurulumu tamamlanan biyoreaktörlerde akış denemeleri gerçekleştirilmiştir. İstenilen 4 dyne/cm^2 WSS'yi sağlayabilmek için gereken debi $0,185 \text{ mL/s}$ olarak hesaplanmıştır.

Biyoreaktörlerin kurulumu Tablo 3-5'te açıklandığı gibi gerçekleştirildikten sonra, peristaltik pompalar (YZ1515x, Longer Pump, İngiltere) yardımıyla sistemde döndürülen besi ortamının sistemden çıkış debisi, biyoreaktör çıkışına konulan mezür yardımıyla birim zamanda sistemi terk eden sıvı hacmi ölçülerek belirlenmiştir. Pompaların devir ayarlamaları yapılarak, istenilen debiye Sabit Akış Sistemi için 75 rpm , Pulsatif Akış Sistemi için 50 rpm 'de ulaşılabildiği görülmüştür. Bu sonuçlardan sisteme eklenen dampenerın akış rejimini değiştirirken akış hızını düşürdüğü görülebilmektedir.

Akış hızı değerleri belirlendikten sonra basınç ölçümü T bağlantı ile sisteme eklenen basınç ölçer (HT1890, TT Technic, Çin) sayesinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.29). Yapılan ölçümlerde Sabit Akış Sistemi için istenilen 45 mmHg basıncın sağlandığı görülsede Sistolik Akış Sistemi ve Hipertansiyonda Akış Sistemi için istenilen basınç değerlerine ulaşamadığı görülmüştür. Bu nedenle sisteme vana dahil edilmiş, vananın kapanma açısının artırılması ile istenilen

basınçlar sağlanabilmişse de istenilen akış hızı korunamamıştır. Vana gönye yardımıyla oluşturulan bir platforma sabitlenmiş, bu sayede vana kapanma açısının tekrarlanabilir şekilde takip edilmesini sağlamıştır (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 Açık ölçüm sistemine sabitlenen vananın basınç ve debi kontrolünü sağlayabilmek için kullanılması.

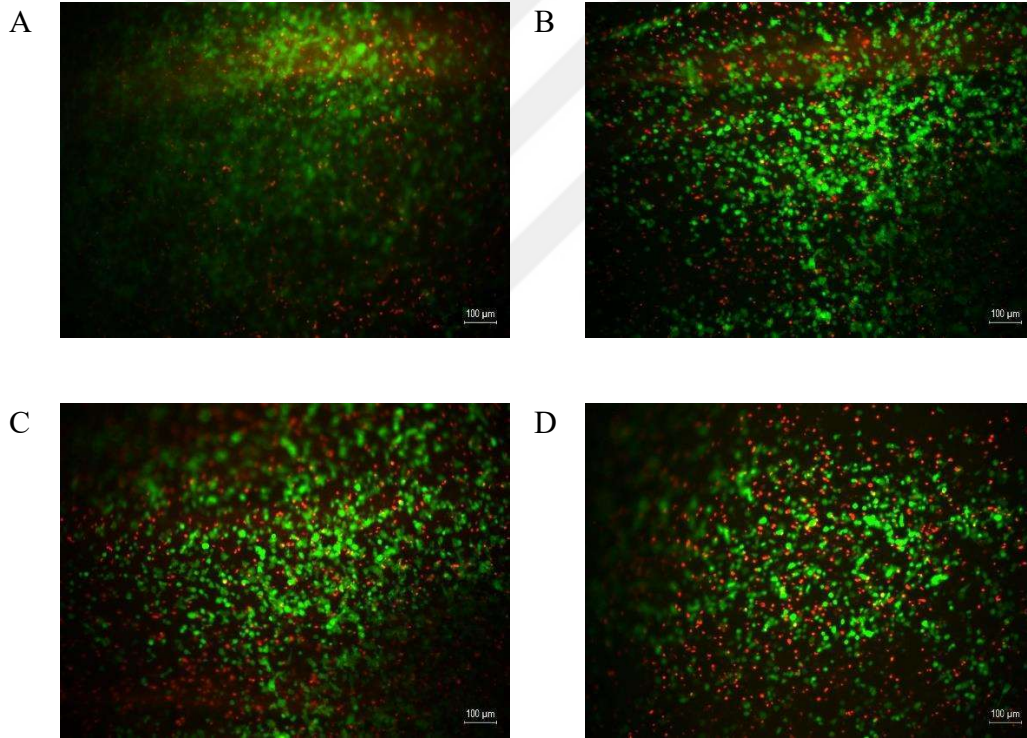
Kurulan bu sistem sayesinde Sistolik Akış Sistemi ve Hipertansiyonda Akış Sistemi için pompa devri ve vana açısı optimize edilmiş, debi sabit tutularak istenilen basınç değerlerine ulaşılması sağlanmıştır (Tablo 4-2).

Tablo 4-2 Farklı akış rejimleri için operasyon parametreleri.

Akış Kurgusu	Duvar Kayma Gerilimi (WSS)	Pompa Devri	Vana Açısı
Sabit Akış	4 dyne/cm ²	75 rpm	0°
Sistolik Akış		60 rpm	25°
Hipertansiyonda Akış		75 rpm	20°

4.5.2. Hücre tutunma denemeleri

Hücrelerin akış etkisinde sistemde süpürülmemeleri için yapılan çalışmaların geçerliliği, üç akış kurgusu için de test edilmiştir. Bunun için kurulumu gerçekleştirilen biyoreaktörler TBS'nin luminal yüzeyine statik olarak ekilen HBEC-5i'lerle birlikte (bkz. 3.3.5.1. *TBS'ye hücre ekimi*) 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından biyoreaktörler açılarak HTBS'ler kesilmiş, hücrelerin tutunma veriminin ve selüloza dağılımlarının gözlenmesi için Live&Dead boyama protokolü uygulanmıştır. Sabit dairesel germe (sabit akış), sağlıklı kan akış basıncındaki pulsatif dairesel germe (sistolik) ve hipertansiyon basıncındaki pulsatif dairesel germe etkisindeki biyoreaktör deney grupları, akış uygulanmadan 5 gün inkübe edilen statik HTBS ile kıyaslanmıştır.



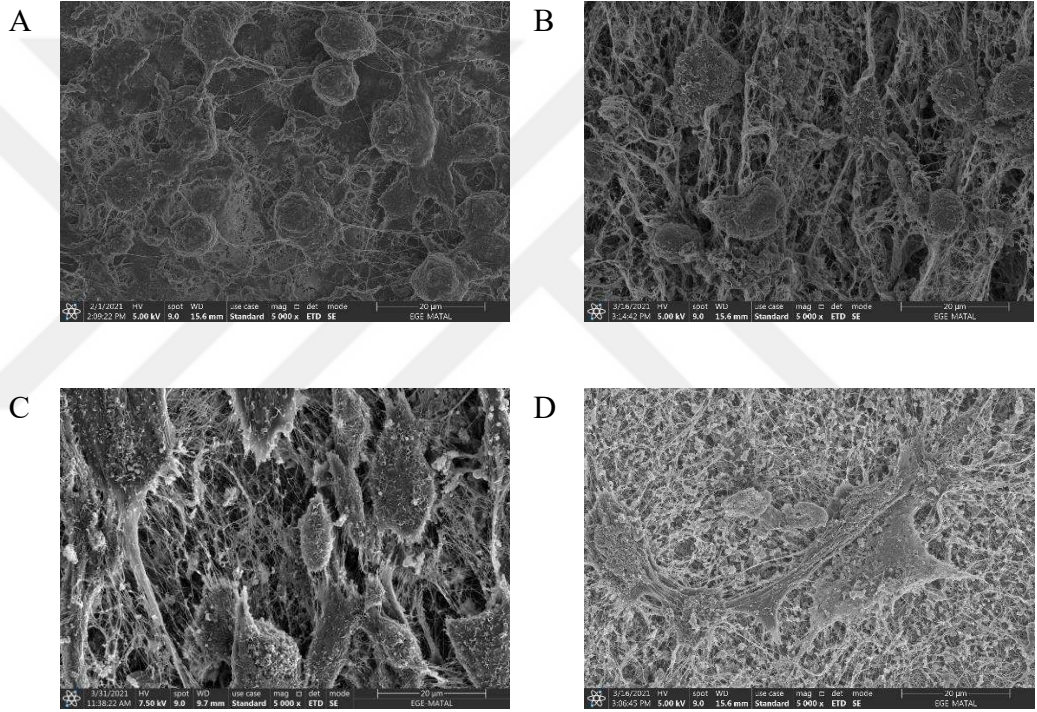
Şekil 4.30 5 günlük inkübasyon sonrası HBEC-5i'lerin TBS yüzeyindeki dağılımlarının floresans mikroskop görüntüleri. Yeşil, canlı hücreler; kırmızı, ölü hücreler (Büyütme 20x) A. Statik, B. Sabit, C. Sistolik, D. Hipertansiyon. Ölçek çizgileri 100 μm 'ye denk gelmektedir.

Hücrelerin TBS yüzeylerindeki dağılımları incelendiğinde (Şekil 4.30), akış etkisindeki hücrelerin TBS yüzeyinden statik gruba kıyasla süpürüldüğü görülmüştür. Farklı gruplarda, hücrelerin maruz kaldığı fiziksel etkilerde ve bu

etkilerin şiddetindeki artışla birlikte, ölü hücre sayısında da kontrol grubuna göre artış görülmüştür. Deneme süresi boyunca hücrelerin yüzeyde tutunmayı başardıkları ve büyük oranda canlı kaldıkları görülmektedir.

4.5.3. TBS yüzeyindeki hücre morfolojilerinin incelenmesi

Hücre morfolojilerinin ve yüzeydeki dağılımlarının detaylı incelenebilmesi için, 5 günlük inkübasyon sonrasında kesilip açılan HTBS'lere ve statik koşullar altında inkübe edilen HTBS'ye SEM takibi uygulanmıştır (bkz. 3.3.5.4. *SEM ile görüntüleme*).



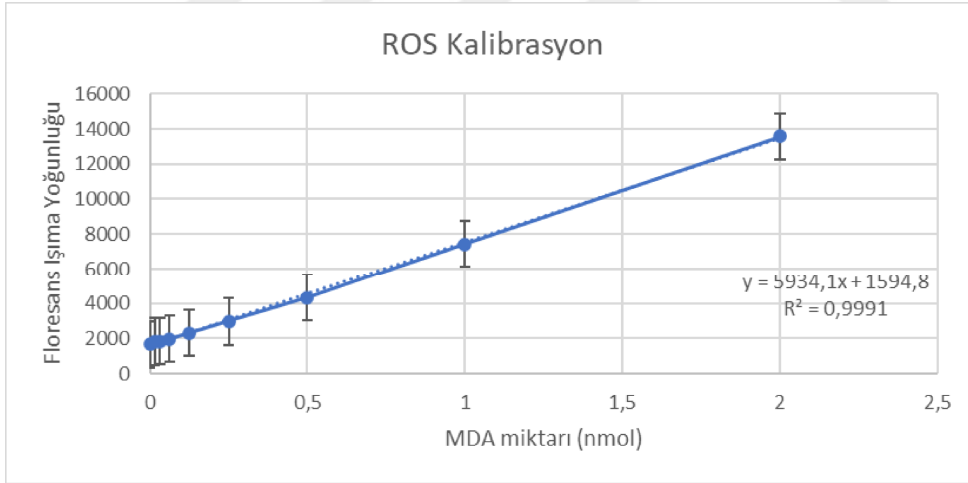
Şekil 4.31 5 günlük inkübasyon sonrası HBEC-5i'lerin TBS yüzeyindeki dağılımlarının SEM görüntüleri (Büyütme 5,000x) A. Statik, B. Sabit, C. Sistolik, D. Hipertansiyon. Ölçek çizgileri 200 µm'ye denk gelmektedir.

Dinamik kültürlerde farklı mekanik kuvvetlere maruz bırakılan ve statik kültürde kulture edilen HBEC-5i hücrelerinin SEM fotoğrafları incelendiğinde, akışa maruz bırakılmayan HTBS'de hücrelerin yuvarlak bir morfoloji gösterdiği (Şekil 4.31 – A), akış etkisiyle birlikte ise tüm dinamik gruplarda hücrelerin uzama eğiliminde oldukları ve hücre boyutunun büyüdüğü görülmektedir (Şekil 4.31 – B, C, D). Bu yayılım ve uzama beklenen bir durum olup, sistem çalışma

parametrelerinin hücreler üzerindeki etkisinin istenilen düzeyde gerçekleştirildiğini göstermektedir (Charbonier et al., 2019; S. Zhao et al., 1995). Hipertansiyon modelinde ise hücrelerin iskele üzerinde konfluent olmadıkları, yüksek basıncın etkisi ile hücreler arası sıkı bağlantıların azaldığı ve hücrelerin seyrekleştiği görülmektedir (Şekil 4.31 – D).

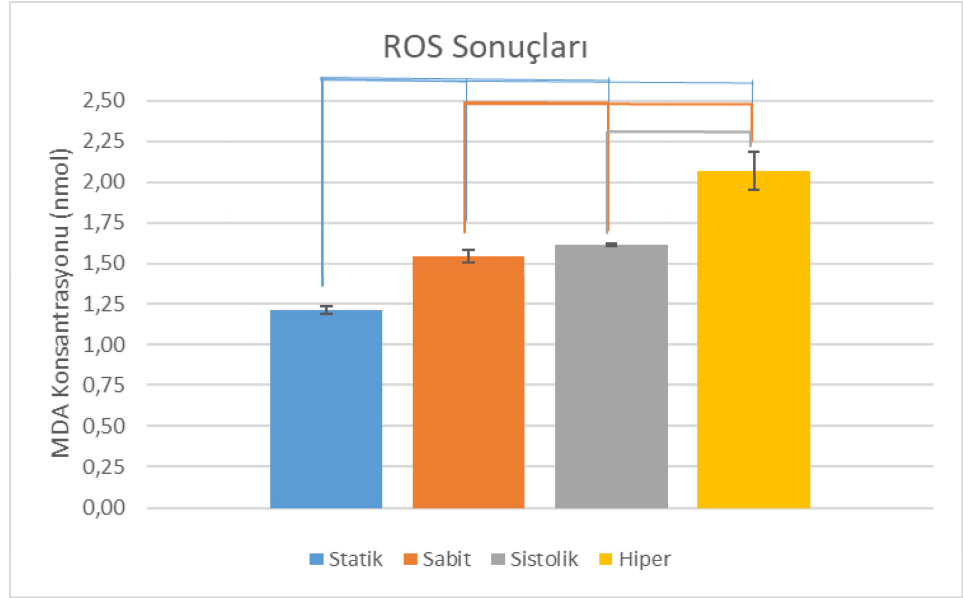
4.5.4. Oksidatif stres etkilerinin değerlendirilmesi

Hücrelerin maruz akış etkisiyle birlikte maruz kaldıkları oksidatif stres etkilerini gözlemleyebilmek için **3.4.6 Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve nitrik oksit (NO) birikiminin incelenmesi** başlığında açıklandığı gibi, akış etkisiyle sistemlerde oluşan ROS'ların hücre lipid tabakasına verdiği hasarı tespit etmek için MDA temelli Lipit Peroksidasyon kiti kullanılmıştır. Hücrelerde meydana gelen hasarın MDA miktarına gelen karşılığının tespit edilebilmesi için kit solüsyonları ile kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 4.32). Sistemlerden alınan örneklerdeki floresans ışına yoğunluğu bu eğri formülünde yerine koyularak MDA miktarları nmol cinsinden tespit edilmiştir.



Şekil 4.32 MDA stok solüsyonlarına ait seyreltmelerle elde edilen kalibrasyon eğrisi.

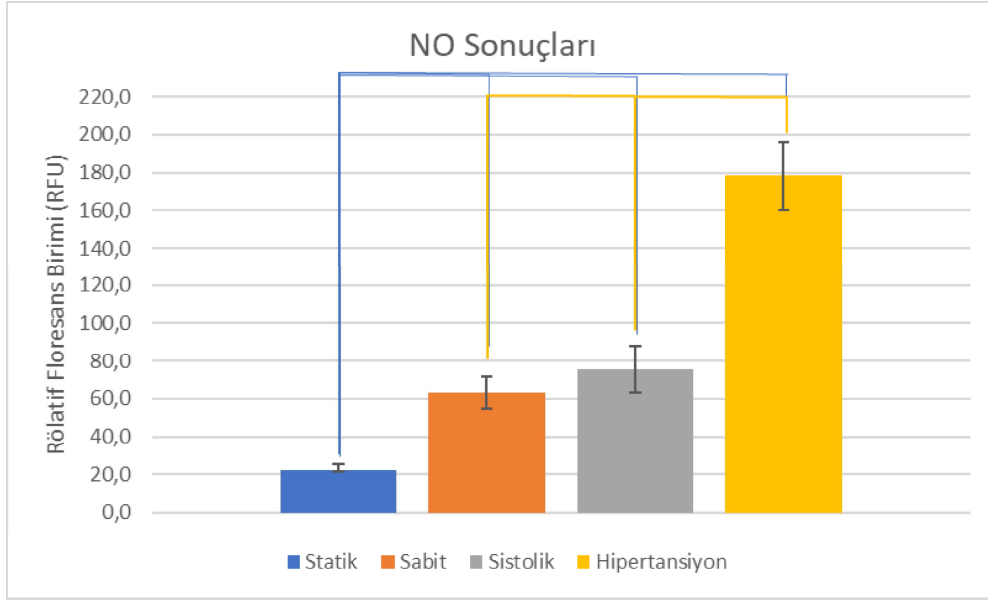
Reaktif Oksijen Türleri (ROS) varlığında, hücrelerde gerçekleşen lipid yıkımına dair elde edilen sonuçlar Tek Yönlü Varyans Analizi (Post-hoc; Tukey) ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 4.33 Statik modelden ve dinamik modellerden 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilen MDA miktarı sonuçları. Modelden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğu grupları belirtmek için farklı olan modelin renginde çizgiler kullanılmıştır ($p < 0,05$).

Elde edilen sonuçlarda bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüş, hücrelere etki eden fiziksel etki sayısında ve şiddetindeki her artışın hücrelerde oksidatif stres yarattığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.33). Bu durum, hücrelerin statik olarak inkübe edilmesinin, üzerlerindeki stres etkilerini minimize etmek için gerekli olduğunu gösterse de (Barnham et al., 2004; L. Zhao et al., 2018) diğer testlerden elde edilen sonuçlar, sistemlerin başarısının hücreler üzerinde oluşan hasarın üzerinde olduğuna işaret etmektedir.

NO ile etkileşim sonucu oluşan DAF-FM'e ait floresans ışıma birimleri (RFU) her sistemden alınan örnekler ve statik grup ile istatistiksel olarak kıyaslanarak gerçekleştirilmiş, elde edilen sonuçlar gruplar arasındaki farklar gözetilerek değerlendirilmiştir.

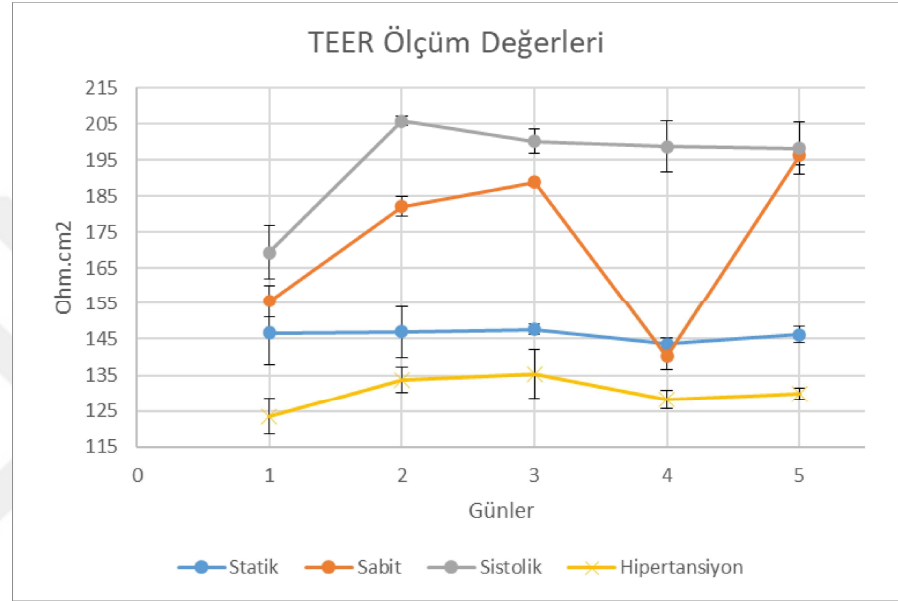


Şekil 4.34 Statik modelden ve dinamik modellerden 5 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilen NO sonuçları. Modelden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğu grupları belirtmek için farklı olan modelin renginde çizgiler kullanılmıştır ($p < 0,05$).

Akış etkisindeki hücrelerde, Nitrik Oksit (NO) miktarında artış görülmesi beklenen bir durumdur (Şekil 4.34). Hücrelerin, artan WSS ve dairesel germe etkilerine karşı damar yapısını ve bütünlüğünü korumak için NO yollarını aktive ettiği bilinmektedir. Hücreler için sağlıklı bir yanıt oluşturulması olarak yorumlanan NO oluşumu, vasküler biyolojide merkezi bir araçtır ve fizyolojik akış, endotel hücreler tarafından sürekli NO üretiminin sağlanması için birincil uyarıcıdır. NO'nun bu başlıca işlevlerinden biri, kan akışını düzenlerken endotelial WSS ve dairesel germe etkilerini normalleştirmek için, damar kasılma ve genişleme hareketlerinin regüle etmesidir (Cunningham & Gotlieb, 2005; Pires et al., 2013). Ancak sistemin kendini adapte edebileceğinden daha yüksek akışa maruz kalması bu yolları bozar. Özellikle yüksek WSS ve dairesel germe etkisi ile ortaya çıktığı görülen ROS'un, NO yollarını inhibe ettiği bilinmektedir (Vaziri et al., 1999). Bu nedenle hücreler tarafından yıkımı gerçekleştirilemeyen NO'nun ROS sonuçlarıyla tutarlı bir şekilde Hipertansiyonda Akış Sisteminde diğer gruplardan çok daha yüksek sonuçlar vermesi, iki oksidatif stres sonucu da değerlendirildiğinde tutarlıdır.

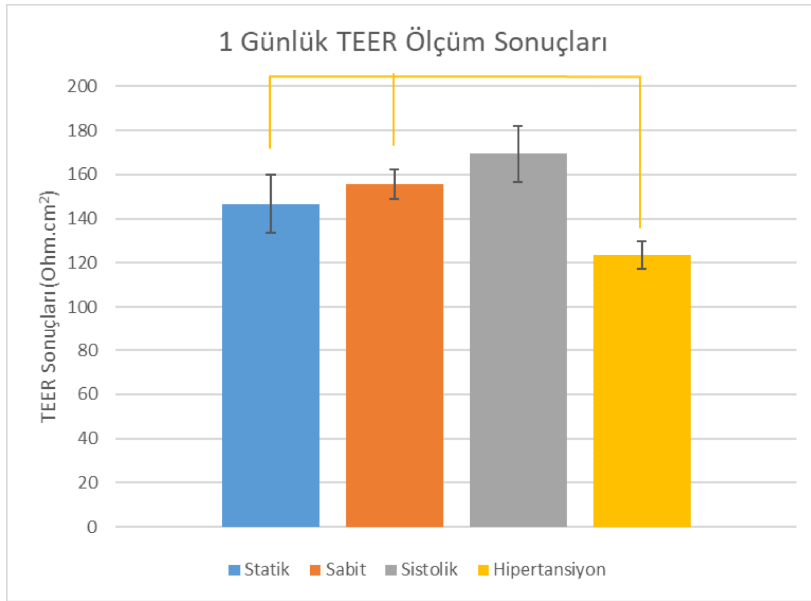
4.5.5. TEER ölçüm sonuçları

Hücreler arası sıkı bağlantı (TJ) proteinlerinin varlığının, sistem performansına olan etkisini ölçebilmek için, 3.3.5.3. **TEER ölçümü** başlığında açıklandığı gibi kesilip CellCrown™'lara geçirilmiş ve Trans Endotelial Elektrik Direnci (TEER) ölçümleri her deney grubu 1. günden başlayarak 5 gün boyunca gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.35).

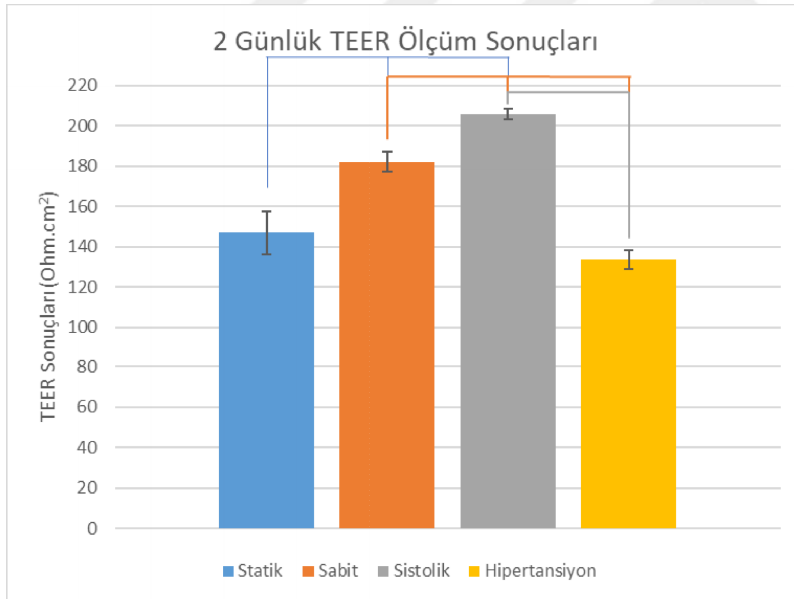


Şekil 4.35 Akış etkisindeki ve statik HTBS'lerin birikimli TEER ölçüm değerleri.

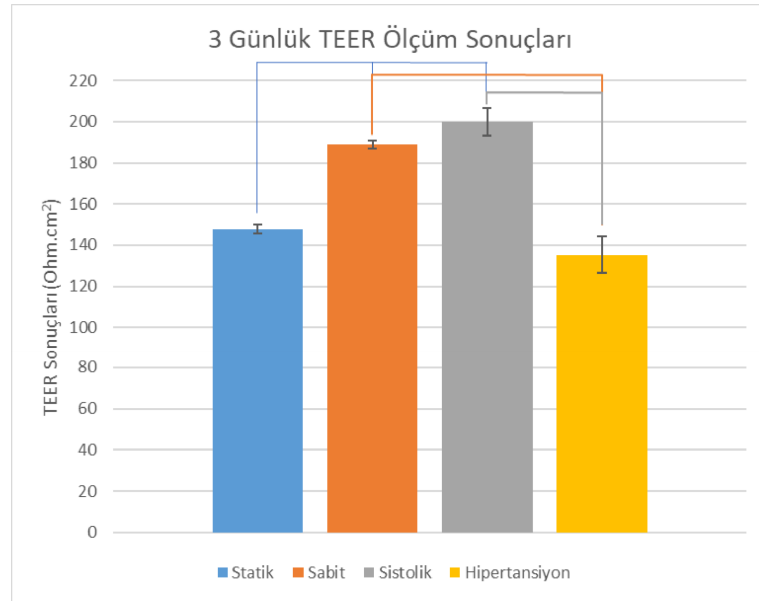
Akış sistemlerinin TEER ölçümü gerçekleştirilebilmesi için her seferinde biyoreaktörün açılarak sistemin bozulması gerektiğinden, 5 günlük gözlem sonuçlarının değerlendirilmesi, her günün sonuçları arasından Tek Yönlü Varyans Analizi (Post-hoc; Dunnet) ile gerçekleştirilmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.36 – 40).



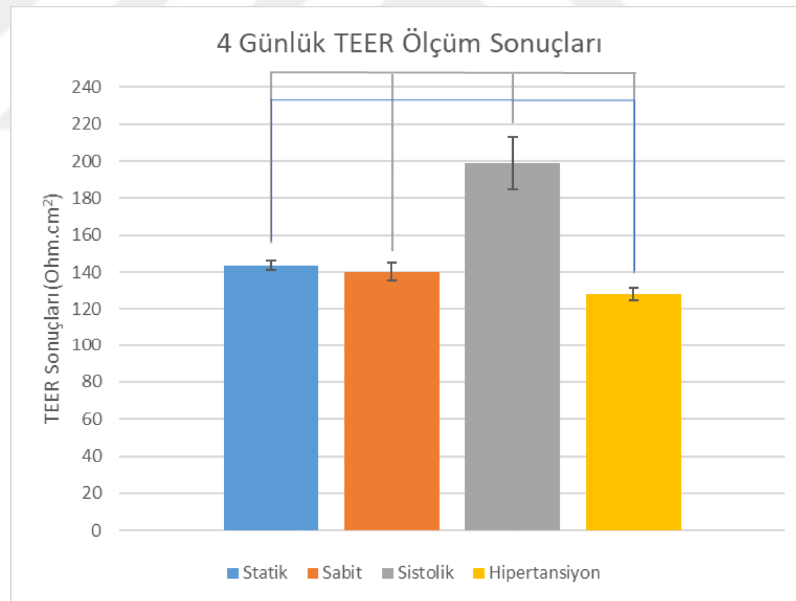
Şekil 4.36 Statik ve dinamik modellerde 1 günlük TEER ölçüm değerleri. Modelden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğu grupları belirtmek için farklı olan modelin renginde çizgiler kullanılmıştır ($p<0,05$).



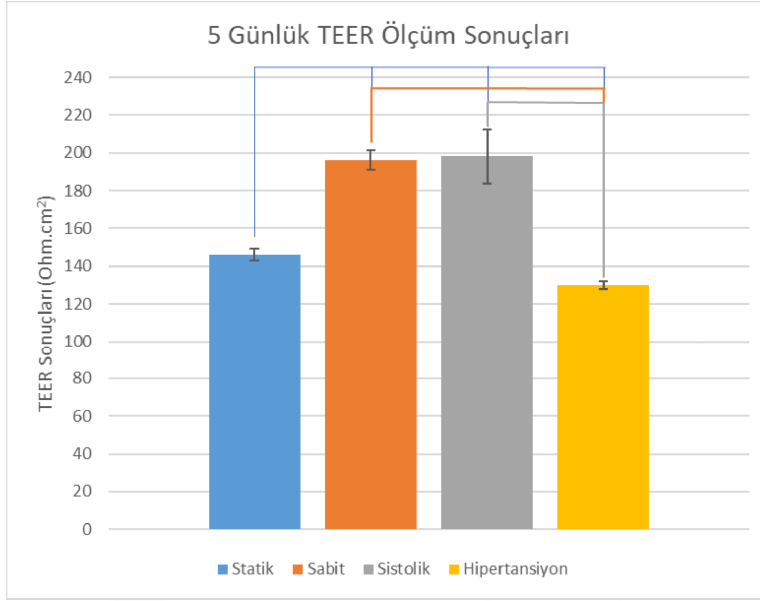
Şekil 4.37 Statik ve dinamik modellerde 2 günlük TEER ölçüm değerleri. Modelden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğu grupları belirtmek için farklı olan modelin renginde çizgiler kullanılmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.38 Statik ve dinamik modellerde 3 günlük TEER ölçüm değerleri. Modelden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğu grupları belirtmek için farklı olan modelin renginde çizgiler kullanılmıştır ($p<0,05$).



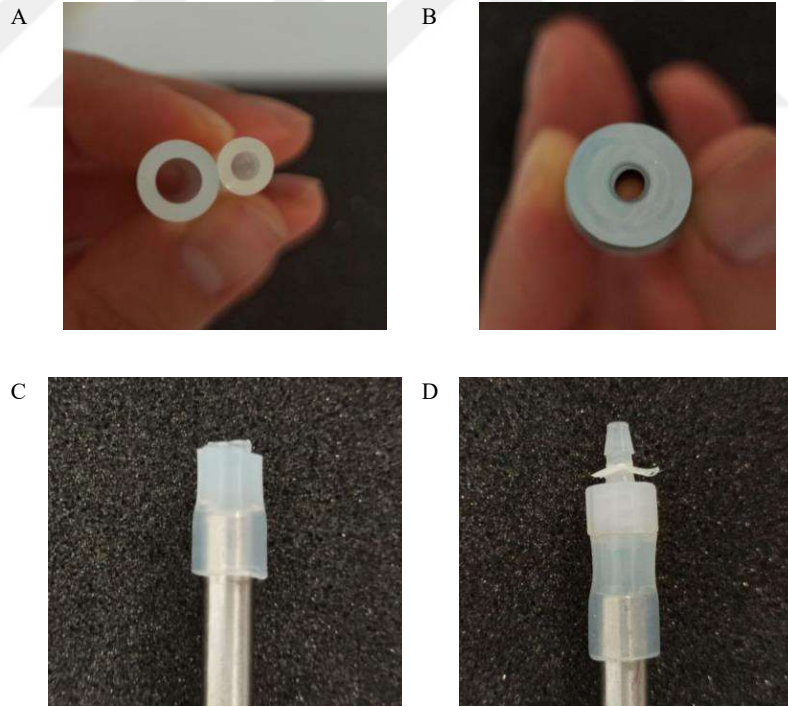
Şekil 4.39 Statik ve dinamik modellerde 4 günlük TEER ölçüm değerleri. Modelden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğu grupları belirtmek için farklı olan modelin renginde çizgiler kullanılmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.40 Statik ve dinamik modellerde 5 günlük TEER ölçüm değerleri. Modelden elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğu grupları belirtmek için farklı olan modelin renginde çizgiler kullanılmıştır ($p<0,05$).

İlk gün TEER ölçüm sonuçları incelendiğinde hipertansiyon ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmektedir. SEM ve Live&Dead sonuçlarına göre, akışla birlikte yüksek basınç etkisinin hücrelere hasar verdiği ve yüzeyden kalkmalarına yol açtığı görülmektedir. Hücreler üzerindeki bu olumsuz etkiler ilk günden itibaren sonuçları etkilemiştir. İkinci günden itibaren hücrelerin akış etkisine uyum gösterdiği, sabit ve sistolik akış sistemlerinin, statik grup ile anlamlı fark göstermesi üzerinden yorumlanabilir. Hipertansiyonda akış sistemi ile statik grup arasında TEER farkı bulunmamaktadır. Sistolik akış sisteminin, sabit akış sisteminden istatistiksel olarak daha yüksek TEER sonucu göstermesi ise hücrelerin uygun kayma gerilimi ve dairesel germe etkisiyle daha iyi performans gösterebileceği düşüncesini güçlendirmiştir. Üçüncü günde açılan biyoreaktörlerdeki TEER sonuçları değerlendirildiğinde; statik grup, hipertansiyonda akış sistemi dışındaki gruplarla anlamlı olarak düşüktür. Sistolik akış sisteminde elde edilen TEER değerleri ile sabit akış sistemi arasındaki ortalama değer farkı istatistiksel olarak anlamlı değildir. Akış etkisindeki gruplar arasında hipertansiyonda akış sistemi en kötü performansı göstermeye devam etmiştir. Dördüncü gün ölçümlerinde hipertansiyonda akış sisteminin, statik gruptan anlamlı olarak daha düşük değer göstermesi, fiziksel etkilerin hücrelere verdiği zararın

birikimli olarak devam ettiği şeklide yorumlanmıştır. Sistolik akış sistemi ise bütün gruplardan daha yüksek TEER değerleri göstermiştir. Sabit akış sisteminden, hipertansiyonda akış sistemi ve statik grup ile benzer ölçümler kaydedilmiştir. Biyoreaktörlerin ön montaj, kurulum ve ölçümün gerçekleşmesi basamaklarında iskele yüzeyine verilmiş olabilecek bir hasarın bu kötü sonuçlara yol açtığı düşünülmektedir. Yapılan denemelerde özellikle ön montaj basamaklarında, rakorlar ile TBS'nin birleştirilmesi sırasında, kullanılan 316L paslanmaz çelik rakorların ağır geldiği ve TBS'yi yıprattığı görülmüştür. Montajlama sırasında TBS üzerinde gerilim yaratarak hasar vermemeye dikkat edilmişse de bazı denemelerde elde edilen bu tarz sonuçlar üzerine çelik rakorların kullanılmasından vaz geçilmiştir. TBS'ler daha önceki denemeler için satın alınan TA Electroforce 3DCulturePro™ biyoreaktörünün plastik rakorlarına takılmış, Bağlantı Hortumu içerisine yerleştirilen İletim Hortumu konnektör tünelinin ucuna takılarak (Şekil 4.41) HTBS'lerin sisteme yüklenmesi sağlanmıştır. Denemelerin büyük kısmında çelik rakorlar yerine daha hafif olan plastik rakorlar kullanılmıştır.



Şekil 4.41 Çelik rakorlar yerine sistemde kullanılan HTBS bağlantıları. A. Bağlantı ve İletim Hortumları. B. Plastik rakorların girebileceği şekilde iç içe geçirilmiş hortumlar. C. Konnektör tünelinin ucuna hortumların sabitlenmesi. D. Plastik rakorların konnektör tüneline oturtularak kullanımı.

Beşinci gün ölçümlerinde hipertansiyonda akış sisteminin, diğer sistemlere göre geride kalmaya devam ettiği ve akış etkisiyle uyarılmayan statik grubun, üzerindeki hücre yoğunluğuna rağmen sabit ve sistolik akış sistemlerinin TEER değerlerine yaklaşmadığı görülmektedir.

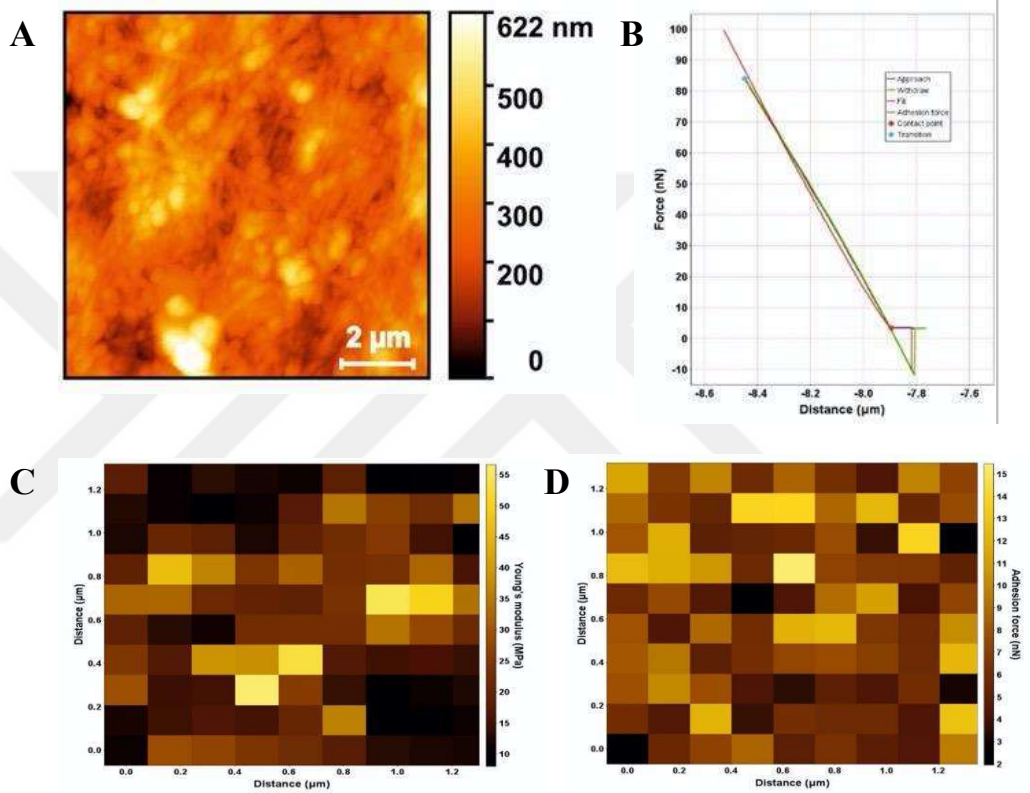
Ölçümler tek tek incelendiğinde sabit akış sistemi ile sistolik akış sistemine ait sonuçların oldukça benzer olduğu görülmektedir. İskele yüzeyinin tamamen kaplı kaldığı bilinen statik sisteme göre sabit ve sistolik sistemlerin akış etkisiyle hücrelerin bir miktar sistemden süpürülmesine rağmen, daha fazla TJ ve AJ proteini ifade etmiş olabileceğinden daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Hipertansiyonda akış sisteminin hücrelerin yüzeyden kalkmasına yol açmasının haricinde olumsuz etki göstererek TJ ve AJ proteinlerine hasar verdiği, bu nedenle en başından beri en kötü sonuçları gösterdiği düşünülmektedir. Elde edilen TEER değerlerinin vücut içi sistemlerden düşük olduğu, ancak *in vitro* damar modeli çalışmalarında elde edilen sonuçlara yakın değerler gösterdiği görülmektedir (Bayır et al., 2018; Deli et al., 2005; Wolff et al., 2015). Bu nedenle Sistolik Akış Sisteminin beklendiği gibi gerçekçi bir *in vitro* model oluşturmak için kullanılabileceği düşünülmüştür.

4.5.6. Hücre sitoiskelet değişimlerinin AFM ile ölçülmesi

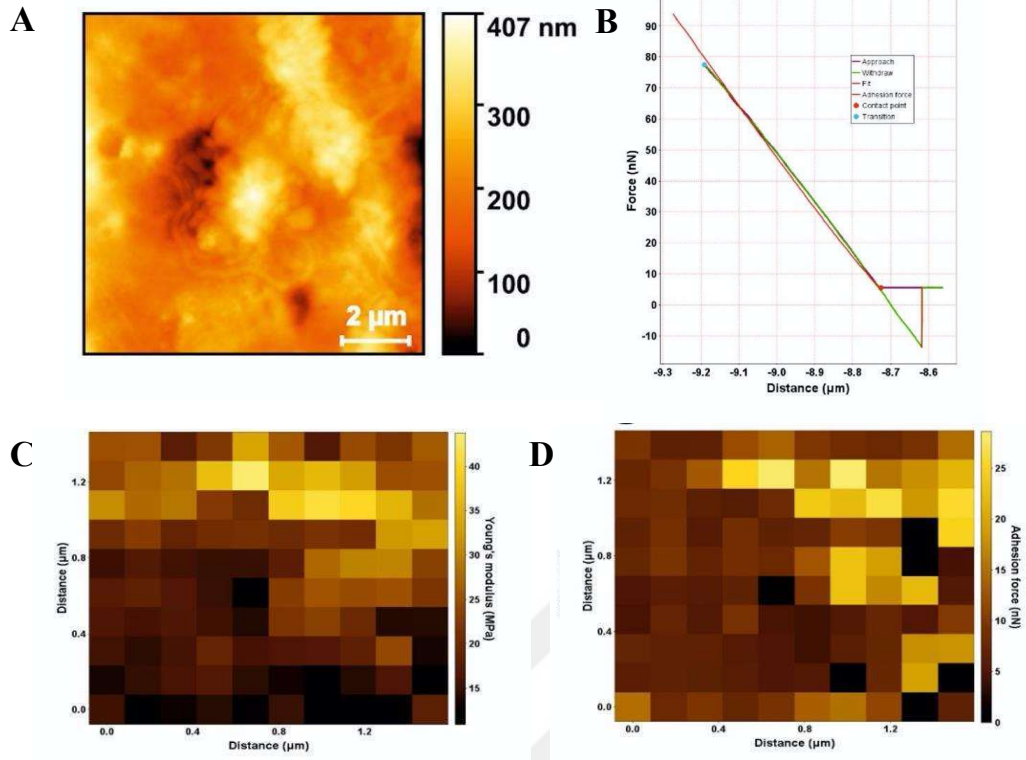
Mekanotransdüksiyon etkisiyle hücre sitoiskelet yapısının farklı mekanik uyarılara verdiği etkileri gözlemlemek ve hücrelerin yüzeye tutunma performansını değerlendirmek için Atomik Kuvvet Mikroskopundan (AFM) faydalanılmıştır. Biyoreaktörden kesilip çıkarılarak AFM içine yerleştirilen örneklerde 50 µm x 50 µm'lik bir alanda, hücreler üzerine kuvvet uygulanarak yüzey tutunma performansları ve elastisite (Young's) modülleri değerlendirilmiştir.

HBEC-5i hücrelerinin statik modelde 5 günlük inkübasyonundan sonra AFM ile kontak mod altında elde edilen hücre sertliği ve adhezyonu sonuçları Şekil 4.42 – 45'de verilmiştir. Kısmen liflerin görüldüğü ancak genel itibariyle globular-oval unsur olarak görüntülenen hücrelerin yer aldığı anlaşılmaktadır. Nanoindentation ölçümleri, her iki bölgeden (hücre olan ve olmayan bölgeler) toplamda 2048 noktada yapılmıştır. Bu analizde AFM tipi, örneğe belli derinliklerde (500 nm kadar) temas ettirilerek, yer değiştirmeye bağlı olarak gerilme kuvveti tayin

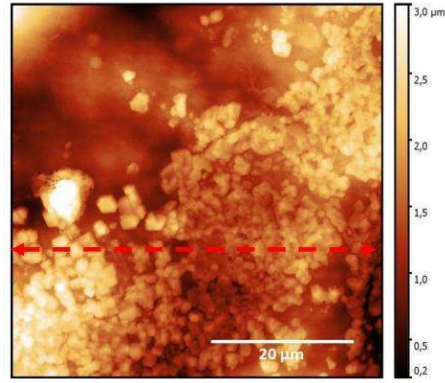
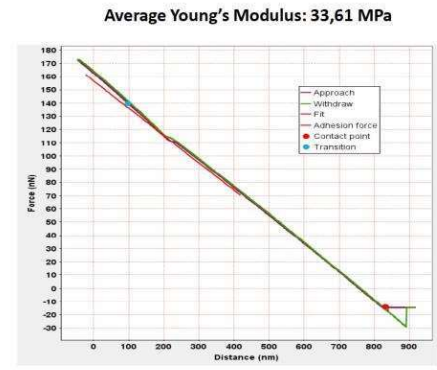
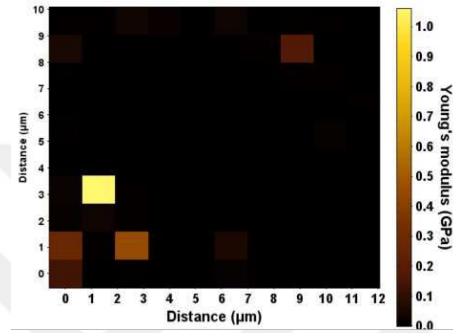
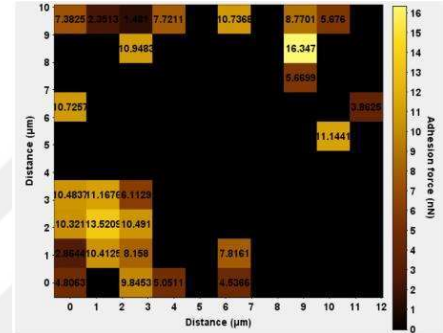
edilmiştir. Yapılan ölçümler sonunda elde edilen Young's modülü dağılım grafikleri ve adhezyon haritaları şekillerde verilmiştir. Statik modelde hesaplanan ortalama Young's modülü 20,8 MPa, adhezyon kuvveti 7,6 nN'dur. Sabit akışlı modelde hesaplanan ortalama Young's modülü 22 MPa, adhezyon kuvveti 7,04 nN'dur. Sistolik modelde hesaplanan ortalama Young's modülü 33,61 MPa, adhezyon kuvveti 11,02 nN'dur. Hipertansiyon modelinde ise hesaplanan ortalama Young's modülü 55,46 MPa, adhezyon kuvveti 10,6 nN'dur.



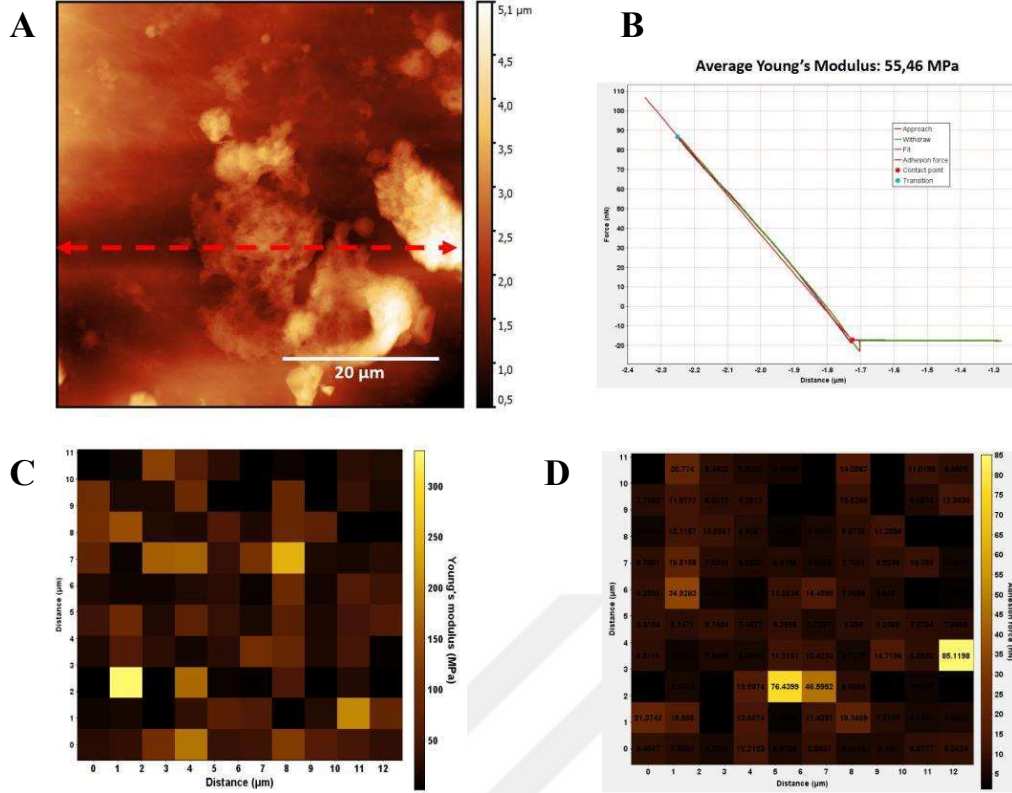
Şekil 4.42 Statik modelde kültüre edilen HBEC-5i hücrelerinin A. AFM topografisi. B. Hücreli BC yüzeyinin kuvvet-mesafe eğrisi. C. Hücreli BC yüzeyinin Young's modulus haritası. D. Hücreli BC yüzeyinin adhezyon haritası.



Şekil 4.43 Sabit akışlı modelde kültüre edilen HBEC-5i hücrelerinin A. AFM topografisi. B. Hücreli BC yüzeyinin kuvvet-mesafe eğrisi. C. Hücreli BC yüzeyinin Young's modulus haritası. D. Hücreli BC yüzeyinin adhezyon haritası.

A**B****C****D**

Şekil 4.44 Sistolik akış modelinde kültüre edilen HBEC-5i hücrelerinin A. AFM topografisi. B. Hücreli BC yüzeyinin kuvvet-mesafe eğrisi. C. Hücreli BC yüzeyinin Young's modulus haritası. D. Hücreli BC yüzeyinin adhezyon haritası.



Şekil 4.45 Hipertansiyon akış modelinde kültüre edilen HBEC-5i hücrelerinin A. AFM topografisi.

B. Hücreli BC yüzeyinin kuvvet-mesafe eğrisi. C. Hücreli BC yüzeyinin Young's modulus haritası. D. Hücreli BC yüzeyinin adezyon haritası.

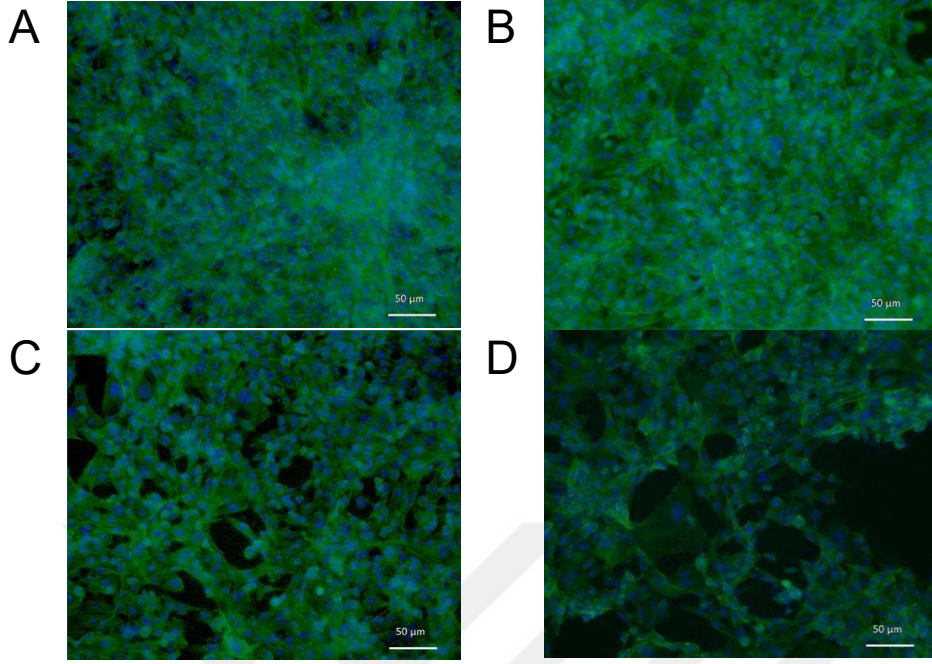
Atomik kuvvet mikroskobu ile yapılan Young's modül ve adezyon ölçümleri hücre sitoskeletonunun, özellikle de hücre mekanik özelliklerinin ana belirleyicisi olan aktin stres fiberlerinin, ve hücrelerin yüzey ile bağlantılarının (fokal adezyon) mekanik stres karşısındaki değişimini değerlendirmeye yöneliktir. 5 günlük inkübasyon süresi sonunda, yoğun fiziksel strese maruz bırakılan hücrelerin, süpürülmeden yüzeyde kalmayı başarabilmek için, yüzey tutunma veriminin artırmış oldukları düşünülmektedir. AFM sonuçları, TBS yüzeyine tutunmayı başaran hücre yüzeyine uygulanan kuvvet üzerinden ölçüldüğü için, hücre yüzey etkileşiminin bu hücrelerde daha yüksek olması Hipertansiyonda Akış Modelinde hücre yüzey tutunma proteinlerinin daha yüksek salgılandığına işaret etmektedir (Benoit & Gaub, 2002; Pierce et al., 1994). Endotel hücreler hücre içi veya hücre dışı strese maruz kaldıklarında kortikal aktin halkasını oluşturan F-aktin ile stres lifleri arasında bir yeniden bir yapılanma oluşur. Örneğin enflamasyon sırasında sitozolik Ca^{2+} artışı, cAMP'de azalma ve RhoA/Rho kinaz yolunun aktivasyonu ile

endotel hücrelerinde stres lifleri artar (Karki & Birukov, 2019; Prasain & Stevens, 2009). Bu stres lifleri hücre içi gerilimi artırır ve AJ yapısının yeniden düzenlenmesi ile hücreler arası bağlantılarda boşluklar oluşur (Zhang et al., 2020). Hücreler birbirinden çekilir ve bir taraftan hücrenin sertliği/Young's modülü artarken bir yandan da damarın geçirgenliği artar. Dairesel germe etkisi altında sitoskelet yapılarının bu etkiye karşı koymak için güçlendiği ve oluşan yeni stres fiberlerinin hücre sertliği artırdığı bilinmektedir (Duong & Vestweber, 2020; Gavara & Chadwick, 2016). Ayrıca ROS varlığında hücre sertliğinin yaklaşık iki kat arttığı raporlanmıştır (Kakorin et al., 2010), Hücrelerin Young's modüllerinde Statik Sistem (20.8 MPa) ile Sistolik Akış Sistemi (33.61 MPa) ve Hipertansiyonda Akış Sistemi (55.46 MPa) arasında önemli bir fark olduğu görülürken, Sabit Akış Sistemi (22 MPa) ile Statik Sistem arasında yüksek bir fark görülmemiştir. Hipertansiyona maruz hücrelerde Young's modülü değerinin tüm gruplardan yüksek olması, adezyon kuvvetlerinin de sistolik ve hipertansiyon modellerinde yüksek ölçülmüş olması, asıl etkiyi yaratanın dairesel germe olduğuna işaret etmektedir. Hipertansiyonda Akış Sistemindeki bu artış, yüksek basınç değerlerine bağlı dairesel germenin, hücrelere zarar verdiğini göstermektedir.

4.5.7. Protein ifadelerinin IF boyama sonuçları

Statik modelde ve dinamik modellerde 5 günlük inkübasyon sonucunda TJ ve AJ proteinlerini ve bu bağlantıların gerçekleşmesinde rol alan hücre içi proteinlerin varlığını incelemek için İF boyamalar gerçekleştirilmiştir. Hücre çekirdekleri DAPI boyama sonucunda mavi, ilgili proteinler yeşil olarak görülmektedir. HBEC-5i hücreleri üzerinde yapılan İF boyamalar sonucunda ters faz floresans mikroskop altında alınan F-aktin (Şekil 4.46), β -Katenin (Şekil 4.47), VE-Kaderin (Şekil 4.48), ZO-1 (Şekil 4.49), Okludin (Şekil 4.50), Klaudin-5 (Şekil 4.51) ve JAM-A (Şekil 4.52) boyamalarının görüntüleri verilmiştir

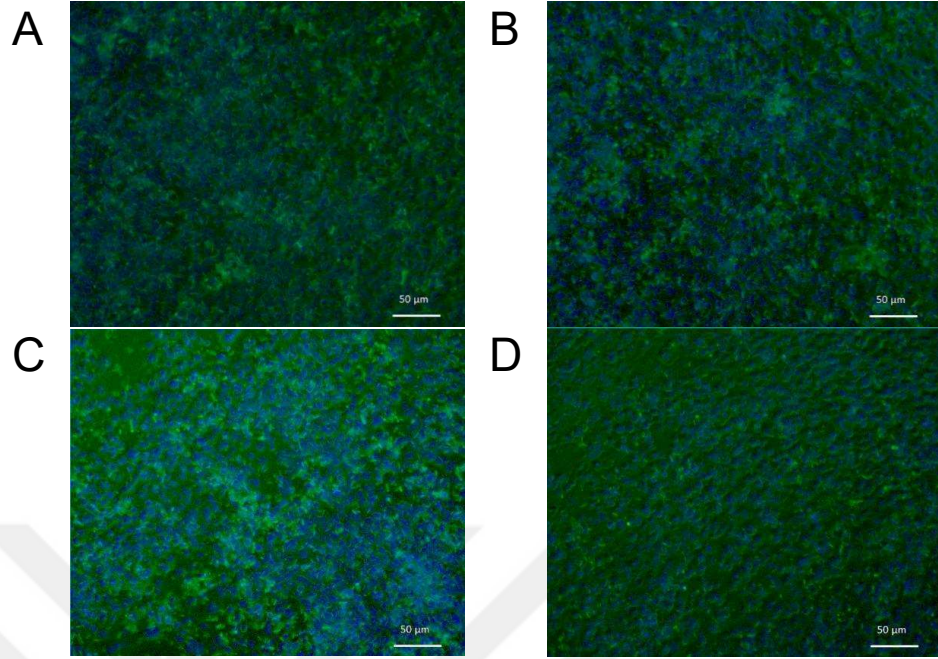
Aktin



Şekil 4.46 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve F-aktin proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri. Ölçü çizgileri 50 µm'ye karşılık gelmektedir. Mavi floresans hücre çekirdeğini gösteren DAPI boyamaları, yeşil floresans ise aktin varlığını göstermektedir.

Statik ve bütün dinamik modellerde İF boyaması ile aktin ifadesi izlenmiştir. Bütün örneklerde yoğun ifade edilmekle beraber akut hipertansiyon modelinde hücreler arası boşlukların bulunduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.46).

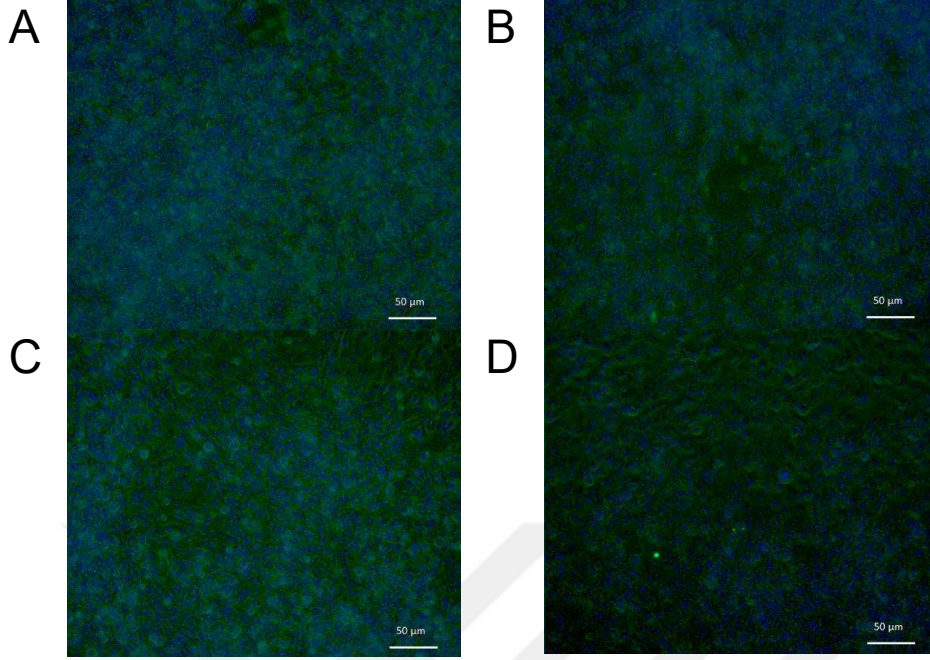
β -Katenin



Şekil 4.47 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve β -Katenin proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri. Ölçü çizgileri 50 μ m'ye karşılık gelmektedir. Mavi floresans hücre çekirdeğini gösteren DAPI boyamaları, yeşil floresans ise β -Katenin varlığını göstermektedir.

Statik ve bütün dinamik modellerde İF boyaması ile β -Katenin sitoplazmik protein ifadesi izlenmiştir (Şekil 4.47).

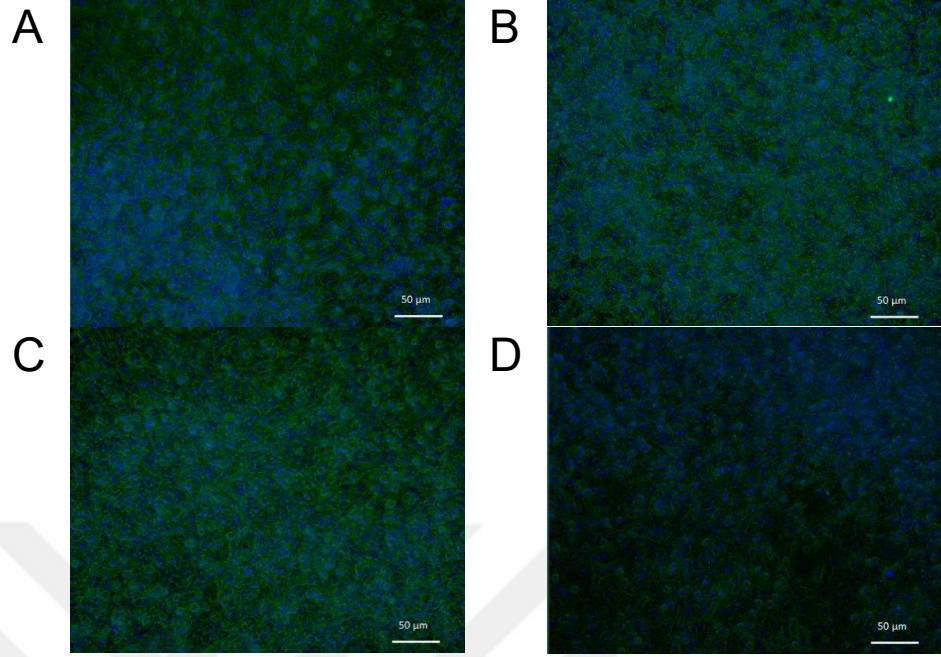
VE-Kaderin



Şekil 4.48 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve VE-Kaderin proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri. Ölçü çizgileri 50 μm 'ye karşılık gelmektedir. Mavi floresans hücre çekirdeğini gösteren DAPI boyamaları, yeşil floresans ise VE-Kaderin proteinin varlığını göstermektedir.

Statik ve bütün dinamik modellerde İF boyaması ile vasküler endotel hücrelerine spesifik VE-Kaderin AJ protein ifadesi izlenmiştir; ancak bu proteinin ifadesi hipertansiyon modelinde diğer gruplara göre daha azdır (Şekil 4.48).

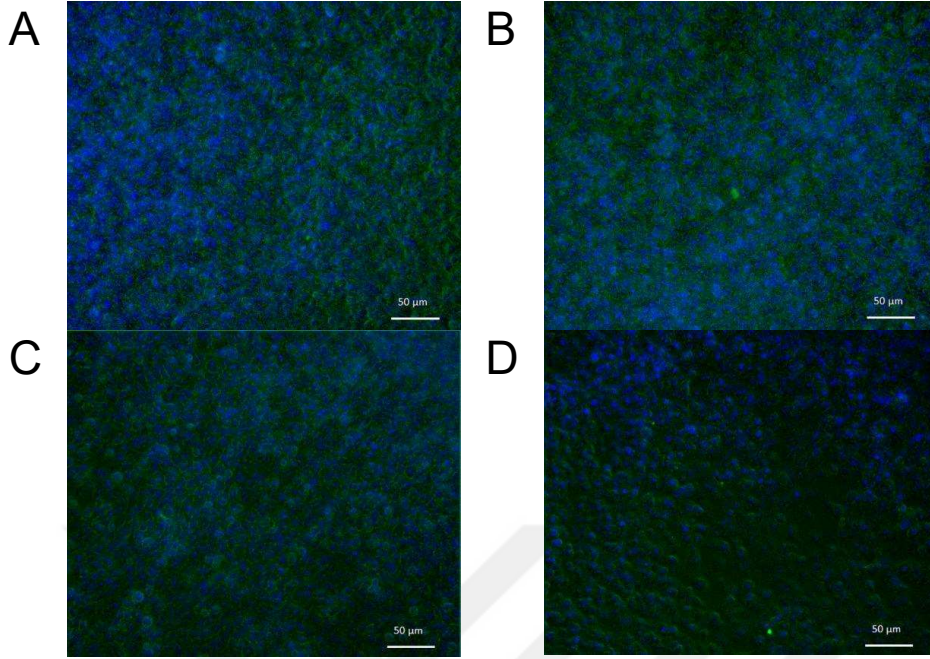
ZO-1



Şekil 4.49 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve ZO-1 proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri. Ölçü çizgileri 50 μm 'ye karşılık gelmektedir. Mavi floresans hücre çekirdeğini gösteren DAPI boyamaları, yeşil floresans ise ZO-1 varlığını göstermektedir.

Statik ve bütün dinamik modellerde İF boyaması ile ZO-1 TJ protein ifadesi izlenmiştir. Bütün örneklerde ifade edilmekle beraber akut hipertansiyon modelinde bu proteinin ifadesi diğer gruplara göre daha azdır ve hücreler arası boşlukların bulunduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.49).

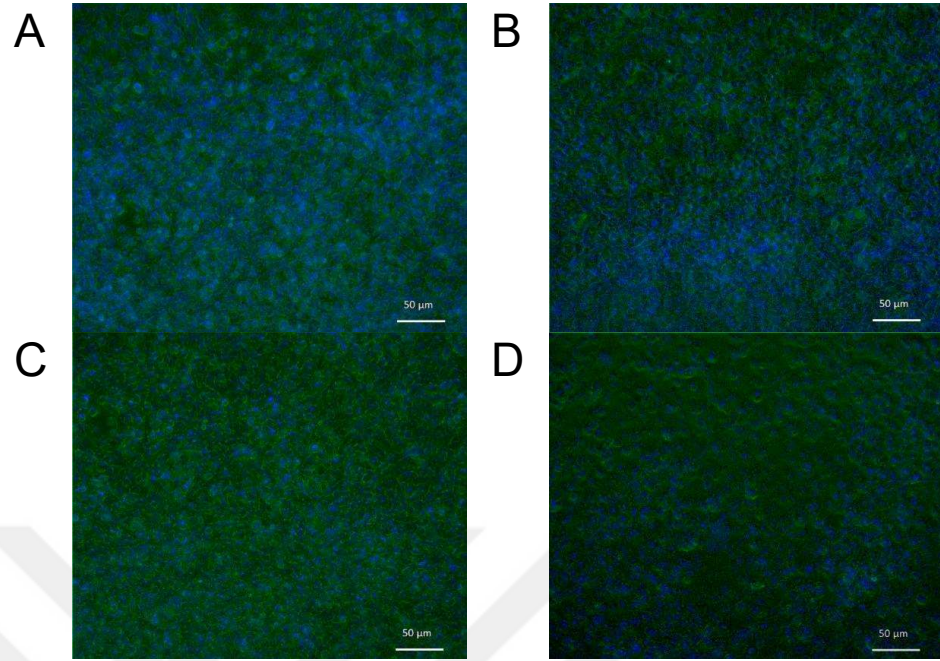
Okludin



Şekil 4.50 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve Okcludin proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri. Ölçü çizgileri 50 μm 'ye karşılık gelmektedir. Mavi floresans hücre çekirdeğini gösteren DAPI boyamaları, yeşil floresans ise Okcludin varlığını göstermektedir.

Statik ve bütün dinamik modellerde İF boyaması ile okcludin TJ protein ifadesi izlenmiştir; ancak bu proteinin ifadesi hipertansiyon modelinde diğer gruplara göre daha azdır (Şekil 4.50).

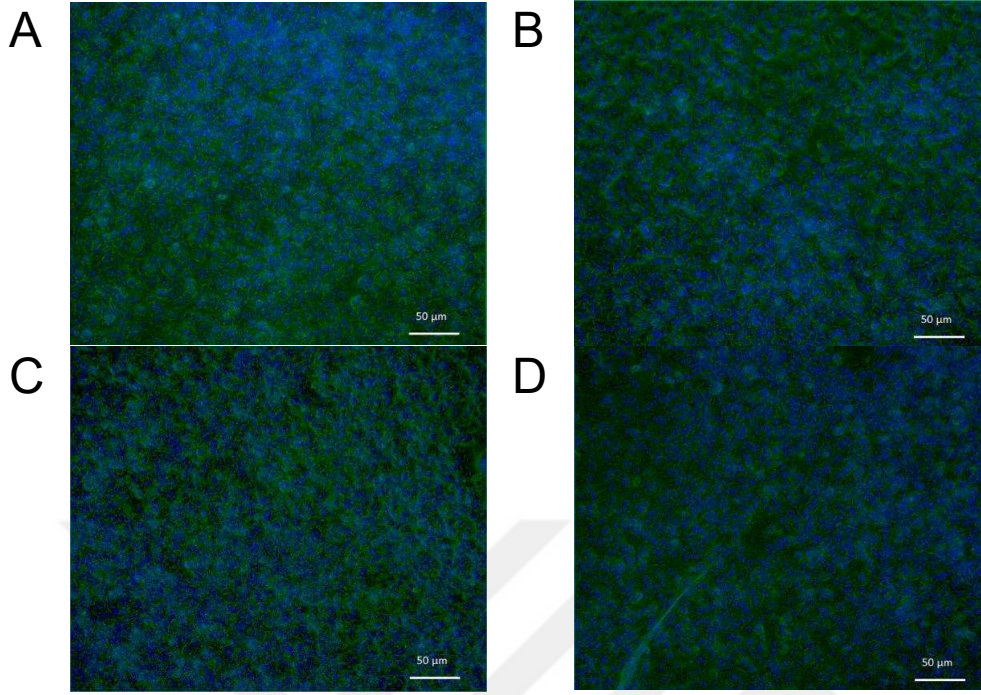
Klaudin-5



Şekil 4.51 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve Klaudin-5 proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri. Ölçü çizgileri 50 μm 'ye karşılık gelmektedir. Mavi floresans hücre çekirdeğini gösteren DAPI boyamaları, yeşil floresans ise Klaudin-5 varlığını göstermektedir.

Statik ve bütün dinamik modellerde İF boyaması ile Klaudin-5 TJ protein ifadesi izlenmiştir (Şekil 4.51).

JAM-A



Şekil 4.52 HBEC-5i hücrelerinin A. statik kültür koşullarında, B. sadece kayma gerilimi altında (sabit), C. kayma gerilimi ve dairesel germe altında (sistolik) ve D. akut hipertansiyon koşulları altında 5 günlük inkübasyonundan sonra elde edilen ve JAM-A proteininin ifadesini incelemek için uygulanan İF boyama görüntüleri. Ölçü çizgileri 50 μm 'ye karşılık gelmektedir. Mavi floresans hücre çekirdeğini gösteren DAPI boyamaları, yeşil floresans ise JAM-A varlığını göstermektedir.

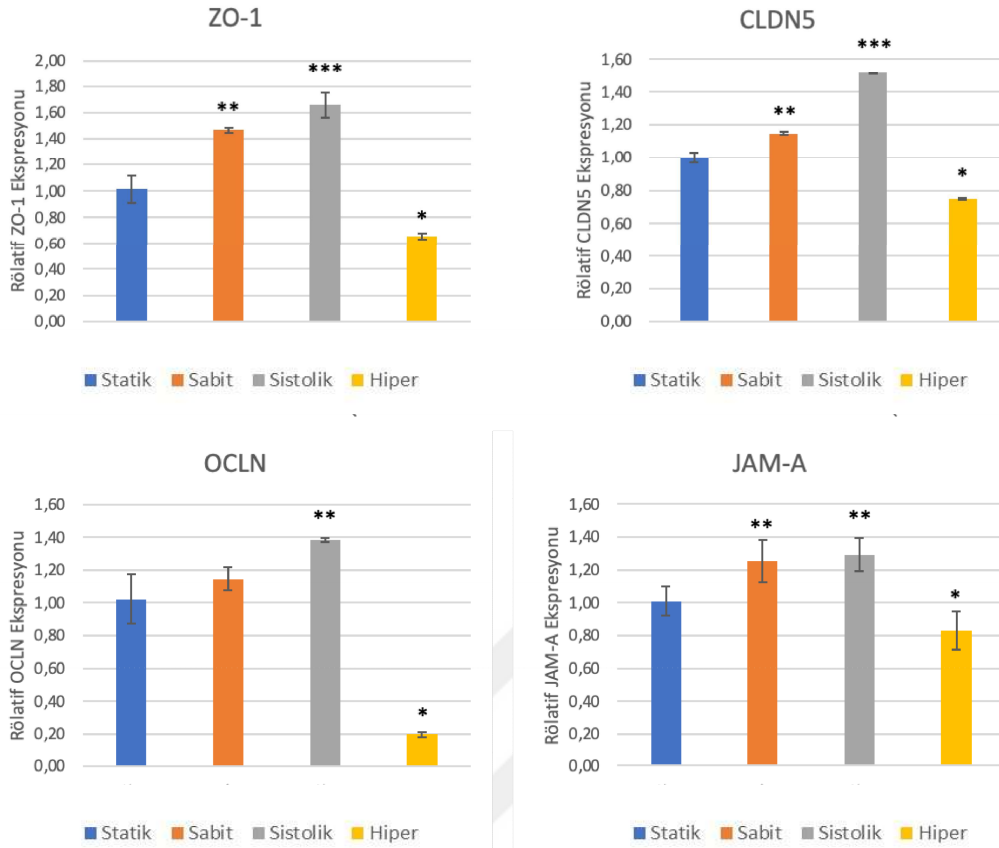
Statik ve bütün dinamik modellerde İF boyaması ile yoğun olarak JAM-A TJ protein ifadesi izlenmiştir (Şekil 4.52).

HBEC-5i hücreleri üzerinde statik modelde, sadece kayma geriliminin modellendiği sabit sistemde, kayma gerilimi ve dairesel germenin modellendiği sistolik sistemde ve akut hipertansiyon modelinde gerçekleştirilen İF görüntüleri incelendiğinde genel olarak hücrelerin ilgili proteinleri sentezlediği görülmektedir. Beklendiği şekilde her hücrede var olduğu bilinen F-aktin proteini tüm gruplarda gözlemlenebilmiştir. Statik modelde ve sabit modelde hücre yoğunluğunun diğer modellere göre fazla olduğu, hipertansiyon modelinde hücre sayısının çok azaldığı ve hücreler arası mesafenin arttığı görülmektedir. β -Katenin, hücreler arası AJ'lerin gerçekleşmesinden sorumlu VE-Kaderinlerin hücre içerisinde F-aktinlere

bağlanmasından sorumlu protein kompleksinin bir parçasıdır. Tüm gruplarda var olduğu görülen β -Katenin proteini, hipertansiyon modelinde diğer modellere göre daha az gözlenmiştir. Hücreler arası tüm bağlantı tiplerinin azaldığı gözlenen hipertansiyon modelinde, β -Katenin proteininin de diğerlerine göre daha az olması beklenen bir sonuçtur. Çünkü hücrelerdeki AJ'lerin miktarı arttıkça hücre içerisindeki bağlantı protein komplekslerinin miktarı da artmaktadır. VE-Kaderin proteinlerinin de IF boyama sonuçları incelendiğinde en az protein ifadesinin hipertansiyon modelinde olduğu görülmektedir. Statik, sabit ve sistolik modellerde AJ bağlantı proteinleri olan VE-Kaderinlerin benzer yoğunlukta olduğu gözlemlenmiştir. Dört farklı model arasında hipertansiyon modeli haricinde AJ'ler bakımından bir farklılık bulunmamıştır. Bu sonuçlar beklenen şekilde literatür verileri ile uyumaktadır (Angulo-Urarte et al., 2020; Gordon et al., 2020). IF boyama sonuçlarına göre TJ proteinlerinin (ZO-1, Okludin, Klaudin-5 ve JAM-A) varlığı incelendiğinde tüm gruplarda bu proteinlerin varlığı gözlemlenmiştir. ZO-1, Okludin ve Klaudin-5 proteinlerinin ifadesi statik, sabit ve sistolik modellerde hipertansiyon modeline göre fazlalık gösterirken, JAM-A proteininin tüm gruplarda benzer şekilde ifade edildiği belirlenmiştir. PCR verilerinde de JAM-A proteinlerinin tüm gruplarda diğer proteinlere göre daha yüksek oranda ifade edildiği gösterildiğinden sonuçlar birbirleri ile uyumludur. PCR verilerine göre bu proteinlerin statik, sabit ve sistolik modellerde inkübe edilen HTBS'lerin TJ proteinlerini ifade edip birbirlerine benzer şekilde sonuç verdiği görülmektedir. Hipertansiyon modelinde beklendiği şekilde hücre sayısında mekanik etkilerden ötürü azalma olduğu, buna bağlı olarak hücre arası TJ proteinlerinin de azaldığı düşünülmektedir.

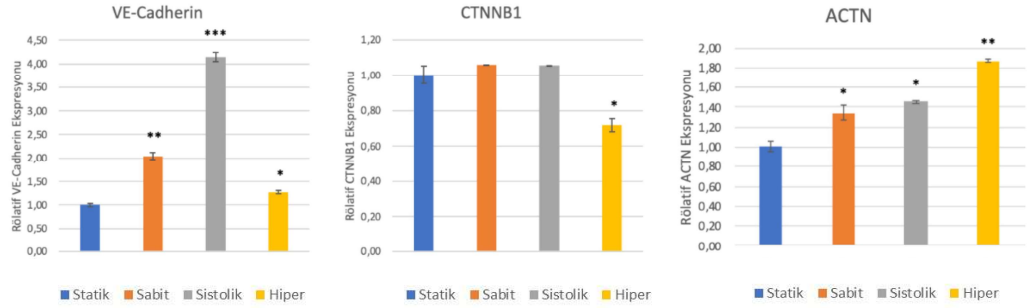
4.5.8. Proteinlerin mRNA ifade düzeyindeki değişimlerinin kantitatif PCR ile gösterilmesi

Statik model ve dinamik modellerin HBEC-5i hücrelerinin protein ifade düzeylerine olan etkisini incelemek için gerçek zamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. Mekanik uyarılar ile aktive olan TJ proteinlerinin (ZO-1, Okludin, Klaudin-5 ve JAM-A) ifadesini gösteren sonuçlar Şekil 4.53'de, AJ proteini olan VE-Kaderin, bu proteini aktinlere bağlayan β -Katenin ve F-aktin protein ifadesini gösteren sonuçlar Şekil 4.54'te verilmiştir.



Şekil 4.53 Sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1, Okludin, Klaudin-5, JAM-A) mRNA ifade düzeylerindeki değişimleri tüm modeller (statik, sabit akış, sistolik ve hipertansiyon) üzerinde gösteren grafikler ($p < 0,005$).

TJ proteinleri için kantitatif PCR sonuçları incelendiğinde, tüm proteinler için hipertansiyon modelinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Sistolik modelde ise ZO-1, Okludin ve Klaudin-5 proteinleri için tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüş, sadece JAM-A proteini için sabit modele göre anlamlı bir artış görülmemiştir. Sabit modelde Okludin proteini dışında diğer bütün proteinlerde statik modele göre anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.53).



Şekil 4.54 Adherens bağlantı proteini olan VE-Kaderin ve hücre içerisinde VE-Kaderinler ile F-aktinler arası bağlantıyı sağlayan kompleks proteinlerin bir türü olan β -Katenin proteininin ve F-aktin proteininin mRNA ifade düzeylerindeki değişimleri tüm modeller (statik, sabit, sistolik ve hipertansiyon) üzerinde gösteren grafikler ($p < 0,005$).

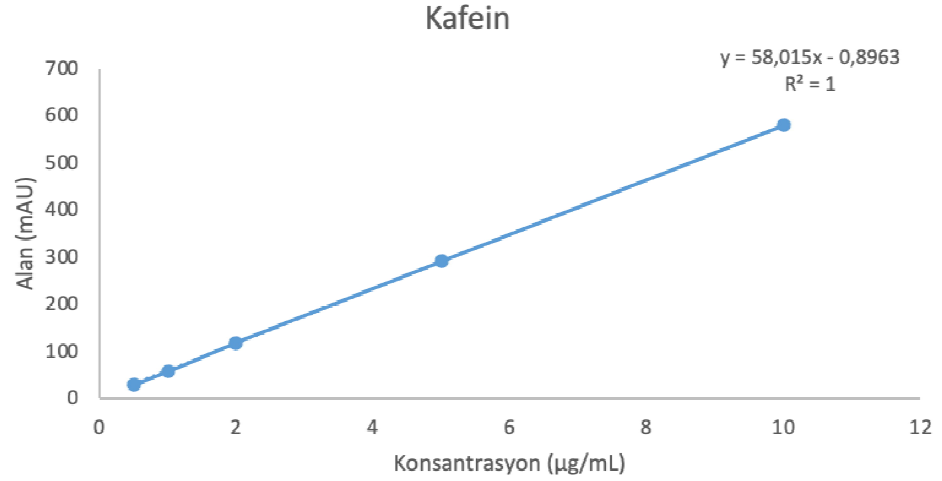
AJ proteini olan VE-Kaderin için kantitatif PCR sonuçları incelendiğinde, sistolik modelin tüm gruplardan anlamlı olarak yüksek oranda eksprese edildiğini göstermektedir. Sabit ve hipertansiyon modelleri de statik modele göre anlamlı olarak yüksek ve birbirlerinden istatistiksel olarak farklıdır. Dinamik modellerde AJ'lerin statik modele göre fazla olduğu görülmektedir. F-aktin proteinin tüm gruplarda yüksek miktarda eksprese edildiği, ama sabit akışlı ve sistolik modelde statik modelden anlamlı olarak fazla olduğu, hipertansiyon modelinde daha da artmış olduğu görülmektedir. VE-Kaderinler ile F-aktinlerin bağlantısında rol alan β -Katenin proteini ise sadece hipertansiyon modelinde düşüş göstermiştir (Şekil 4.54).

Statik modelde ve dinamik modellerde kültive edilen HBEC-5i hücrelerindeki mRNA protein ifadelerini incelemek için gerçekleştirilen PCR sonuçları incelendiğinde, tüm TJ proteinleri için hipertansiyon modelinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Diğer analiz sonuçları ile uyumlu olan bu sonuca göre hipertansiyonda hücrelerin 5 gün süre ile maruz kaldığı >180 mmHg basınç sebebi ile hücre sayısında azalma gerçekleşmiş, hücreler arası mesafe artmış ve TJ protein ifadeleri düşmüştür. Sistolik modelde ise ZO-1, Okludin ve Klaudin-5 proteinleri için tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüş, sadece JAM-A proteini için sabit modele göre anlamlı bir artış görülmemiş fakat statik ve hipertansiyon modeline göre anlamlı bir artış görülmüştür. Sistolik model, hücreler üzerinde kayma geilimi ve dairesel germeyi

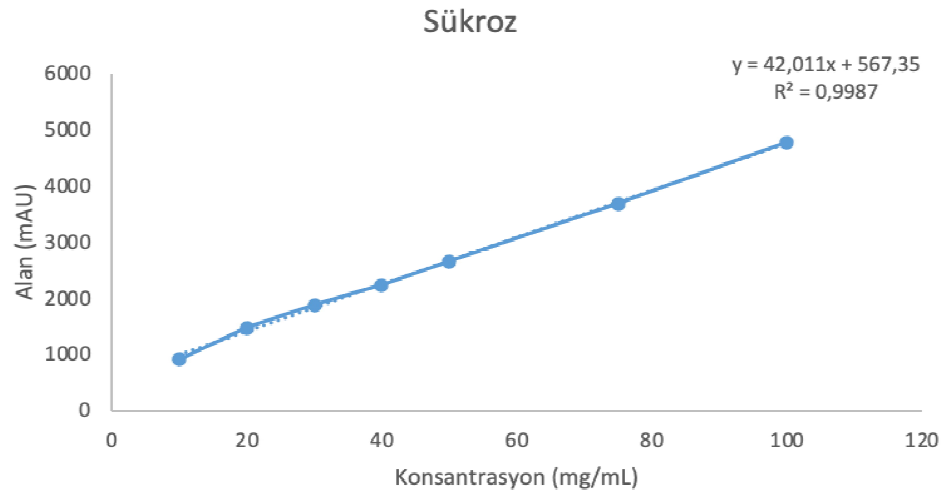
aynı anda veren modeldir ve vücuttaki mekanizmaya en yakın model olarak bu çalışmada kullanılmıştır. Beklenen şekilde bu modelde en yüksek TJ protein ifadesi sonucu alınmıştır. Hücreler maruz kaldıkları mekanik uyarılar karşısında birbirlerine daha sıkı tutunmak adına TJ protein ifadesini artırırlar. AJ proteini olan VE-Kaderin için kantitatif PCR sonuçları incelendiğinde, sistolik modelin tüm gruplardan anlamlı olarak yüksek oranda eksprese edildiğini göstermektedir. Beklendiği şekilde VE-Kaderinlerin ifadesi sistolik şartlar altında diğer modellere göre artış göstermiştir. Sabit akışlı ve hipertansiyon modelleri de statik modele göre anlamlı olarak yüksek ve birbirlerinden istatistiksel olarak farklıdır. Tüm dinamik modellerde AJ'lerin statik modele göre fazla olduğu görülmektedir. F-aktin proteinin tüm gruplarda eksprese edildiği, sabit ve sistolik akışlı modelde anlamlı olarak statik modelden fazla olduğu, hipertansiyon modelinde ise diğer bütün gruplara göre anlamlı bir artış gösterdiği gözlenmiştir. VE-Kaderinler ile F-aktinlerin bağlantısında rol alan β -Katenin proteini ise sadece hipertansiyon modelinde düşüş göstermiştir. Bunun sebebi olarak yine basınç etkisi ile hücre sayısında azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.5.9. Sistemin geçirgenlik başarısının değerlendirilmesi

İnkübasyonun 5. Gününde, statik ve dinamik modellerde kültive edilen HTBS'lerin luminal kısmından, besi ortamı içinde, 100 μ g/mL kafein, 100 mg/mL süktroz verilmiş ve 60 dk boyunca modellerden geçirilerek, abluminal kısımdan örnekler alınmıştır. Analizler gerçekleşmeden önce **3.4.6. Geçirgenlik testleri** başlığında açıklandığı gibi, kafein ve süktroz standardı için HPLC'de kalibrasyon grafikleri çıkarılmıştır (Şekil 4.55 – 56). Kalibrasyon grafiklerinin eğimlerinden elde edilen denklemlere göre HPLC'den elde edilen veriler konsantrasyona çevrilmiştir. Bu konsantrasyonlar üzerinden, statik modelden ve dinamik modellerden elde edilen permeabilite değerleri elde edilmiştir (**bkz. 3.4.6**). Geçirgenlik sonuçları Tablo 4-3'te belirtilmiştir.



Şekil 4.55 HPLC ile kafein miktar analizi gerçekleştirebilmek için çizilen kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.56 HPLC ile sükroz miktar analizi gerçekleştirebilmek için çizilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 4-3 Statik ve dinamik modellerden elde edilen sükroz ve kafein permeabilite değerleri (cm/s).

	Statik	Sabit	Sistolik	Hipertansiyon
P_{Sükroz} (cm/s)	$7,19 \times 10^{-6}$	$3,62 \times 10^{-7}$	$4,21 \times 10^{-7}$	$8,35 \times 10^{-5}$
P_{Kafein} (cm/s)	$6,73 \times 10^{-5}$	$5,17 \times 10^{-5}$	$4,80 \times 10^{-5}$	$2,84 \times 10^{-4}$

Tüm modellerin geçirgenlik analizleri incelendiğinde *in vivo* damar yapısında yüksek permeabilite gösteren kafein ($4,2 \times 10^{-5}$ cm/s) ve düşük permeabilite gösteren sükröz (3×10^{-8} cm/s) değerlerine en yakın verilerin beklendiği şekilde sistolik modelde elde edildiği görülmektedir (Hakkarainen, 2013; Wong et al., 2013). Hipertansiyon modelinin ise diğer analizler ile uyumlu olarak geçirgenliğin hem sükröz hem de kafein molekülü için en yüksek olduğu model olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-3). Hipertansiyon modelinde hücre sayısının ve dolayısıyla hücreler arası TJ ve AJ'lerin azalmasının geçirgenliğin artmasına yol açması beklenen bir sonuçtur. Kayma gerilimi uygulanan her iki model de (sabit ve sistolik), statik modele göre daha gerçekçi permeabilite sonuçları göstermiştir (Tablo 4-3). Fakat hücrelere hem kayma gerilimi hem de dairesel germe uygulandığında hücreler arası TJ'lerin artması ile geçirgenliğin düştüğü görülmüştür. Geçirgenlik analizi sonucunda dinamik modellerin statik modele göre kullanılabilirliğinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Sükröz geçirgenliğinde beklenen değerlere ($P_{\text{sükröz}} < 1 \times 10^{-7}$ cm/s) ulaşamamış olmasının sebebi olarak dinamik sistolik ve sabit modellerde üçlü ko-kültür yapılamamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Astrosit ve perisitlerin varlığında HBEC-5i'lerin sıkı bağlantı protein ifadesinin artacağı ve dolayısı ile geçirgenliğinin azalacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanın vücut içerisinde dokulara ve organlara taşınımı için kullanılan damar yolunda, dokular ve kan arasındaki madde transferini düzenleyen endotel hücreleri, bu tez çalışması kapsamında geliştirilen biyoreaktör ile gerçekçi bir *in vitro* damar modeli oluşturabilmek için çeşitli fizisel etkilere maruz bırakılmıştır.

Çalışma kapsamında geliştirilen *in vitro* atardamar modelinin, damarın vücut içerisinde gösterdiği performansı yakalayabilmesi için, farklı kademelerdeki kayma gerilimi ve dairesel germe etkileriyle 5 gün boyunca inkübasyonu gerçekleştirilmiş, bu etkilerin yarattığı hücresel yanıtlar incelenmiştir. Tez kapsamında tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen biyoreaktör sayesinde, bu etkiler kademeli olarak sistemler üzerinde uygulanabilmiş, tezin ana hedefi olan *in vivo* denemelerde kullanılacak hayvan sayısını azaltabilecek şekilde, farklı ilaç geçirgenlik denemelerinde kullanılabilecek bir model oluşturulmuştur.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş, kayma gerilimi ve dairesel germe etkilerinin, vücuttakine benzer şiddette, birlikte uygulandığı Sistolik Akış Sisteminin istenilen performansı yakaladığı görülmüştür. Mekanik uyarılarla birlikte gerçekçi bir mikro ve makro çevrede tutulan hücrelerin, mevcut ilaç geçirgenlik çalışmalarında kullanılan statik modellere göre, daha başarılı ve gerçekçi bir *in vitro* damar modeli oluşturduğu gösterilmiştir.

Endotel hücreleri üzerinde bulunan mekanosensörlerin kayma gerilimini algılayarak hücre yapılanmasını değiştirdiği görülmüş, yalnızca kayma gerilimi uygulanan Sabit Akış Sistemi ile Sistolik Akış Sistemi arasında oluşan farklar, dairesel germe etkilerinin de en az kayma gerilmesi kadar önemli olduğunu göstermiştir. Sabit ve sistolik akış ile hücreler arası TJ ve AJ bağlantıları artmış, dolayısıyla model yapısının geçirgenliği düşmüştür. Bu sayede endotel hücrelerinin, ilaç geçirgenlik çalışmalarında vücut içindekine benzer şekilde bir yanıt verebileceği ve ön klinik çalışmalar için gerçekçi sonuçlar elde edilebileceği gösterilmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen Hipertansiyonda Akış Sistemi ile yüksek basınç ve buna bağlı artan dairesel germe etkilerinin, diğer sistemlerle aynı kayma

gerilimine maruz bırakılmış olmasına rağmen endotel hücreleri üzerinde hasar yarattığı gösterilmiştir. Bu hasar sonucunda, akut hipertansiyon etkilerinin, damar geçirgenliğinde önemli artışa yol açtığı mekanobiyolojik açıdan ispatlanmıştır. Pek çok hastalıkla hipertansiyonun eş zamanlı görülmesi korelatif olarak gözlemlenmiş olsa da bu rahatsızlıklar arasında fizyolojik bağlantı tam olarak bilinmemektedir. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar, hipertansiyonun damar yapısındaki endotellerde oluşturduğu hasar sonucu bozulan madde taşınım mekanizmasının, hastalıkların başlangıç ve ilerlemesinde etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Geliştirilen bu biyoreaktör ve doku mühendisliği ürünü *in vitro* damar modelinin, farklı hastalıkların damar yapısına olan etkisinin incelenmesinde ve farmasötik adayların özellikle Kan Beyin Bariyeri (KBB) gibi geçirgenliği düşük olduğu bilinen sistemlerden beyin dokusuna geçiş olasılığının gösterilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışması boyunca endotel hücreleri odak noktası olarak belirlenmiş, tübüler bakteriyel selüloz iskelenin optimizasyonu veya gerçek damar yapısında olduğu gibi çevre hücrelerin sisteme olan katkısı değerlendirilememiştir. İleride yapılacak denemelerde, hedef damar yapısının mikro ve makro çevresine odaklanması, mekanik etkilerin yanında komşu hücrelerle olan etkileşimin de sisteme dahil edilmesi, modelin gerçekçiliğini arttıracaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Altman, G. H., Horan, R. L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P. R. H., Volloch, V., Richmond, J. C., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L., 2002, Cell differentiation by mechanical stress., The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 16(2): 270–272 p.

Angulo-Urarte, A., van der Wal, T., & Huveneers, S., 2020, Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1862(9): 183316 p.

Anwar, M. A., Shalhoub, J., Lim, C. S., Gohel, M. S., & Davies, A. H., 2012, The Effect of Pressure-Induced Mechanical Stretch on Vascular Wall Differential Gene Expression, Journal of Vascular Research, 49(6): 463–478 p.

Bagchi, S., Chhibber, T., Lahooti, B., Verma, A., Borse, V., & Jayant, R. D., 2019, In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: An overview, Drug Design, Development and Therapy, 13 3591–3605 p.

Ballermann, B. J., Dardik, A., Eng, E., & Liu, A., 1998, Shear stress and the endothelium, Kidney International, Supplement, 54(67): 100–108 p.

Barbee, K. A., Mundel, T., Lal, R., & Davies, P. F., 1995, Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and nonaligned endothelial monolayers, American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 268(4 37-4):.

Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I., 2004, Neurodegenerative diseases and oxidatives stress, In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 3, Issue 3, pp. 205–214), Nature Publishing Group.

Bayir, E., 2018, *Üç Boyutlu In Vitro Dinamik Kan Beyin Bariyeri Modeli*

Geliştirilmesi ve Modelin Geçirgenliğinin İncelenmesi, Ege Üniversitesi.

- Bayir, E., Bilgi, E., Hames, E. E., & Sendemir, A.**, 2019, Production of hydroxyapatite–bacterial cellulose composite scaffolds with enhanced pore diameters for bone tissue engineering applications, *Cellulose*, 26(18): 9803–9817 p.
- Bayir, E., Mert Celtikoglu, M., & Sendemir, A.**, 2018, 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 p.
- Bayir, E., Sahinler, M., Celtikoglu, M. M., & Sendemir, A.**, 2020, Bioreactors in tissue engineering: mimicking the microenvironment, In *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration*, LTD.
- Benam, K. H., Dauth, S., Hassell, B., Herland, A., Jain, A., Jang, K. J., Karalis, K., Kim, H. J., MacQueen, L., Mahmoodian, R., Musah, S., Torisawa, Y. S., Van Der Meer, A. D., Villenave, R., Yadid, M., Parker, K. K., & Ingber, D. E.**, 2015, Engineered in vitro disease models, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10 195–262 p.
- Benoit, M., & Gaub, H. E.**, 2002, Measuring Cell Adhesion Forces with the Atomic Force Microscope at the Molecular Level, *Cells Tissues Organs*, 172 174–189 p.
- Bilgi, E., Bayir, E., Sendemir-Urkmez, A., & Hames, E. E.**, 2016, Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean, *International Journal of Biological Macromolecules*, 90 2–10 p.
- Bonnier, F., Keating, M. E., Wróbel, T. P., Majzner, K., Baranska, M., Garcia-Munoz, A., Blanco, A., & Byrne, H. J.**, 2015, Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models, *Toxicology in Vitro*, 29(1): 124–131 p.

- Booth, R., Noh, S., & Kim, H.**, 2014, A multiple-channel, multiple-assay platform for characterization of full-range shear stress effects on vascular endothelial cells, *Lab on a Chip*, 14(11): 1880–1890 p.
- Burdick, J. A., & Vunjak-Novakovic, G.**, 2009, Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation, *Tissue Engineering - Part A*, 15(2): 205–219 p.
- Cengiz, M., Yavuzer, S., Kılıçkiran Avcı, B., Yürüyen, M., Yavuzer, H., Dikici, S. A., Karataş, Ö. F., Özen, M., Uzun, H., & Öngen, Z.**, 2015, Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension, *Clinical and Experimental Hypertension*, 37(8): 643–649 p.
- Charbonier, F. W., Zamani, M., & Huang, N. F.**, 2019, Endothelial Cell Mechanotransduction in the Dynamic Vascular Environment, *Advanced Biosystems*, 3(2): 1–16 p.
- Chen, H. C., & Hu, Y. C.**, 2006, Bioreactors for tissue engineering, *Biotechnology Letters*, 28(18): 1415–1423 p.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V.**, 2016, *Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow.*
- Courtenay, J. C., Deneke, C., Lanzoni, E. M., Costa, C. A., Bae, Y., Scott, J. L., & Sharma, R. I.**, 2018, Modulating cell response on cellulose surfaces; tunable attachment and scaffold mechanics, *Cellulose*, 25(2): 925–940 p.
- Courtenay, J. C., Johns, M. A., Galembeck, F., Deneke, C., Lanzoni, E. M., Costa, C. A., Scott, J. L., & Sharma, R. I.**, 2017, Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering, *Cellulose*, 24(1): 253–267 p.
- Cucullo, L., Hossain, M., Puvenna, V., Marchi, N., & Janigro, D.**, 2011, The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology, *BMC Neuroscience*, 12(1): 40 p.

- Cucullo, L., McAllister, M. S., Kight, K., Krizanac-Bengez, L., Marroni, M., Mayberg, M. R., Stanness, K. A., & Janigro, D., 2002,** A new dynamic in vitro model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier, *Brain Research*, 951(2): 243–254 p.
- Cunningham, K. S., & Gotlieb, A. I., 2005,** The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis, *Laboratory Investigation*, 85(1): 9–23 p.
- Davies, P. F., 2009,** Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology, In *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* (Vol. 6, Issue 1, pp. 16–26).
- Davies, P. F., Spaan, J. A., & Krams, R., 2005,** Shear stress biology of the endothelium, *Annals of Biomedical Engineering*, 33(12 SPEC. ISS.): 1714–1718 p.
- de Vries, R. B. M., Leenaars, M., Tra, J., Huijbregtse, R., Bongers, E., Jansen, J. A., Gordijn, B., & Ritskes-Hoitinga, M., 2015,** The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(7): 771–778 p.
- Deli, M. ´ A. A., Abrahám, C. S. ´, Abrahám, A., Kataoka, Y., & Niwa, M., 2005,** Permeability Studies on In Vitro Blood-Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1):.
- DeStefano, J. G., Xu, Z. S., Williams, A. J., Yimam, N., & Searson, P. C., 2017,** Effect of shear stress on iPSC-derived human brain microvascular endothelial cells (dhBMECs), *Fluids and Barriers of the CNS*, 14(1): 1–15 p.
- Duong, C. N., & Vestweber, D., 2020,** Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin, *Frontiers in Physiology*, 11 519 p.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M.,**

Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S., 2011, Role of YAP/TAZ in mechanotransduction, *Nature*, 474(7350): 179–184 p.

Fisher, A. B., Chien, S., Barakat, A. I., & Nerem, R. M., 2001, Endothelial cellular response to altered shear stress, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(3 25-3): 529–533 p.

Freshney, R. I., 2010, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (6th ed.), John Wiley&Sons, Inc.

Gavara, N., & Chadwick, R. S., 2016, Relationship between cell stiffness and stress fiber amount, assessed by simultaneous atomic force microscopy and live-cell fluorescence imaging, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 15(3): 511–523 p.

Gordon, E., Schimmel, L., & Frye, M., 2020, The Importance of Mechanical Forces for in vitro Endothelial Cell Biology, *Frontiers in Physiology*, 11(June): 1–20 p.

Griffith, L. G., & Swartz, M. A., 2006, Capturing complex 3D tissue physiology in vitro, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(3): 211–224 p.

Gulino-Debrac, D., 2013, Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function, *Tissue Barriers*, 1(2): e24180 p.

Hahn, C., & Schwartz, M. A., 2009, Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(1): 53–62 p.

Hakkarainen, J. J., 2013, In Vitro Cell Models in Predicting Blood-Brain Barrier Permeability of drugs, In *Publications of the University of Eastern Finland*.

Hillsley, M. V., & Tarbell, J. M., 2002, Oscillatory shear alters endothelial hydraulic conductivity and nitric oxide levels, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(5): 1466–1471 p.

- Hoffman, B. D., Grashoff, C., & Schwartz, M. A.**, 2011, Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction, *Nature*, 475(7356): 316–323 p.
- Hoskins, P. R.**, 2017, The Arterial System II. Forces, Adaptability and Mechanotransduction, In *Cardiovascular Biomechanics* (pp. 83–106), Springer International Publishing.
- Hoskins, P. R., & Hardman, D.**, 2017, Blood and Blood Flow, In *Cardiovascular Biomechanics* (pp. 37–63), Springer International Publishing.
- Hoskins, P. R., & Hose, D. R.**, 2017, The Arterial System I. Pressure, Flow and Stiffness, In *Cardiovascular Biomechanics* (pp. 65–81), Springer International Publishing.
- Hoskins, P. R., & Wilkinson, I. B.**, 2017, Hypertension, In *Cardiovascular Biomechanics* (pp. 271–284), Springer International Publishing.
- Humphrey, J. D.**, 2008, Mechanisms of arterial remodeling in hypertension coupled roles of wall shear and intramural stress, *Hypertension*, 52(2): 195–200 p.
- Ito, U., Ohno, K., Yamaguchi, T., Takei, H., Tomita, H., & Inaba, Y.**, 1980, Effect of hypertension on blood-brain barrier change after restoration of blood flow in post-ischemic gerbil brains: An electronmicroscopic study, *Stroke*, 11(6): 606–611 p.
- Jalali, S., del Pozo, M. A., Chen, K.-D., Miao, H., Li, Y.-S., Schwartz, M. A., Shyy, J. Y.-J., & Chien, S.**, 2001, Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3): 1042–1046 p.
- Johansson, B., Li, C. L., Olsson, Y., & Klatzo, I.**, 1970, The effect of acute arterial hypertension on the blood-brain barrier to protein tracers, *Acta*

Neuropathologica, 16(2): 117–124 p.

Jufri, N. F., Mohamedali, A., Avolio, A., & Baker, M. S., 2015, Mechanical stretch: Physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells, *Vascular Cell*, 7(1): 1–12 p.

Kačuráková, M., Smith, A. C., Gidley, M. J., & Wilson, R. H., 2002, Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy, *Carbohydrate Research*, 337(12): 1145–1153 p.

Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L., 2020, A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity, *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1): 1–24 p.

Kaisar, M. A., Sajja, R. K., Prasad, S., Abhyankar, V. V., Liles, T., & Cucullo, L., 2017, New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(1): 89–103 p.

Kakorin, I. D., Antonova, O. A., Balashov, S. A., & Mel’kumiants, A. M., 2010, Effect of malondialdehyde on deformability of human umbilical vein endothelial cells, *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Imeni I.M. Sechenova / Rossiiskaia Akademiia Nauk*, 96(2): 147–153 p.

Karki, P., & Birukov, K. G., 2019, Rho and Reactive Oxygen Species at Crossroads of Endothelial Permeability and Inflammation, *Antioxidants & Redox Signaling*, 31(13): 1009–1022 p.

Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C., 2016, In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(FEB):

Kim, I.-Y., Seo, S.-J., Moon, H.-S., Yoo, M.-K., Park, I.-Y., Kim, B.-C., & Cho, C.-S., 2008, Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnology Advances*, 26(1): 1–21 p.

- Komorowski, P., Siatkowska, M., Kamińska, M., Jakubowski, W., Walczyńska, M., Walkowiak-Przybyło, M., Szymański, W., Piersa, K., Wielowski, P., Sokołowska, P., Białkowska, K., Makowski, K., Elgalal, M., Kierzkowska, A., Ciupik, L., & Walkowiak, B.,** 2020, Comprehensive biological evaluation of biomaterials used in spinal and orthopedic surgery, *Materials*, 13(21): 1–16 p.
- Kuznetsova, T. G., Starodubtseva, M. N., Yegorenkov, N. I., Chizhik, S. A., & Zhdanov, R. I.,** 2007, Atomic force microscopy probing of cell elasticity, *Micron*, 38(8): 824–833 p.
- Liu, W.-Y., Wang, Z.-B., Zhang, L.-C., Wei, X., & Li, L.,** 2012, Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator Substances, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 18(8): 609–615 p.
- Liu, Z., Li, M., Turyanska, L., Makarovskiy, O., Patané, A., Wu, W., & Mann, S.,** 2010, Self-assembly of electrically conducting biopolymer thin films by cellulose regeneration in gold nanoparticle aqueous dispersions, *Chemistry of Materials*, 22(8): 2675–2680 p.
- Lizundia, E., Meaurio, E., & Vilas, J. L.,** 2016, Grafting of Cellulose Nanocrystals, In D. Puglia, E. Fortunati, & J. M. Kenny (Eds.), *Multifunctional Polymeric Nanocomposites Based on Cellulosic Reinforcements* (1st ed., pp. 61–114), Elsevier Inc.
- Maltman, D. J., & Przyborski, S. A.,** 2010, Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses, *Biochemical Society Transactions*, 38(4): 1072–1075 p.
- Moaveni, S.,** 2007, *Finite Element Analysis Theory and Application with ANSYS* (2nd ed., Vol. 2416514), Pearson Education.
- Mohammadi, M. T., & Dehghani, G. A.,** 2014, Intensification of brain injury and blood-brain barrier permeability by short-term hypertension in experimental model of brain ischemia/reperfusion, *Physiology and Pharmacology*, 18(1):

110–121 p.

Molino, Y., Jabès, F., Lacassagne, E., Gaudin, N., & Khrestchatisky, M., 2014, Setting-up an *In Vitro* Model of Rat Blood-brain Barrier (BBB): A Focus on BBB Impermeability and Receptor-mediated Transport, *Journal of Visualized Experiments*, 88.

Mueller, S. M., & Heistad, D. D., 1980, Effect of chronic hypertension on the blood-brain barrier., *Hypertension*, 2(6): 809–812 p.

Novosel, E. C., Kleinhans, C., & Kluger, P. J., 2011, Vascularization is the key challenge in tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4): 300–311 p.

O'Brien, F. J., 2011, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 14(3): 88–95 p.

Pierce, M., Stuart, J., Pungor, A., Dryden, P., & Hlady, V., 1994, Adhesion Force Measurements Using an Atomic Force Microscope Upgraded with a Linear Position Sensitive Detector, *Langmuir*, 10(9): 3217–3221 p.

Pires, P. W., Dams Ramos, C. M., Matin, N., & Dorrance, A. M., 2013, The effects of hypertension on the cerebral circulation, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 304(12): 1598–1614 p.

Plunkett, N., & O'Brien, F. J., 2011, Bioreactors in tissue engineering, *Technology and Health Care*, 19(1): 55–69 p.

Poon, C., 2020, Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices, *BioRxiv*, *i* 2020.08.25.266221 p.

Pörtner, R., Nagel-Heyer, S., Goepfert, C., Adamietz, P., & Meenen, N. M., 2005, Bioreactor design for tissue engineering, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3): 235–245 p.

- Prasain, N., & Stevens, T.**, 2009, The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes, *Microvascular Research*, 77(1): 53–63 p.
- Pries, A. R., Secomb, T. W., & Gaehtgens, P.**, 2000, The endothelial surface layer, *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 440(5): 653–666 p.
- Pries, Axel R., Reglin, B., & Secomb, T. W.**, 2005, Remodeling of blood vessels: Responses of diameter and wall thickness to hemodynamic and metabolic stimuli, *Hypertension*, 46(4): 725–731 p.
- Ramos, M., Valdès, A., & Garrigos, M. C.**, 2016, Multifunctional Applications of Nanocellulose-Based Nanocomposites, In D. Puglia, E. Fortunati, & J. M. Kenny (Eds.), *Multifunctional Polymeric Nanocomposites Based on Cellulosic Reinforcements* (1st ed., pp. 177–204), Elsevier Inc.
- Ren, J. L., Sun, R. C., Liu, C. F., Chao, Z. Y., & Luo, W.**, 2006, Two-step preparation and thermal characterization of cationic 2-hydroxypropyltrimethylammonium chloride hemicellulose polymers from sugarcane bagasse, *Polymer Degradation and Stability*, 91(11): 2579–2587 p.
- Resnick, N., Yahav, H., Shay-Salit, A., Shushy, M., Schubert, S., Zilberman, L. C. M., & Wofovitz, E.**, 2003, Fluid shear stress and the vascular endothelium: For better and for worse, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81(3): 177–199 p.
- Rouwkema, J., Rivron, N. C., & van Blitterswijk, C. A.**, 2008, Vascularization in tissue engineering, *Trends in Biotechnology*, 26(8): 434–441 p.
- Rüfenacht, D. A., Ohta, M., Yilmaz, H., Miranda, C., San Millan Ruiz, D., Abdo, G., & Lylyk, P.**, 2004, Current concepts of endovascular aneurysm treatment, and about the role of stents for endovascular repair of cerebral arteries, *Schweizer Archiv Fur Neurologie Und Psychiatrie*, 155(7): 348–352 p.
- Russell, W., & Burch, R.**, 1960, The Principles of Humane Experimental

Technique, Medical Journal of Australia, 1(13): 500–500 p.

Sarwar Jahan, M., Liu, Z., Wang, H., Saeed, A., & Ni, Y., 2012, Isolation and characterization of lignin from prehydrolysis liquor of kraft-based dissolving pulp production, Cellulose Chemistry and Technology, 46(3–4): 261–267 p.

Schwartz, M. A., 2010, Integrins and Extracellular Matrix in Mechanotransduction, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(12): a005066–a005066 p.

Seebach, J., Dieterich, P., Luo, F., Schillers, H., Vestweber, D., Oberleithner, H., Galla, H. J., & Schnittler, H. J., 2000, Endothelial barrier function under laminar fluid shear stress, Laboratory Investigation, 80(12): 1819–1831 p.

Shen, J., Luscinskas, F. W., Connolly, A., Dewey, C. F., & Gimbrone, M. A., 1992, Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells, American Journal of Physiology - Cell Physiology, 262(2 31-2): 384–390 p.

Skardal, A., Shupe, T., & Atala, A., 2016, Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling, Drug Discovery Today, 21(9): 1399–1411 p.

Stamatas, G. N., & McIntire, L. V., 2001, Rapid flow-induced responses in endothelial cells, Biotechnology Progress, 17(3): 383–402 p.

Sun, R. C., Sun, X. F., Liu, G. Q., Fowler, P., & Tomkinson, J., 2002, Structural and physicochemical characterization of hemicelluloses isolated by alkaline peroxide from barley straw, Polymer International, 51(2): 117–124 p.

Sunthornpan, N., Watanabe, S., & Moolsradoo, N., 2018, Corrosion resistance and cytotoxicity studies of DLC, TiN and TiCN films coated on 316L stainless steel, Journal of Physics: Conference Series, 1144(1):.

T. Ronaldson, P., & P. Davis, T., 2012, Blood-Brain Barrier Integrity and Glial

Support: Mechanisms that can be Targeted for Novel Therapeutic Approaches in Stroke, *Current Pharmaceutical Design*, 18(25): 3624–3644 p.

Takahashi, M., Ishida, T., Traub, O., Coron, M. A., & Berk, B. C., 1997, Mechanotransduction in Endothelial Cells: Temporal Signaling Events in Response to Shear Stress, *Journal of Vascular Research*, 34(3): 212–219 p.

Tan, K. H., Harrington, S., Purcell, W. M., & Hurst, R. D., 2004, Peroxynitrite Mediates Nitric Oxide-Induced Blood-Brain Barrier Damage, *Neurochemical Research*, 29(3): 579–587 p.

Thi, M. M., Tarbell, J. M., Weinbaum, S., & Spray, D. C., 2004, The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: A “bumper-car” model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47): 16483–16488 p.

Uzarski, J. S., Scott, E. W., & McFetridge, P. S., 2013, Adaptation of Endothelial Cells to Physiologically-Modeled, Variable Shear Stress, *PLoS ONE*, 8(2): 17–19 p.

Vaziri, N. D., Ding, Y., & Ni, Z., 1999, *Nitric Oxide Synthase Expression in the Course of Lead-Induced Hypertension*.

Weksler, B. B., Subileau, E. A., Perrière, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D. K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I. A., & Couraud, P. O., 2005, Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line, *The FASEB Journal*, 19(13): 1872–1874 p.

Wendt, D., Riboldi, S. A., Cioffi, M., & Martin, I., 2008, Bioreactors in Tissue Engineering: Scientific Challenges and Clinical Perspectives, In *Educational Technology and Society* (Vol. 20, Issue 1, pp. 125–143).

White, C. R., & Frangos, J. A., 2007, The shear stress of it all: The cell membrane and mechanochemical transduction, *Philosophical Transactions of the Royal*

Society B: Biological Sciences, 362(1484): 1459–1467 p.

Whittaker, R. J., Booth, R., Dyson, R., Bailey, C., Parsons Chini, L., Naire, S., Payvandi, S., Rong, Z., Woollard, H., Cummings, L. J., Waters, S. L., Mawasse, L., Chaudhuri, J. B., Ellis, M. J., Michael, V., Kuiper, N. J., & Cartmell, S., 2009, Mathematical modelling of fibre-enhanced perfusion inside a tissue-engineering bioreactor, *Journal of Theoretical Biology*, 256(4): 533–546 p.

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 p.

Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., Searson, P. C., Nadeau, J., & Sharma, H. S., 2013, *The blood-brain barrier: an engineering perspective*.

Xie, Y., & Lu, J., 2016, Bioreactors for Bone Tissue Engineering, In *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics* (pp. 115–122), Springer London.

Yao, Y., Rabodzey, A., & Dewey, C. F., 2007, Glycocalyx modulates the motility and proliferative response of vascular endothelium to fluid shear stress, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 293(2): 1023–1030 p.

Zaman, M., Xiao, H., Chibante, F., & Ni, Y., 2012, Synthesis and characterization of cationically modified nanocrystalline cellulose, *Carbohydrate Polymers*, 89(1): 163–170 p.

Zamir, M., 2016, Pulsatile Flow in an Elastic Tube, In *Hemo-Dynamics* (pp. 123–157), Springer, Cham.

Zhang, M., Chen, C. Y., Hu, Y., & Lyu, B., 2020, [The relationship between adherens junction and tight junction and clinical symptoms in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome]., *Chinese Journal of Internal*

Medicine, 59(1): 40–46 p.

Zhao, J., Griffin, M., Cai, J., Li, S., Bulter, P. E. M., & Kalaskar, D. M., 2016, Bioreactors for tissue engineering: An update, *Biochemical Engineering Journal*, 109 268–281 p.

Zhao, L., Li, X., Niu, P., & Li, L., 2018, *The effect of shear on the cytoskeleton remodeling and physiological performance of myocardium cells through Tmod1.*

Zhao, S., Suciu, A., Ziegler, T., Moore, J. E., Bürki, E., Meister, J.-J., & Brunner, H. R., 1995, Synergistic Effects of Fluid Shear Stress and Cyclic Circumferential Stretch on Vascular Endothelial Cell Morphology and Cytoskeleton, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(10): 1781–1786 p.

ÖZGEÇMİŞ

Eğitim

Eylül, 2017 – Yüksek Lisans; Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İzmir

Eylül, 2011 – Temmuz, 2017 Lisans; Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir

Eylül, 2007 – Haziran, 2011 Lise; Silifke Anadolu Lisesi, Mersin

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Bayir, E., Mert Celtikoglu, M., & Sendemir, A., 2018, 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 p.

Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler

Bayir, E., Sahinler, M., Celtikoglu, M. M., & Sendemir, A., 2020, Bioreactors in tissue engineering: mimicking the microenvironment, In *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration*, LTD.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

Bayir, E., Celtikoglu, M., Sendemir, A. (2018), “Bacterial Nano-cellulose Scaffold as a Basal Lamina for *In Vitro* Blood Brain Barrier Model”, 15th International Conference on Nanosciences&Nanotechnologies, Selanik, Yunanistan, Sözlü Bildiri, Özet

Celtikoglu, M., Sahinler, M., Turkay, C. (2018), “Conversion Of A 3D Printer Into Bioprinter And Bioprinting Applications”, International Biomedical Engineering

Congress'18 Special Session I: Biomedical Applications Of 3D Printing Technology, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs, Sözlü Bildiri

Bayir, E., Celtikoglu, M., Sendemir, A. (2018), “Comparison Of Different In Vitro Static Blood Brain Barrier (BBB) Models”, International Biomedical Engineering Congress'18, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs, Sözlü Bildiri

B.O. Gurses, M.M. Celtikoglu, E. Bayir, M. Sener, A. Baltaci, L. Cetin, M. Boztepe, A. Sendemir Urkmez (2017), “Electromagnetic manipulation of iron oxide nanoparticle-labeled endothelial progenitor cell microtissues”, 18th International Symposium on Electromagnetic Fields in Mechatronics Electrical and Electronic Engineering (ISEF 2017), Eylül 14-16, Lodz, Polonya, Poster Bildiri, Özet

M. Mert Celtikoglu, E. Bayir, A. Şendemir Ürkmez (2016), “Different Formation Techniques of Iron Oxide Nanoparticle Labeled Microtissues and Comparison of Cytotoxic Effects of Nanoparticle Concentrations”, 13th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN16), Temmuz 5-8, Selanik, Yunanistan.

B.O. Gürses, E. Bayir, M. Çeltikoğlu, A. Şendemir Ürkmez, O. Işıtman, İ. Aydın, M. Şener, L. Çetin, A. Baltacı, M. Boztepe, M. Sarıkanat (2015), “An Electromagnetic Actuator for Manipulation of Biological Samples”, VII. Bioengineering Congress (BEC 2015), Kasım 19-21, İzmir, Türkiye.

Tezler

2015 – “Farklı Tekniklerle Fe_3O_4 Nanoparçacık Yüklü Mikrodokuların Oluşturulması ve Nanoparçacık Konsantrasyonlarının Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi”, Lisans Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi

Projeler

2017 – “Hipertansiyonun Kan Beyin Bariyeri üzerine etkilerinin *in vitro* modelde incelenmesi” TÜBİTAK-COST, An integrative action for multidisciplinary studies on cellular structural networks CA15214, Proje no: 216M542 (Bursiyer).

Mesleki Deneyimler

Kalite Güvence Takım Lideri, Katsan Katgüt San. ve Tic. A.Ş., Ocak 2020 – Günümüz

Kalite Güvence Mühendisi, Katsan Katgüt San. ve Tic. A.Ş., Nisan 2019 – Ocak 2020

- Departman içi ve departmanlar arası projeleri yönetmek ve planlamak.
- Müşteri ilişkilerini yönetmek.
- Laboratuvar testleri (PPAP, FMEA) dahil olmak üzere ürün niteliklerine dair süreçleri yönetmek.
- SOP'ler, Kontrol Planları gibi Üretim ve Kalite Kontrol süreçlerinin uygulanmasını sağlamak.
- Süreç ve Ürün Validasyonlarının planlanması ve icrası.
- Çalışanları kalite disiplinleri ve ÇSG kuralları konusunda eğitmek.
- İşleyen bir Giriş, Üretim ve Final Kalite Kontrol süreçleri oluşturmak.
- Ürünlerimizi ISO 13485: 2016, FDA 510 (k) ve Tıbbi Cihaz Yönetmeliği (MDR) dahil olmak üzere IMS-Entegre Yönetim Sistemi ile belgelendirmek.
- Dokümantasyon Yönetimi.
- Müşteri Denetimleri, Kalite Yönetim Sistemi İç Denetimleri, Katmanlı Süreç Denetimleri.
- Risk ve Boşluk analizleri.
- Müşteri Şikayetleri ve Dahili NCR-Uygunsuzluk Raporları yönetimi.
- Düzeltici ve Önleyici Faaliyet planlaması, Kök Neden analizleri.

Sertifikalar

Tıbbi Cihaz Regülasyonuna (MDR) Göre Teknik Dokümantasyon İçeriği ve Klinik Veri Değerlendirme Eğitimi, Neta Sertifikasyon ve Teknik Kontrol LTD. ŞTİ., Ocak 2021 - (S.N.:0472)

2017/745/EU Tıbbi Cihaz Regülasyonu (MDR) Eğitimi, Neta Sertifikasyon ve

Teknik Kontrol LTD. ŞTİ., Aralık 2020 - (S.N.:0414)

ISO 13485:2016&19011:2018&14971:2019 Teknik Eğitimi, EGEDER, Neta Sertifikasyon ve Teknik Kontrol LTD. ŞTİ., Aralık 2020 - (S.N.:0344)

PIC/S & GAMP5 & EU Annex Regülasyonlarına Göre Bilgisayarlı Sistem Validasyonu Eğitimi, QVAC, Kasım 2020

ISO 13485:2016 Tıbbi Cihazlar Kalite Yönetim Sistemi Temel Bilgilendirme ve İç Denetçi Eğitimi, Kiwa, Temmuz 2020 – (S.N.:TR-2020-0684)

AIAG-VDA PFMEA Süreç – Hata Türü Ve Etkileri Analizi Semineri, TMMOB İzmir Şubesi, Şubat 2020 – (S.N.:KDM/2020/O4/07)

MS İleri Excel, i-Akademi, Ekim 2019 – (S.N.:092019100295)

Clinical Evaluation & Post Market Clinical Follow-Up (PMCF) for Medical Devices, Desia, Ağustos 2019 – (S.N.:201908220002)

MDR Tıbbi Cihaz Regülasyonu (2017/745/EU) Bilgilendirme Eğitimi, UDEM, Ağustos 2019 – (S.N.:UD/MDR-TCR/1079)

5 S Eğitimi, Eurocons, Temmuz 2019 – (S.N.:00/970)

ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi, Aralık 2018 – (S.N.:2018/68627)

ISO/IEC 17025:2017 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği, Aralık 2018 – (S.N.:2018/68477)

GLP – İyi Laboratuvar Uygulamaları, Aralık 2018 – (S.N.:2018/68327)

GMP – İyi Üretim Uygulamaları, Aralık 2018 – (S.N.:2018/68177)