

**SICAKLIK DUYARLI YÜZEYLERDE HÜCRE TABAKASI
YAKLAŞIMI İLE HÜCRE KÜLTÜRÜ VE ÜROTELİYAL GREFT
TASARIMI**

**UROTHELIAL GRAFT DESIGN BY CELL SHEET
APPROACH WITH CELL CULTURE ON THERMO-
RESPONSIVE SURFACES**

ALPER KEMAL DOĞAN

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Gelişiyile hayatımı aydınlatan sevgili oğlum Zafer'e,

SICAKLIK DUYARLI YÜZEYLERDE HÜCRE TABAKASI YAKLAŞIMI İLE HÜCRE KÜLTÜRÜ VE ÜROTELİYAL GREFT TASARIMI

Alper Kemal DOĞAN

ÖZET

Sunulan tez çalışmasında, doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak sıcaklık-duyarlı yüzeylerde hücre tabakası yaklaşımı ile hücre kültürü yapılmış ve elde edilen üroteliyal hücre tabakasının doku grefti olarak kullanıma uygun olup olmadığı belirlenmiştir.

Tez kapsamındaki çalışmaların ilk aşamasında, sıcaklık-duyarlı yüzeylerin oluşturulması için kullanılması öngörülen PNIPAAm bazlı polimerlerin sentezi, ve standart polistiren hücre kültür kaplarına aşılama gerçekleştirilmiştir. Polimer sentezi ve yüzeye aşılama amacıyla PNIPAAm [poli(*N*-izopropilakrilamid)] polimeri için elektron demeti polimerizasyonu ve poli(NIPAAm-NtBA) poly(*N*-izopropilakrilamid)– poly(*N*-*tert*-bütilakrilamid) için serbest radikal polimerizasyonu teknikleri kullanılmıştır. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin özelliklerini belirlemek amacıyla AFM ve SEM tekniklerinden yararlanılmıştır.

Tez çalışmasının sonraki aşamasında, karakterizasyonu tamamlanan sıcaklık-duyarlı yüzeylere polimer aşılama yoğunluğundan bağımsız olarak hücre tutunmasını sağlamak amacıyla Kollajen Tip I fiziksel olarak immobilize edilmiştir. Yüzey modifikasyonu sonrasında karakterizasyon SEM ve AFM yöntemleriyle yapılmıştır.

Tez çalışmasının sonraki bölümünde, sentezlenen ve modifikasyonu gerçekleştirilen sıcaklık-duyarlı yüzeyler ile g/G fare mesane üroteliyal hücre hattının kullanıldığı hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiş ve hücre adhezyon promotörü ile modifikasyonun hücre üremesi ve yapışması üzerindeki etkisi ortaya konmuştur. Biyomalzemeler üzerindeki hücre yapışması ve üremesi, hemositometrik sayım, Alamar blue ve MTT, ve yöntemleri ile takip edilmiştir. Hücrelerin morfolojisini saptamak amacıyla invert mikroskop ve SEM görüntüleri alınmıştır. Lusiferin-lusiferaz bazlı ATP testi ile yüzeye yapışan hücrelerin aktif adhezyon davranışı ortaya çıkartılmıştır.

Hücre tabakasının doku grefti olarak kullanıma uygun olup olmadığının belirlenmesi amacıyla terminal hücre farklılaşma parametresi olarak ürotel doku spesifik Uroplakin I ve Claudin 3,4 proteinlerinin ifadesine bakılmıştır. Protein ifadesinin tayini için western-blot analizi gerçekleştirilmiştir.

Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş yüzeylerde 2 saatlik kültür sonunda hücre yapışmasının, modifiye edilmemiş yüzeylere oranla ~%97 daha fazla olduğu saptanmıştır. Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerde özgül hücre yapışma hızının modifiye edilmemiş yüzeylere oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Değerler P(NIPA-NtBA) yüzeyler 0.11 saat⁻¹ için ve Kollajen modifiye

P(NIPA-NtBA) için 0.87saat^{-1} ve Standart TCPS için 0.69 saat^{-1} olarak bulunmuştur.

Hücrese ATP miktarının ölçümü Lusiferin'in ATP varlığında lusiferaz tarafından indirgenmesi ve biyoluminesans özellikle oksilusiferin oluşturması prensibine dayalı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonu bilinen ATP çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğine göre hücrese ATP miktarı nmol cinsinden belirlenmiştir.

Sıcaklık etkisi ile yüzeyden hücre tabakası eldesi için g/G fare mesane üroteliyal hücreleri ortamdaki besiyerinin 4°C dereceye getirilmiş besiyeri ile değiştirilmesi sonucunda yüzeyden koparılmıştır. Hücre-tabakası biçiminde ayrılma 5. dakikadan itibaren görüntülenmiştir. Ayrılma kültür kabının kenarlarından başlamış ve hücre tabakası ortaya doğru katlanma gözlemlenmiştir. 20 dakikanın sonunda elde edilen hücre tabakası tamamen kendi üstüne katlanmış bir forma gelmiştir.

Proteinlerin jelde yürütmesi neticesinde Uroplakin Ia ve Uroplakin Ib bantları sırasıyla 27 kD ve 28 kD seviyesinde, Claudin 3 ve Claudin 4 bantları ise 20kD seviyesinde görüntülenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak protein ekspresyonu sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen hücre tabakasının terminal düzeyde farklılaşma gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışması kapsamında hazırlanan PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeylerde gerçekleştirilen üroteliyal hücre kültürü sonucu elde edilen hücre tabakasının doku grefti olarak kullanılabilirlik potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : doku mühendisliği, hücre tabakası, sıcaklık-duyarlı yüzeyler, üroteliyal hücre kültürü, üroteliyal greft

Danışman : Prof. Dr. Erol AKSÖZ, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü.

UROTHELIAL GRAFT DESIGN BY CELL SHEET APPROACH WITH CELL CULTURE ON THERMO-RESPONSIVE SURFACES

Alper Kemal DOĞAN

ABSTRACT

In the presented study, urothelial cells have been cultured on thermo-responsive surfaces by cell sheet approach in order to determine its potential as an urothelial tissue graft.

On the first phase of the study, in order to obtain thermo-responsive surfaces, polymers of choice PNIPAAm [poly(*N*-isopropylacrylamide)] and P(NIPAAm-*Nt*BA) poly(*N*-isopropylacrylamide)(NIPAM) –poly(*N-tert*-butylacrylamide) have been synthesized and grafted onto tissue culture polystyrene surfaces by e-beam polymerization and free radical polymerization. Surface properties of the thermo-responsive dishes have been characterized by SEM and AFM analysis accordingly. In order to make the cells attach to the surface free of grafting density of the thermo-responsive polymer, grafted surfaces have further been modified with Collagen Type I as cell adhesion promoter.

In the next phase of the study, g/G mouse urothelial epithelial cells have been cultured on surface modified and non-modified thermo-responsive dishes. Cell attachment and proliferation have been identified by Alamar blue assay, MTT assay and haemocytometric cell counts. Urothelial cell morphology has been visualized by inverted and phase contrast microscopy. Adherence behaviour of the urothelial cells have been monitored with Luciferine/Luciferase ATP assay.

For the determination of adequacy as a tissue graft, terminal differentiation markers expressed as proteins have been identified specifically for urothelial cells, which are Uroplakin Ia and Uroplakin Ib along with Claudin 3 and Claudin 4. After protein extraction and antibody binding, western-blot analysis have been performed in order to determine the protein expression.

On Collagen modified thermo-responsive surfaces, cell adhesion was 97% more than cells on non-modified surfaces. The rate of cell attachment on Collagen Type I modified surfaces has been higher when compared with non-modified surfaces. The rate of cell adhesion on modified and non-modified thermo-responsive dishes were calculated as 0.87 hour⁻¹ and 0.11 hour⁻¹ respectively.

Temperature-controlled cell sheet detachment have been manipulated by changing the cell media with 4°C medium. Total cell sheet detachment took place in 20 minutes and have been visualised. Sheet detachment began at 5th minute from the edge of the culture flask and finalized at 20th minute. At the time of total detachment, cell sheet folded onto itself.

Results of terminal differentiation marker analysis with western blotting confirmed that the urothelial cell sheet had been differentiated terminally and can be utilized as an urothelial tissue graft. After gel electrophoresis, protein bands for Uroplakin Ia and Ib have been detected at 27-28 kD level, Claudin 3 and Claudin 4 bands have been visualized at 20kD level respectively.

In conclusion, cell sheets obtained from urothelial cell culture on temperature-responsive PNIPAAm based surfaces have the potential to be used as urothelial tissue grafts.

Key words : tissue engineering, cell sheet, temperature-sensitive surfaces, urothelial cell culture, urothelial graft.

Supervisor : Prof. Dr. Erol AKSÖZ, Hacettepe University, Department of Biology

TEŞEKKÜR

Beni doku mühendisliği alanıyla tanıştıran, bilimsel pratik manasında bildiğim herşeyi öğreten ve dolayısıyla hayatımı şekillendiren, bana açtığı yeni ufuklardan dolayı daima sevgi ve minnet duyacağım değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın hayata geçmesinde ön ayak olan ve her türlü desteğini hiç bir zaman esirgememiş olan Sayın hocam Prof.Dr. Erol AKSÖZ'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmarımı yürütürken özellikle hücre kültürü alanındaki desteği ve yardımlarından ötürü Sayın Burcu Çuhadar'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüzey karakterizasyonu konusundaki katkılarından ötürü can dostum Sayın Kaan ÖZEL'e ve SAM Eskişehir personeline teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma boyunca hiç bir zaman yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Soner ÇAKMAK ve Dr. Seda TIĞLI'ya en derin şükranlarımı sunarım.

Polimerizasyon reaktörünün yapımı için Sayın Ali AKPINAR'a teşekkürlerümi sunarım.

Malzeme teminindeki hasasietinden ötürü Synbio Ltd.Şti.den Sayın Yasin ARAS'a teşekkürlerimi sunarım

Tez çalışmam boyunca Tez İzleme Komitesi'nde bulunarak değerli katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. S. Cihan ÖNER ve Prof. Dr. Sibel SÜMER'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, anne ve babama, sevgili eşim Seda ve canım oğlum Zafer'e, kardeşim Gözde'ye sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	5
Doku Mühendisliği için Gerekli Faktörler.....	6
In vitro Doku Mühendisliği.....	8
In-vivo Doku Mühendisliği	9
Rejeneratif Tıp	10
2.2 ÜROTEL DOKU	12
2.2.1 Üroteliyal Doku Patolojileri	13
2.2.2 Üriner Sistem Doku Mühendisliği Uygulamaları	14
2.2.2.1 Üriner Sistem Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomateryaller.....	15
2.2.2.2 Ürolojik Yapıların Doku Mühendisliği	19
2.3 Sıcaklık-duyarlı polimerler ve PNIPAAm	22
2.3.1 PNIPAAm Uygulamaları.....	23
2.3.1.1 Sıcaklık-duyarlı hücre kültürü yüzeyleri:.....	25
2.3.1.2 Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin tasarımı :	27
2.3.1.3 Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Karakterizasyonu	30
2.3.1.4 Sıcaklık-duyarlı Yüzeylere Hücre Yapışması ve Ayrılması	33
2.4 Rejeneratif Tıp için Hücre Tabakası Mühendisliği :	36
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	40
3.1. DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	40
3.2. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin hazırlanması	42
3.2.1. Polimerik Malzemenin Sentezi	42
3.2.2. Polimerlerin Yüzeye Kaplanması	43
3.3. Sıcaklık-Duyarlı Yüzeylerin Modifikasyonu	44
3.4. Karakterizasyon Çalışmaları	44
3.4.1. AFM Analizi	44
3.4.2. SEM ile Morfolojik Analiz.....	45
3.5. Hücre Kültür Çalışmaları	45

3.5.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücre Tipi ve Karakterizasyonu.....	45
3.5.2. Sıcaklık-duyarlı yüzeyler İle Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışmaları ...	49
3.5.2.1. Elektron Demeti Polimerizasyonu ile hazırlanan PIPAAm Yüzeyler ile Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışmaları	49
3.5.2.2 Serbest Radikal Polimerizasyonu ile Hazırlanan Yüzeylerde Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışmaları	50
3.5.2.3. Sıcaklık-Duyarlı Yüzeylerde Hücre Tabakası Oluşumu ve Hücre Tabakasının Karakterizasyonu	52
3.5.2.4 Hücre Tabakasının Üroteliyal Greft Olarak Kullanılabilirliğinin Tayini	52
3.6. İstatistiksel Analiz.....	52
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI	53
4.1. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Oluşturulması	53
4.1.1. Sıcaklık-duyarlı polimerin sentezlenmesi ve yüzeye kaplanması.....	54
4.1.2. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Karakterizasyonu	58
4.2. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerden Üroteliyal Hücre Tabakası Elde Edilmesi	64
4.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	64
4.2.1.5.Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerde Hücre Yapışma Hız Sabitinin Hesaplanması	78
4.3 Sıcaklık Değişimi İle Hücre Tabakasının Yüzeyden Ayrılması	79
4.3.1 Hücre Tabakasının Farklılaşma Derecesinin Belirlenmesi.....	81
5.GENELSONUÇLAR.....	83
KAYNAKLAR DİZİNİ	87
EKLER	98
EK-1	98
Hücre Kültür Kaplarında g/G Fare Mesane Üroteliyal Epitel Hücrelerine Ait Özgül Üreme Hızı ve İkilenme Süresinin Hesaplanması	98
EK-2	100
MTT Kalibrasyon Grafiği	100
EK-3	101
ATP (Lusiferin/Lusiferaz) Kalibrasyon Grafiği	101
EK-4	102
Hücre Farklılaşmasının Tayini Amacıyla Gerçekleştirilen Western Blot Analiz Protokolü.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Doku mühendisliği ve doku inşası.....	8
Şekil 2.2. Mesane içi üroteliyal dokunun kesiti (HE boyama).....	14
Şekil 2.3. Interstityal sistit ve ülser oluşumu.....	16
Şekil 2.4. Üriner sistem doku mühendisliğinde kullanılan sentetik biyomateryallere örnek.....	18
Şekil 2.5. Doğal biyomateryaller a) Kollajen fibrilleri b)Kollajen bazlı aselüler ince barsak submukozal grefti.....	19
Şekil 2.6. Sentetik polimer bazlı hücre iskeleleri ve hazırlanan tübüler iskele (PLA/PGA ve p-kaprolakton).....	20
Şekil 2.7. Kadavra kökenli aselüler matriks ile gerçekleştirilen üretral rekonstrüksiyon(b). İmplantasyon sonrası yokolan daralma (a) ve (b), sistoskopi ile açık kanalın görüntüsü (d).....	21
Şekil 2.8. Kollajen yapı iskelesi üzerinde otolog üroteliyal hücre ve kas hücresi ekilmesiyle üç boyutlu hücre kültürü ve biyo-yapay mesane uygulaması.....	23
Şekil 2.9. Sıvı içerisinde ve yüzeylerde PNIPAAm yapısı ve özelliği.a) PNIPAAm yapısal formülü b) LCST altında ve üzerinde sıvı içerisinde çözünme/çözünmeme durumunun gösterilmesi c)Yüzeyler üzerinde sıcaklık- duyarlı hidrofilitite/hidrofobisite değişimi.....	25
Şekil 2.10. Düşük ve yüksek aşılama yoğunluğu ile hazırlanan “sıcaklık-duyarlı geçit” içeren mikro-kapsüllerden kontrollü ilaç salımı.....	26
Şekil 2.11. Kolon kromatografisi için sabit faz olarak PNIPAAm aşılansmış silika mikroküreler.....	27
Şekil 2.12. Tripsinizasyon ile yüzeyden hücre ayrılması.a)Monolayer HUVEC hücreleri b)Tripsinle işlenmiş gördükten sonra HUVEC hücreleri. Ok işareti yüzeyde kümelenmiş ölü-canlı hücre yığınlarını göstermektedir.....	28
Şekil 2.13. Enzimatik işlemler ve sıcaklık-kontrollü hücre ayrılması.....	29

Şekil 2.14. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin tasarımı ve alternatif aşılama teknikleri: a)Elektron demeti ile polimerizasyon b) Fonksiyonel grup bağlanmış zincirin yüzeye aşılama c) Başlatıcının yüzeye immobilizasyonu ve çapraz-bağlı zincirin aşılama d)Atom transfer radikal polimerizasyonu.....	32
Şekil 2.15. Atomik Güç Mikroskobu çalışma prensibi.....	33
Şekil 2.16. Taramalı Elektron Mikroskobu çalışma prensibi.....	34
Şekil 2.17. İntegrinlerin yapısı ve lokalizasyonu.....	36
Şekil 2.18. İntegrin aktivasyonu mekanizması ile hücrenin ECM ile bağlanması.....	37
Şekil 2.19. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerden aktif biçimde hücre tabakası ayrılması.....	38
Şekil 2.20. Basitten komplekse hücre tabakası mühendisliği ile doku rekonstrüksiyonu. Hücre tabakalarının tek olarak kullanımı ile kornea ve epitel doku oluşturulabildiği gibi, birden fazla tabaka ile miyokardiyal doku rejenerasyonu, sıcaklık-duyarlı bölgeler yaratılmasıyla ko-kültür ve böbrek, karaciğer gibi yüksek kompleks organların rekonstrüksiyonu potansiyeli.....	39
Şekil 2.21. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde limbal kök hücre kültürü ve korneal epitel hücre tabakası elde edilerek hasarlı korneaya transplantasyonu.....	40
Şekil 2.22. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde hücre tabakası mühendisliği ile gerçekleştirilen düz kas hücresi kültürü ve elde edilen tabakaların birbirine yapışmasıyla üç boyutlu miyokardiyal doku olarak kalp enfarktüs bölgesine implantasyonu.....	41
Şekil 3.1. Sıcaklık duyarlı yüzeylerin hazırlanmasında kullanılan monomerlerin ve başlatıcı ajanın kimyasal yapıları.....	43
Şekil 4.1. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde sıcaklık değişimine bağlı polimer zincir yapısındaki değişimler buna bağlı olarak değişen yüzey hidrofilitesi.....	58
Şekil 4.2. P(NIPAAm-NtBAm) aşılama sıcaklık-duyarlı yüzey ve Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık duyarlı-yüzeylerin 1µx1µ karesel alan AFM görüntüleri.....	63

Şekil 4.3. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin SEM görüntüleri.....	65
Şekil 4.4. g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri için üreme eğrisi (Başlangıç hücre konsantrasyonu: 5×10^4 hücre/ml'dir).....	67
Şekil 4.5. g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri için yapılan Alamar Blue testi. Mavi sütunların her biri bir hücre içeren kuyucuk iken, sarı sütunlar hücre içermeyen kontrol çözeltisidir.....	68
Şekil 4.6. g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri için üreme eğrisi (Başlangıç hücre konsantrasyonu: 5×10^4 hücre/ml'dir).....	69
Şekil 4.7. g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerinin zamana bağlı sitozolik ATP miktarları.....	70
Şekil 4.8. TCPS, P(NIPAAm-NtBAm) ve Kollajen Tip I ile modifiye edilen P(NIPAAm-NtBAm) kaplı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerin yapışma davranışı. Başlangıç hücre konsantrasyonu: 5×10^4 hücre/ml'dir. [*p<0.01 o p<0.01].....	72
Şekil 4.9. TCPS, P(NIPAAm-NtBAm) ve Kollajen Tip I ile modifiye edilen P(NIPAAm-NtBAm) kaplı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri; a) 2. Saatte yapışmaya başlayan hücreler (x20) b) 24. Saatten oluşan hücre tabakası (x20) c) 24 saat sonunda oluşan tabakanın faz kontrast mikroskopisi (x20).....	73
Şekil 4.10. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal hücrelerinin üreme davranışının MTT analizi ile mitokondriyel aktiviteye dayalı tayini. Başlangıç hücre konsantrasyonu: 2×10^4 hücre/ml'dir. [*p<0.01 , o p<0.01].....	76
Şekil 4.11. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal hücre yoğunluğunun Alamar Blue metodu ile takibi. Başlangıç hücre konsantrasyonu: 2×10^4 hücre/ml'dir. [*p<0.01 , o p<0.01].....	78
Şekil 4.12. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal hücre aktivitesinin ATP deneyi ile takibi. Başlangıç hücre konsantrasyonu: 2×10^4 hücre/ml'dir [* p<0.01 , o p<0.01].....	79
Şekil 4.13. g/G fare mesane üroteliyal tabakasının sıcaklık değişimine bağlı olarak ayrılmasının makroskopik görüntüleri.....	82
Şekil 4.14. g/G fare mesane üroteliyal tabakasının farklılaşmasının ölçütü olarak Üroplakin ve Claudin transmembran proteinlerinin ifadesi. (CLDN3 ve CLDN4 20.2 kD, UPIa 27 kD, UPIb 28 kD), Invitrogen MagicMarkXP marker.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı biyomateriyaller.....	9
Çizelge 2.2. Yöntem, çalışma prensibi ve analitik hassasiyet açısından yüzey karakterizasyonu teknikleri.....	11
Çizelge 4.1. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ 'lik alanlarda hesaplanan R_{ms} ve R_a değerleri.....	15
Çizelge 4.3. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G mesane üroteliyal epitel hücre yapışmasına ait k ve $t_{1/2}$ değerleri.....	20

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A°	: Angstrom
β	: Beta
γ	: Gamma
α	: Alfa
UV	: Ultraviyole
μ	: Özgöl hücre üreme hızı (saat ⁻¹)
t_d	: Hücre ikilenme süresi (saat)
C_f	: t anındaki serbest hücre konsantrasyonu (hücre/ml)
C_{f0}	: t=0 anındaki serbest hücre konsantrasyonu (hücre/ml)
k	: Özgöl hücre yapışma hızı (saat ⁻¹)
$t_{1/2}$	: Başlangıç hücre miktarının %50'sinin yüzeylere yapışması için gerekli süre (saat)
Col T1	: Kollajen Tip I
PNIPAAm	: poli-n-izopropilakrilamid
P(NIPAAm-NtBAm)	: Poli (n-izopropilakrilamid-n-terbütilakrilamid)
AIBN	: Azobisisobutironitril
kGy	: kiloGray
RGD	: Arjinin-Glisin-Aspartik asit
CLDN	: Claudin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
FBS	: Fetal sığır serum
MTT	: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür
ATP	: Adenozin trifosfat
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu

FTIR-ATR	: Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
eV	: Elektron volt
R _a	: Yüzey ortalama pürüzlülük değeri
X	: Hücre konsantrasyonu (hücre/ml)

1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI

Doğal dokuların rejenere edilmesi ve aynı zamanda hücrelerin kullanımı ile kayıp ya da işlevini yitirmiş organların yerine biyolojik olarak yenilerinin üretilmesini esas alan doku mühendisliği yaklaşımı, mühendislik ve biyolojik bilimleri biraraya getirmektedir. Temel elemanlarını doku yapı iskeleleri, hücreler ve sinyal moleküllerin oluşturduğu doku mühendisliği çalışmalarında, in vivo doku rejenerasyonunun gerçekleştirilmesi ya da in vitro koşullarda doku analoglarının üretilmesi mümkündür (Langer, R., Vacanti J.P., 1999).

Fakat her ne kadar doku mühendisliği kapsamında hazırlanmış kıkırdak, kemik ve vasküler yapılar gibi dokular oluşturulmuş olsa da geliştirilen bu yapıların klinik olarak uygulanabilirlikleri düşük olmaktadır. Transplantasyon sonrası doku yapı iskelelerinin biyobozunma süreci esnasında ortaya çıkan boşluk proliferasyon yapan hücreler ve hücre dışı matriks (ECM) tarafından doldurulur. Ancak ECM birikimi sıklıkla fibrozis ve skar doku oluşumuna sebep olmakta ve doku rejenerasyonu gerçekleşmemektedir.

Ayrıca, kimi durumlarda doku yapı iskelesinin yapısal özellikleri spesifik durumlar için istenmeyen durumlar yaratmaktadır. Örnek verilecek olursa, opaklık ve sertlik kardiyolojik ve oftalmolojik doku rekonstrüksiyonu girişimlerinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olmaktadır. Kök hücrelerin klinik olarak kullanıldığı rejeneratif tıp yaklaşımında hayvan sistemlerine yapılan süspanse hücre enjeksiyonları kısmen doku rejenerasyonunu sağlasa da, enjekte edilen hücrelerin büyük kısmı kaybedildiğinden büyük organların rejenerasyonu için yetersiz kalmaktadır.

Sıcaklık, pH, elektriksel alan gibi çevresel tepkilere cevap veren akıllı polimerler ile ilgili çalışmalara paralel olarak yakın zamanda doku mühendisliği alanında büyük

bir yenilik olarak sıcaklık-duyarlı hücre kültürü ve **hücre tabakası mühendisliği** kavramı ortaya çıkmıştır. Doku mühendisliğinde yeni jenerasyon olarak da nitelendirilen hücre tabakası mühendisliğinin temeli sıcaklık-duyarlı polimer aşılınmış hücre kültür kaplarından geleneksel hücre kültürü teknikleri olan fiziksel, kimyasal veya enzimatik hücre hasadı yapılmaksızın sıcaklık-kontrollü biçimde hücre veya hücre tabakası elde edilmesidir (Okano 2004).

Bu yaklaşımla elde edilen hücreler proteolitik enzimlerle işlem görmedikleri için, gerek protein yapısındaki hücre adhezyon membran molekülleri, gerekse sentezlenen hücre dışı matriks, hasar görmemiş olmalarından ötürü tabaka şeklinde kültür ortamından alınabilmektedirler. Bu amaçla geliştirilen sıcaklık-duyarlı hücre kültür kapları, sıcaklık-duyarlı bir polimer olan poli(*N*-izopropilakrilamid)'in standart polistiren yüzeylere kovalent olarak aşılınmasıyla ortaya çıkartılmıştır (Yamada 1990). Oluşturulan yüzeyler 37°C'de hidrofobik özellik gösterirken, 32 °C altında hidrofilik özellik göstererek yüzey üzerinde yayılmış olan hücrelerin spontan olarak yüzeyden ayrılmasına neden olurlar. PNIPAAm harici başka sıcaklık-duyarlı polimer olsa da, alt kritik çözünme sıcaklığının oda sıcaklığı ve vücut sıcaklığı aralığında gerçekleşmesi, bu PNIPAAm bazlı polimerleri doku mühendisliği uygulamaları açısından çok avantajlı kılmaktadır (Kikuchi 2004).

Hücre tabakası mühendisliği yaklaşımı ile geçtiğimiz on yıl içerisinde pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Klinik koşullarda rekonstrüktif ve plastik cerrahi ve oftalmolojik (Shironayagi, 2004) uygulamaları mevcuttur. Hücre adhezyon molekülleri tamamı ile korunduğundan ötürü, canlı dokuya transplantasyon suture kullanılmadan kolayca yapılabildiği gibi, birden fazla tabakanın kullanımı ile üç boyutlu doku rekonstrüksiyonu da gerçekleştirilebilmektedir. Örnek çalışma olarak hayvan sistemlerinde denenmiş olan, 30 hücre tabakasından oluşan kardiyak greft verilebilir (Shimizu ve ark. 2003).

Üriner sistemin doku mühendisliği ve özellikle mesane rekonstrüksiyonu, geçtiğimiz yıllarda çok sayıda çalışmanın konusu olmuştur. Üriner sistem doku mühendisliğinde geleksel klinik yaklaşım, gastrointestinal mukoza kökenli matrikslerin otolog transplantasyonuna dayalıdır. Ancak üroteliyal doku ile gastrointestinal doku arasında temel fonksiyon farklılıkları bulunmaktadır ve transplantasyonlarda sıklıkla problemlerle karşılaşmaktadır. Son dönemde Atala ve çalışma arkadaşlarının 2006 yılında biyobozunur yapı iskeleleri kullanarak gerçekleştirdikleri biyo-yapay mesane *in vitro* koşullarda geliştirilen ilk yapay organ olarak kayıtlara geçmiştir. Ancak halen klinik denemeleri sürmektedir.

Hücre tabakası mühendisliği, özellikle mesane ve üretra gibi bölgeler için greft oluşturmaları adına ideal bir yaklaşımdır. Zira yapı iskelesi kullanmadan sıcaklık-kontrollü olarak elde edilecek ve kendiliğinden dokuya yapışabilen üroteliyal hücre tabakaları, minimal invazif biçimde hastalara otolog olarak nakledilebilecektir.

Sunulan tez kapsamındaki çalışmanın amacı, sıcaklık-duyarlı yüzeylerde hücre tabakası yaklaşımı ile hücre kültürü ve üroteliyal doku grefti tasarlanmasıdır. Bu amaçla, polistiren hücre kültür kaplarına sıcaklık-duyarlı olduğu bilinen P(NIPAAm-NtBA) kopolimeri, serbest radikal polimerizasyonu ile aşılanmıştır.

Elde edilen sıcaklık-duyarlı yüzeyler, aşılama yoğunluğundan bağımsız olarak hücre yapışmasını sağlamak amacıyla yönelik olarak, hücre adhezyon molekülü olan Kollajen Tip I ile fiziksel olarak kaplanarak modifiye edilmiştir. Modifiye edilen ve edilmeyen sıcaklık-duyarlı yüzeylerin karakterizasyonu AFM ve SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

g/G fare mesane üroteliyal hücreleri ile yürütülen hücre kültürü çalışmaları sonucunda, Kollajen Tip I ile modifiye edilen sıcaklık-duyarlı yüzeylerde hücre üreme davranışının ve yapışmasının, modifiye edilmeyen yüzey ve standart polistiren hücre kültürü kaplarına göre daha üst seviyede olduğu görülmüştür.

Sıcaklık-duyarlı yüzeylerden elde edilen üroteliyal hücre tabakasının terminal farklılaşma düzeyi ve hücre tabakası olarak karakterizasyonu için Claudin 3, Claudin 4 ve üroteliyal doku spesifik Uroplakin I grubu proteinlerin ekspresyonunun tayini amacıyla Western-blot analizi yapılmış, elde edilen hücre tabakasının terminal biçimde farklılaşmış olduğu ve canlı dokulara greft olarak kullanılma potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisi dört ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde, genel olarak doku mühendisliği ve rejeneratif tıp konularına değinilmiştir. İkinci bölümde üroteliyal doku, patolojileri ve üroteliyal doku mühendisliği uygulamaları anlatılmıştır. Üçüncü bölümde, sıcaklık-duyarlı polimerler ve sıcaklık-duyarlı yüzey uygulamaları konusunda ayrıntılı bilgi verilmiş, son olarak dördüncü bölümde ise hücre-tabakası mühendisliği ve klinik uygulamaları hakkında bilgi verilmiştir.

2.1 DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Eğer vücutta bir doku ya da organ onarılamayacak kadar hasar görmüşse veya kaybedilmişse geçerli klinik yaklaşımlar, ya rekonstrüktif ya da transplantasyon cerrahisidir. Rekonstrüksiyon cerrahi, biyomedikal malzemeler ve doku implantasyonları ile ilgilenir. Şimdiye kadar sayısız yaşamı kurtarmış ise de mükemmel olmaktan uzak bir metottur. Transplantasyon ise gittikçe artan miktarda sınırlı organ veya doku donörü yetersizliği problemi ile karşı karşıyadır. Örnek vermek gerekirse her yıl karaciğer yetmezliğinden ölen her 30,000 kişi için 3000 donör mevcuttur. Donör azlığı her yıl daha da artmakta ve gittikçe artan miktarda hasta, organ transplantasyonu için sıraya girip, sıra gelmeden yaşamını yitirmektedir. Transplantasyon başarılı olmuş olsa bile, hastalar kalıcı olarak ömür boyu bağışıklık sistemini baskılayıcı (immunosupresif) ilaç kullanmak durumunda kalmaktadırlar ki , bu ilaçların da çok çeşitli yan etkileri mevcuttur.

Cerrahi müdahale uzun vadede problemlere yol açmaktadır. Örneğin idrar tutamama durumunda idrarın kolona aktarıldığı cerrahi müdahalelerde kolon kanseri sıklıkla görülür. İnsan yapısı biyomedikal cihazlar da çoğu durumda organın fonksiyonlarını tam olarak gösteremezler ve bu durum da hasta sağlığındaki ilerleyen bozulma önlenemez.

Bu problemlerle ilgili en ideal çözüm metodu hastanın kendi kendini iyileştirme potansiyelinden faydalanarak, doku ve organların rejenerasyonunun sağlamaktır. Doku mühendisliği bu stratejinin gerçekleştirilebilmesi için geliştirilmiş tedavi edici multidisipliner bir metottur.

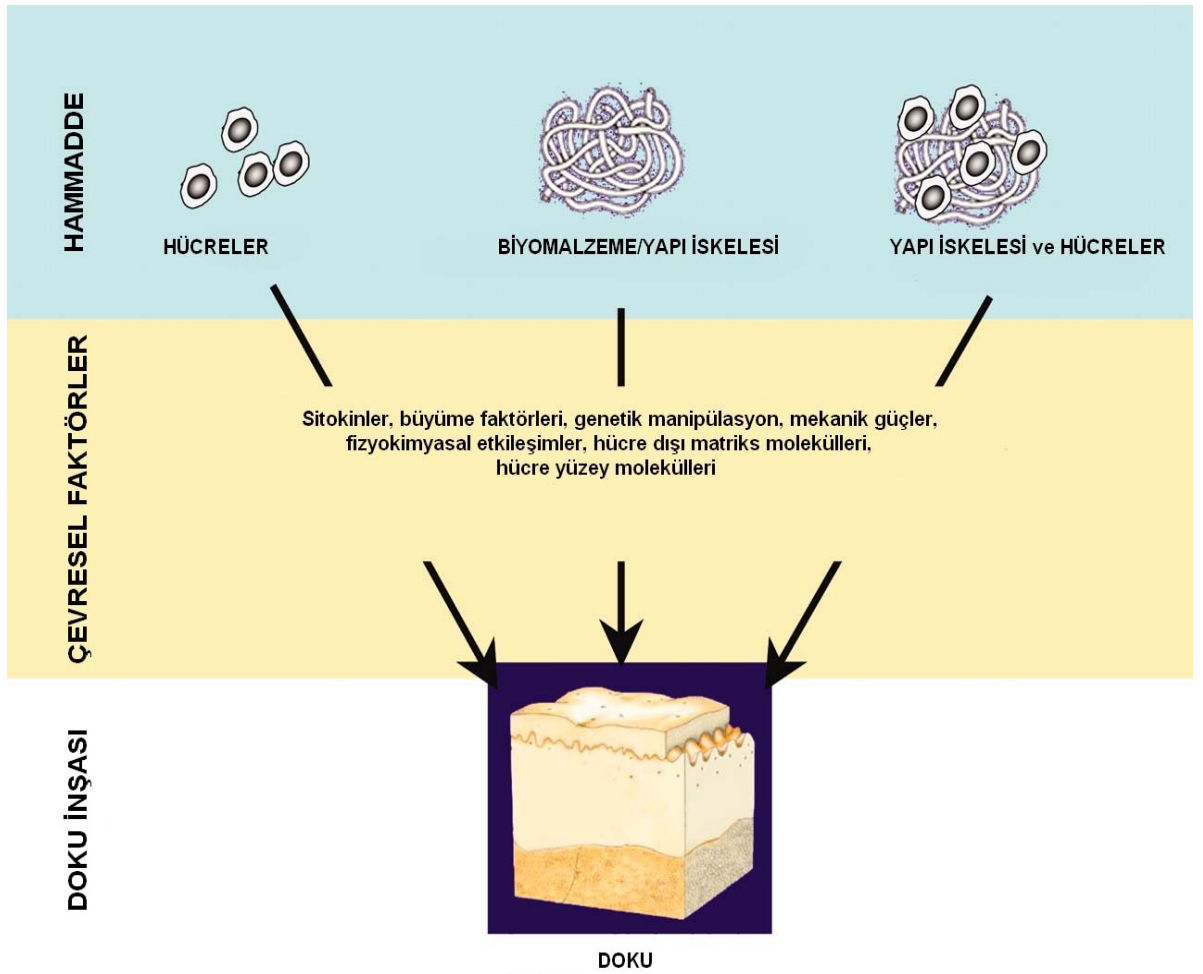
Mühendislik yaklaşımı ile biyolojik bilimlerin ideal kombinasyonu olan bu genç bilim dalının amacı, doğal dokuların rejenere edilmesi ve aynı zamanda hücrelerin kullanımı ile kayıp ya da işlevini yitirmiş organların yerine biyolojik olarak yenilerinin üretilmesidir (Langer, R., Vacanti J. P., 1993).

Doku Mühendisliği için Gerekli Faktörler

Çalışmayan ya da kayıp bir doku nasıl yenilenebilir? Bu sorunun cevabı için doku rejenerasyonunda etkin olarak parametrelerin incelenmesi gereklidir.

Doku rejenerasyonu için gerekli faktörler şunlardır ;

- Hücreler
- Doku yapı iskeleleri (scaffold)
- Biyosinyal molekülleri (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Doku mühendisliği ve doku inşası

Açıkça görülmektedir ki doku rejenerasyonu için dokuyu oluşturacak hücrelerin sayısının artırılması kadar hücreleri destekleyecek yapının da (ekstraselüler matriks ECM) rekonstrüksiyonu önemlidir. Buna ek olarak doku rejenerasyonu için büyüme faktörleri de gereklidir. Doku rejenerasyonunun mekanizması, hem genetik hem de hücresel boyutta incelenmiş ve gerek hidra’da gerek insanda olsun, her organizmada temel olarak aynı olduğu görülmüştür. Her durumda “kök hücreler” doku rejenerasyonunda anahtar göreve sahiptirler (Nerem, R. M., Sambanis, A. 1995).

Şu anda fonksiyonel memeli dokusunda bir hücrenin kök hücresi olup olmadığını anlamak için deneysel uygulanabilirliği olan bir metot bulunmamaktadır. Ayrıca bu hücrelerin diğerlerinden ayrılması için morfolojik bir kriter de mevcut değildir.

Varolan bilgilere göre “Kök Hücreler” tanımlanacak olursa:

- Farklılaşmamış hücrelerdir.
- Çoğalma kapasitesine sahiptirler.
- Hücre popülasyonunun kendi başına sabit tutacak kapasiteye sahiptirler.
- Farklılaşmış ve fonksiyon gösteren hücre nesilleri oluşturabilirler.
- Yaralanma sonrası doku rejenerasyonu sağlarlar.
- Esnek (pluripotent, unipotent) hücrelerdir.

Günümüzde doku rejenerasyonu için kullanılan hücreler genellikle kök hücreler değildir. Çünkü kök hücreler tam anlamıyla tanımlanmamışlardır. Bunların yerine blastik hücreler kullanılmaktadır ki bunlar olgun hücrelerle kök hücreler arasındaki aşamada olan hücrelerdir. Eğer hücre hastanın kendisinden alınabiliyorsa idealdir ancak temel bireylerden hücre alımı kolay değildir. Bu durumda heterojen hücreler kullanılır, fakat immünoizolasyon için gerekli önlemler alınmalıdır.

İyi bilinmektedir ki ECM, hücreler için fiziksel destek sağlanmasının yanı sıra, hücre gelişimi, farklılaşması, çoğalması ve morfogenezi açısından önemli role sahiptir (Adams, J. C., Watt F. M. 1993). Örneğin geniş çaplı bir doku hasarının bölgeye hücre yerleştirilmesi ile düzeltilmesi mümkün değildir. Kullanılan metot, hasarlı bölgeye doku rejenerasyonu için yapay bir ECM oluşturacak iskenin hücrelerle beraber yerleştirilmesidir. Böylelikle hem hasarlı bölgede kalan hücreler, hem de

eklenen hücreler yeni ECM oluşturabilecek kapasiteye ulaştıkları zaman yapay iskelede ihtiyaç duyulmaz. Bu iskele fiziksel bir engel oluşturabilir ve rejenerasyonu engelleyebilir. Bu nedenle biyobozunur malzeme kullanılması uygundur (Çizelge 2.1.).

Materyal	Örnek
Doğal Polimer	Fibrin, Kollajen, Jelatin, alijinat
Sentetik Polimer	PGA, PLA, PLLA, PDLLA
İnorganik materyal	Trikalsiyum fosfat, Kalsiyum karbonat, Tortusuz hidroksiapatit

*PGA [poli(glikolik asit)], PLA [poli(laktik asit)] ve kopolimerleri, PDLLA [poli(DL-laktik asit)], PLLA [poli(L-laktik asit)]

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğinde kullanılan bazı biyomateryaller

Doku mühendisliğinin iki temel hedefi vardır: Doku rejenerasyonu ve organ değişimi (biyo-yapay organlar). Dokular in-vivo ortamda rejenere edilebildiği gibi, invitro koşullarda da yeniden yapılabilir.

In vitro Doku Mühendisliği

Eğer büyük ölçekli in-vitro doku rekonstrüksiyonu laboratuvar ve fabrikalarda gerçekleştirilebiliyorsa, imal edilen dokuların hastalara talep üzerine üretilmesi daha ekonomik olacaktır.

In vitro doku mühendisliği doku üretimi için tüm kaynakların önceden bir araya getirilmesi ve üreme ortamının sağlanması gereklidir. Bu durum in-vivo doku mühendisliğine tezat oluşturur; çünkü in-vivo'da doku rejenerasyonu için gerekli materyal canlı konakçıdan otomatik olarak sağlanır. Bu nedenle in-vitro doku rekonstrüksiyonuna az sayıda örnek verilebilir. Bunlar,

- Deri (dermis, epidermis)
- Arter
- Kıkırdak

İn-vitro yaklaşımda en büyük problem hücrelerin kaynağı ve klinik kabul edilebilirlik düzeyleridir. İnsan dermal ve epidermal tabaklarından oluşan yapay deri in-vitro'da hazırlanmıştır. Bu deri hem deri rejenerasyonu açısından hem de deri analoğu olarak ilaç testlerinde faydalanabilme açısından büyük yararlar göstermiştir. Bu tip

doku analoglarının üretimi, doku mühendisliğinin en önemli uygulama alanlarından birisidir.

İn-vitro doku mühendisliğinin bir diğer uygulama alanı ise allogenik ya da neogenik hücrelerin kullanımı ile organ fonksiyonlarının sağlanmasıdır. Bu tip organlara biyoyapay organlar denir. Çünkü hem heterojenik hücreleri hem de insan yapımı membranlar ve gözenekli yapılardan oluşan immüno-izolasyon malzemelerini içerirler. Bu yapılar hücreleri konakçının antikorlarından korur ve fonksiyonlarını düzgün yerine getirmelerini sağlar Karaciğer ve pankreas biyoyapay olarak üretilmeleri açısından araştırmacıların en çok ilgisini çeken iki organdır.

In-vivo Doku Mühendisliği

Günümüzdeki doku mühendisliğinin çoğu araştırması in-vivo olarak biyobozunur yapıdaki doku iskeleleri ile veya onlar da olmadan gerçekleştirilmektedir. Eğer vücutta sağlıklı bir ECM mevcut ise yapay doku iskelesine ihtiyaç yoktur. Hedef dokular ve hücreler arasında kornea, retina, miyokardium ve kan hücreleri yer alır. Örneğin insan kanından hemapoyetik kök hücreleri izole edilirse ve intravenöz olarak lösemili hastalara enjekte edilecek olursa kemik iliğinde farklılaşarak fonksiyonel kan hücrelerine dönüştükleri görülür.

Göz ile ilişkili kök hücreleri de kornea ve retina hasarlarında rejenerasyon için kullanılmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi büyük bir hasarın rejenerasyonu için doku iskelesi kullanılması gereklidir. Doku iskelesi implantasyon öncesi hücre yükleme ile veya hücre yükleme olmadan kullanılır. Hücre ekilmeden yapılan iskele uygulamasına örnek olarak dermal dokunun kollajenden oluşan bir sünger tabaka vasıtasıyla rejenerasyonu verilebilir. Kollajen sünger yapı iskelesi, çevre dokudaki sağlıklı fibroblastların çoğalmasına yardımcı olur ve zamanla biyobozunma sonucunda vücutta enzimatik sindirimle absorbe olur. Buna benzer biçimde gözenekli yapıda doku iskelesi kullanılarak hücre ekilmeden yapılan çalışmalar; özofagus rejenerasyonu ve dura mater rejenerasyonudur. Fibroblastlar hücre çoğalması sırasında yüksek düzeyde aktif oldukları için fibroblast kökenli doku rejenerasyonu uygulamaları hücre ekimi ya da büyüme faktörü eklenmesini gerektirmez.

Fakat çoğu dokular doku iskelelerine hücre yerleştirilmediği takdirde rejene olamazlar. Epidermis ve kıkırdak rejenerasyonu doku iskelerinin keratinosit ve

kondrositlerle donatılmış olmasını gerektirir. Kemik iliği hücreleri de bu iş için kullanılabilir. Kemik rejenerasyonu, kemik iliği hücreleri ile doku iskeleleri birlikte kullanıldığında gerçekleşir. Çünkü kemik iliği hücreleri arasında mezenşimal kök hücreleri de bulunur ve bunlar osteosit hücre nesline farklılaşabilirler.

Doku iskelerine birden fazla türde hücre ekilmesi suretiyle çeşitli alt dokulardan oluşan dokuların da rejenerasyonu da mümkündür. Örneğin, parmak oluşumu için doku iskelesine kemik için periosteum, kırıldak için kondrosit, tendonlar için tenosit yüklenir. Bazı durumlarda in-vivo doku mühendisliği için büyüme faktörü gerektiği de görülür. Büyüme faktörü çalışılan dokuya göre ve dokunun üretildiği bölgeye göre değişiklik gösterir. Doku iskelesine hücre ekiminin yanısıra büyüme faktörü de eklenmesi doku rejenerasyonunu büyük ölçüde hızlandırır.

Eğer vücutta bir hasar oluştuysa, (örn. yaralanma) oluşan bozukluk vücutta bulunan ve hızlı bir biçimde çoğalabilen fibroblastların oluşturduğu fibröz dokuya doldurulur. Bu fibröz bağ dokusu oluştuysa herhangi bir doku rejenerasyonu veya onarımı artık beklenemez (scar tissue). Bu şekilde doku büyümesini engellemek için “bariyer membranları” adı verilen biyomlazzemeler kullanılır. Membranların hedefi istenmeyen bağ doku oluşumunu önlemek ve doku rejenerasyonu için yer yaratmaktır. Buna örnek olarak kırılmış periferik sinir fiberleri için kanal oluşturulması ve alveolar kemik verilebilir. Membran biyo-absorblanabilen malzemedan yapılmadılır ve doku rejenerasyonundan sonra tamamen yok olmalıdır.

Rejeneratif Tıp

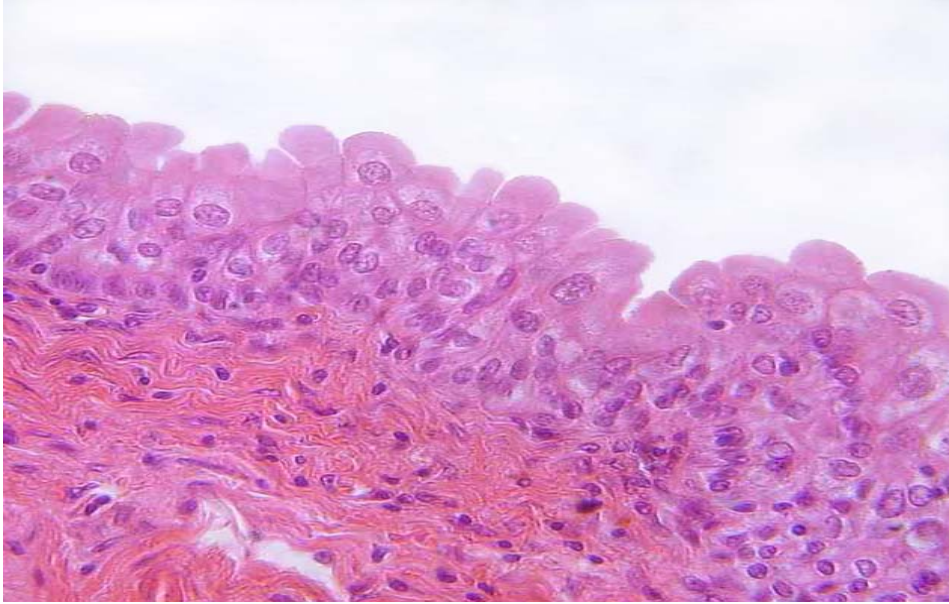
Rejeneratif tıp bilimi hasarlı dokuların fonksiyonlarını geri kazanacakları biçimde onarılmasına dayalıdır. Konvansiyonel hücre tedavileri ile bazı umut verici sonuçlara ulaşılmış olmasına karşın, doğru biçimde işlev gösteren dokuların rejenerasyonu için halen pek çok sorun ve engelle karşılaşılmaktadır. Doku rejenerasyonu için en sık kullanılan yaklaşım hücre süspansiyonu çözeltilerinin direkt olarak enjeksiyonudur. Fetal kökenli nöral hücrelerden Parkinson hastalığı ve Huntington hastalığı için klinik başarı elde edilebilmiştir (Freed ve ark. 1994). Benzer biçimde, Merten ve ark. allogenic hepatist transplantasyonu ile organ transplantasyonuna alternatif olacak biçimde karaciğerde klinik başarı sağlamışlardır. Yakın zamanda Burger hastalığının tedavisi için otolog kemik iliği hücresi transplantasyonu ve yine otolog myoblastların enjeksiyonu ile kalp

yetmezliği tedavisi ile ilgili pozitif klinik veriler elde edilmiştir (Shinve ark., 2003). Ancak örnekleri verilen bu başarılı çalışmaların yanısıra süspanse hücre enjeksiyonları ile ilgili ciddi komplikasyonlarda halen varlığını sürdürmektedir. Öncelikle, enjekte edilen hücrelerin büyüklükleri ve şekilleri homojen değildir. Aynı zamanda enjekte edildikleri dokudaki yerlerinin tespiti de hemen hemen imkansızdır. Bunların yanısıra, enjekte edilen süspanse hücrelerinin göçü ve ana dokuya tutunmalarındaki yetersizlik öne çıkan problemler olarak göze çarpmaktadır (Atala, 2000). Aynı zamanda sıklıkla enjeksiyonu yapılan hücreler birbirlerine yapışıp kümelenerek konakçı dokuya entegre olması güç yapılar oluşturabilmektedirler. Örnek olarak karaciğer portal damarından enjekte edilen hepatositler enjeksiyondan hemen sonra sinüzoidlerde kümelenerek hapsolmaktadırlar. Bu durumda meydana geldiğinde ise hücre enjeksiyonu sonrası karaciğer embolileri ortaya çıkabilmektedir (Yang ve ark. 2005). Benzer biçimde süspanse hücre transplantasyonu sonrası kapiller emboli beyin, akciğer ve böbreklerle ilgili yapılan çalışmalarda da görülmüştür (de Filippo ve ark, 2001).

Rejeneratif tıp alanında biyobozunur yapı iskeleleri ile gerçekteştirilen doku mühendisliği uygulamaları da yapılmıştır. Erken klinik fazda bazı başarılar elde edilmiş olsa da, biyobozunur yapı iskelesine dayalı doku mühendisliği ile üretilmiş dokularla ilgili klinik çalışmalar son derece kısıtlıdır. Buna ek olarak biyobozunur yapı iskelelerinin miyokardium gibi hücre yoğunluğu yüksek dokularda uygulanabilirliğinin düşük olduğu da söylenebilir (da Silva, 2007). Genellikle yapı iskelesinde merkezde yer alan hücreler kısıtlı difüzyondan ötürü besin maddesi ve oksijenin yetersiz iletiminden ötürü ölüirken, periferdeki hücreler canlı kalmaktadır. Ek olarak, özellikle sentetik biyobozunur materyallerin kullanıldığı durumlarda transplantasyon veya implantasyon bölgesinde enflamatuvar reaksiyonlar ortaya çıkabilmekte, kimi zaman ise biyomalzemenin bozunma sürecinde asidik özellikte polimerlerin indirgenmesiyle (poli laktik asit veya poli glikolik asit gibi) ortamda pH değişimleri yaşanabilmektedir. Aynı zamanda biyobozunma sonrasında ortamın büyüyen ve çoğalan hücreler tarafından doldurulması beklenirken çoğu durumda yapı iskelesi indirgenmesi sonrasında ortam fibröz doku yada hücre dışı matriks tarafından işgal edilmektedir.

2.2 ÜROTEL DOKU

Ürotel doku, üretra ve mesane'nin veziküler lümenini kaplayan stratifiye bir epitel dokusudur. Klasik histolojik morfolojisine bakıldığında, bazal tabaka, orta tabaka ve yüzeysel tabaka olarak üç farklı hücre tabakasından oluşan bir yapı biçimindedir (Şekil 2.2). Bazal tabakadaki hücreler ürotelin iç tabakasını oluştururlar, küboid morfoloji gösterirler ve lamina propria ile direkt bağlantı halindedirler. Orta tabakada ise lobut biçiminde, geniş olan tarafı veziküler lümene doğru bakan hücreler görülür. Yüzeysel tabaka ise son aşamada farklılaşmış olan “şemsiye hücreleri” olarak da adlandırılan , morfolojik olarak bukkal epitel hücreleri andıran hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücreler idrar ile direkt temas halindedirler ve gelişmiş hücre-hücre arası sıkı bağlantı noktaları ve membranlarının apikal kutuplarında yer alan plak oluşumları ile karakterize edilmektedirler (Romih ve ark., 2005). Bu hücrelerin yapısal farklılaşması en üst düzeyde spesifik üroteliyal hücre farklılaşmasını temsil eder.



Şekil 2.2. Mesane içi üroteliyal dokunun kesiti (HE boyama)

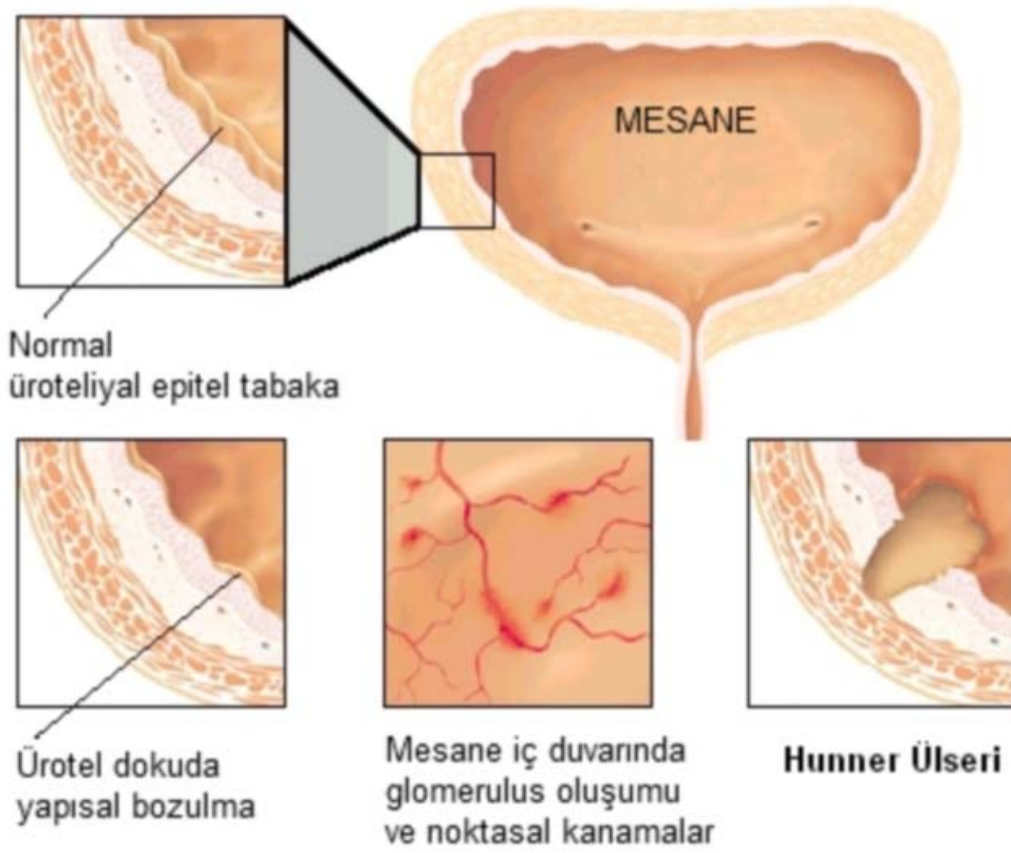
Mesane üroteliyal dokusu uzun zaman boyunca, idrar ve kan arasında fiziksel bariyer oluşturmaktan başka bir fonksiyonu bulunmayan bir doku olarak görülmüştür. Ürotelyum, daha altta kalan mesane dokularını ve dolayısıyla tüm

dokuları idrarda bulunan üre, allerjik ve toksik maddeler ve muhtemel enfeksiyöz ajanlara karşı korur. Ancak bu bilinen işlevinin yanısıra son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda sadece pasif bir bariyer olarak düşünölen üroteliyal dokunun aslında metabolik sekresyon, miksiyon (idrara çıkma) refleksi ve enflamasyonu regölasyonu (Apodaca, 2004) gibi son derece özelleşmiş fonksiyonları olduğu belirlenmiştir. Fizyolojik rolünün yanısıra, deneysel deliller göstermektedir ki üroteliyal doku hücre detrusor (mesane kas dokusu) hiperaktivasyonu, mesane enflamasyonu ve kanser gibi pek çok ürolojik patolojide de önemli rol üstlenmektedir (Birder, 2004). Yine son dönemde yapılan çalışmalarda ürotel dokunun kimyasal ve mekanik olarak normalde algısal nöronlar ve çevre mesane dokuları reseptörleri tarafından tanımlanan sinyallere tepki gösterdiği ortaya çıkartılmıştır. Üroteliyal epitel hücrelerinin miksiyon refleksi ile detrusor kaslarındaki değişimle paralel olarak morfolojik olarak değişime uğradıkları ve boyutlarının büyüdüğu rapor edilmiştir (Fry ve ark, 2004). Aynı zamanda çeşitli hücre membran reseptörlerinin ekspresyonunun da miksiyon refleksi veya mesane patolojileri varlığında arttığı gözlemlenmiştir. Üroteliyal hücrelerden ATP salımının artmasında miksiyon refleksi ve üroteliyal patolojilerde artış göstermektedir. Wang ve ark. 'na göre mesane gerilmesi sonucu artan hidrostatik basınç ile üroteliyal hücre membranlarında P2X reseptörlerinin ifadesini artırmakta ve buna bağılı olarak hücre içi ATP miktarlarıda artış göstermektedir.

2.2.1 Üroteliyal Doku Patolojileri

Ürotelyum ile ilgili en yaygın olan patoloji "interstitiyal sistit'tir (IC). Genellikle üriner kanal enfeksiyonlarına bağılı olarak mesane içi üroteliyal dokunun düşük ya da orta şiddette enflamasyonuna bağılı olarak hastada idrar kaçırma, idrara çıkarken ağrı-yanma hissi gibi semptomlarla kendini gösterir. Tıbbi terminolojiye PBS (Painful Bladder Syndrome) olarak adlandırılan hastalık çoğunlukla 50 yaşın altındaki bayanlarda görölmektedir (Burcher, 2005). IC oluşumu genellikle enfeksiyonlara bağlansa da allerjik reaksiyonlar, otoimmün tepkiler veya idrardaki irritant bir madde sonucu da IC oluşumu görölebilir. IC durumunda mesane içi üroteliyal epitel dokusunda aşınma, kimi zaman fibrozis görölür. IC sonucu ülserasyonun uzun süreli devamı halinde mesane kanseri oluşumu görölebilir (Şekil 2.3). Hastalığın tedavisi genellikle mesane içine enjekte edilen ilaçlar ve oral ilaçlardan oluşsa da bu seçeneklerin işe yaramadığı durumlarda tek tedavi alternatifi olarak

sistektomi, yani mesanenin tamamı yada bir kısmının cerrahi olarak alınmasıdır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Interstityal sistit ve ülser oluşumu

Son dönemde özellikle hayvan sistemlerinde doku mühendisliği yaklaşımları ile hazırlanan **üroteliyal greft** uygulamaları ile ileri derecede enflamasyona bağlı intersitityal sistit başarı ile tedavi edilmiştir (Atala ve Yoo 2008).

2.2.2 Üriner Sistem Doku Mühendisliği Uygulamaları

Üriner sistem fetal gelişim süresinden itibaren çok çeşitli hasar ve yaralanmalara açık bir sistemdir. Konjenital anomalilerin yanı sıra travma, kanser, enfeksiyon ve hiperallerjenler yüzünden üriner sistemde doku veya organ kaybına kadar varabilecek hasarlar söz konusu olabilmekte, dolayısıyla kayıp doku veya organın rejenerasyonu ihtiyacı çeşitli koşullarda ortaya çıkabilmektedir. Geleneksel olarak mesane ve üreter rekonstrüksiyonu otolog biçimde gastrointestinal dokularla, üretra rekonstrüksiyonu deri veya mesaneden alınan greftler yardımıyla yapılabilmektedir. Ancak, gerek donör doku azlığı gerekse doku hasat prosedürü sırasında kaybedilen hücre ve doku miktarı yüzünden bu tür otolog

transplantasyonlarda başarı miktarı görece az olduğu gibi, nakledilen dokular genellikle kaybedilen dokuların fonksiyonlarını tamamen yerine getirememektedir.

Bu durum göz önüne alındığında kayıp veya işlevsiz dokuların fonksiyonel olarak aynı doku veya hücrelerle rejenerasyonu hastalar için en iyi sonucu vereceği ortadadır. Bu amaca ulaşmak için ise doku mühendisliği uygulamaları büyük potansiyel taşımaktadır. Hücre tabanlı doku mühendisliği tekniklerini ürolojik doku rejenerasyonuna uygulamakta karşılaşılan en büyük güçlüklerden bir tanesi, üroteliyal hücrenin kültürünün büyük miktarlarda yapılmasındaki güçlükler olmuş olsa da özellikle geçtiğimiz on yıl içerisinde geliştirilen hücre kültürü protokolleri bu problemin aşılmasını sağlamıştır (Cilento ve ark. 1994). Bu çalışmalarda insan ve hayvanlardan elde edilen otolog üroteliyal epitel hücreleri hücre kültürü ortamında çoğaltılmış ve donörlere hücre süspansiyonu veya greftleri olarak transplante edilmiştir (Scriven, 1997).

2.2.2.1 Üriner Sistem Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomateryaller

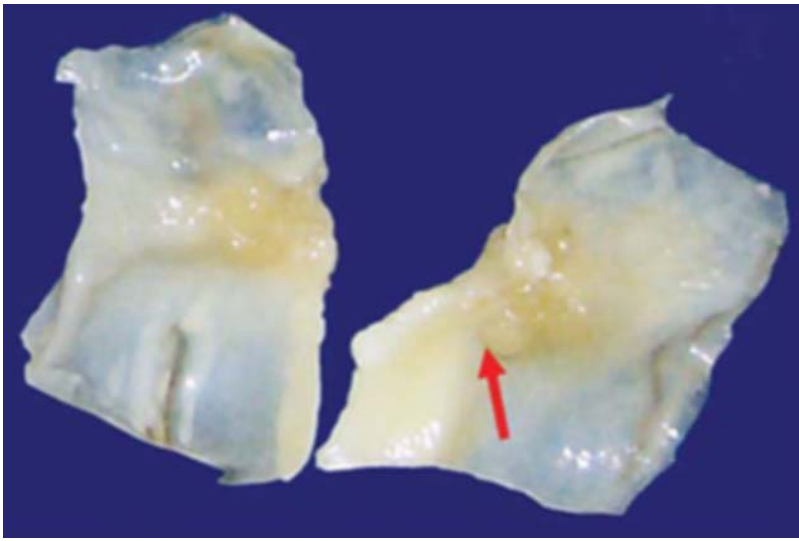
Biyomateryaller gerek hücre adhezyon substratı olarak, gerekse yapı iskelesi olarak kullanımlarıyla çeşitli doku ve organlara hücre etkin biçimde hücre aktarılmasını sağlamaktadır. Kullanılacak olan biyomateryalin konfigürasyonu inşa edilecek olan dokununda yapısını belirleyecek biçimde tasarlanabilmektedir. Aynı zamanda biyomateryaller in vivo koşullarda mekanik direnç sağladıkları için tutunan hücrelerin dokuya farklılaşması sürecinde bir platform görevi görmektedir. Kimi durumlarda biyomateryallere büyüme faktörleri, hücre adhezyon promotorları gibi hücre fonksiyonları regüle eden biyoaktif moleküllerde immobilize edilebilir (Bergsma ve ark. 1995). Üriner sistem doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyomalzeme seçimi son derece önemlidir. Kullanılacak olan biyomalzeme hücrelerce rejenere edilecek olan dokunun yapısının kontrol edilebileceği biçimde tasarlanmalı, biyoyumlu olmalı, hücre-hücre arası bağlantıların kurulmasına engel olmayacak bir yapıda olmalı, fiziksel ve mekanik olarak dirençli olmalı, bu direnci doku rejenerasyonu kendi kendini destekler biçime gelinceye kadar sürdürebilir olmalıdır. Bunun yanısıra biyoindirgenebilir yapıda olması ve indirgendiği zaman ortaya çıkan rezidual maddelerin enflamasyona ve toksisiteye yol açmaması gereklidir (Atala, 1998). Üriner sistem doku mühendisliği için genellikle üç sınıf biyomateryalde faydalanılmaktadır:

- Kollajen ve aljinat gibi doğal malzemeler

- Aselüler doku matriksleri (ince barsak sub-mukozası)
- Sentetik polimerler (PLA, PGA ve PLGA gibi)

Bahsedilen her üç tür biyomalzeme de primer insan üroteliyal hücreleri ve mesane kas dokusu hücreleri ile test edilmişlerdir (Pariante ve ark, 2001).

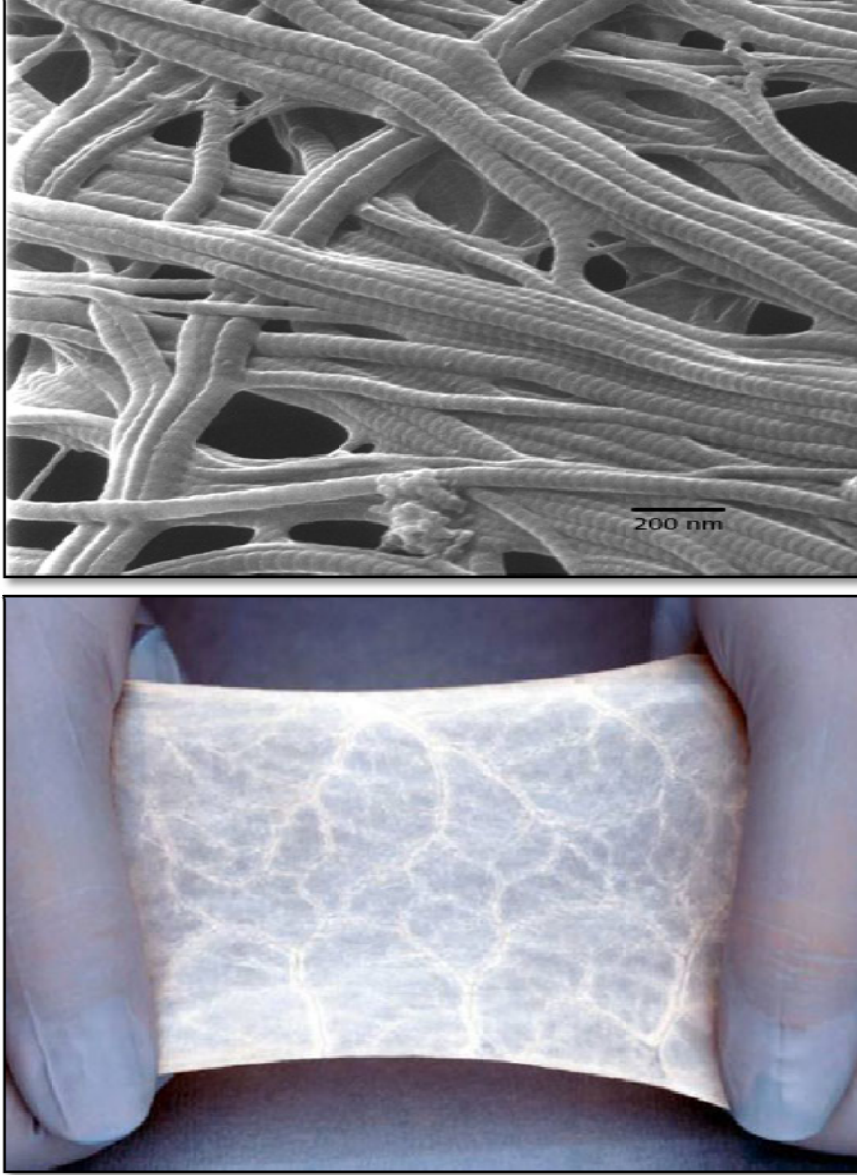
Doğal biyomateryaller ve aselüler matriksler genel olarak biyolojik tanıma ve hücre adhezyonu açısından potansiyel avantaja sahiptirler. Sentetik polimerler ise mekanik dayanım, biyobozunum ve mikroyapıları istenildiği gibi değiştirilerek seri biçimde üretilebilme avantajına sahiptirler (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Üriner sistem doku mühendisliğinde kullanılan sentetik biyomateryallere örnek:
Mesane rekonstrüksiyonu için Latex membran

Kollajen, memeliler ve insan vücudunda en sık rastlanan ve miktar olarak en yoğun proteindir. Kollajen gerek insan gerekse hayvan dokularından enzimatik olarak ve tuz/asit ekstraksiyonu ile kolayca saflaştırılabilir (Li, 1995). Kollajen yapıdaki implantlar lizozomal enzimlerce kolayca degrade olabildiklerinden in vivo absorpsiyonun derecesi kollajen zincir yoğunluğu ve moleküller-arası çapraz bağlanma oranı ile ayarlanabilmektedir. Yoğunluğun düşük olması daha büyük porlar oluşturacağından ve daha çok hücre infiltrasyonuna izin vereceğinden implant daha hızlı bir biçimde bozunacaktır. Aynı zamanda kollajen içeriğinde spesifik hücre adhezyon molekülleri olan RGD dizilerini de barındırmakta olduğundan, kollajen üzerine ekilen hücrelerin aktif adhezyonunu ve işlevsel

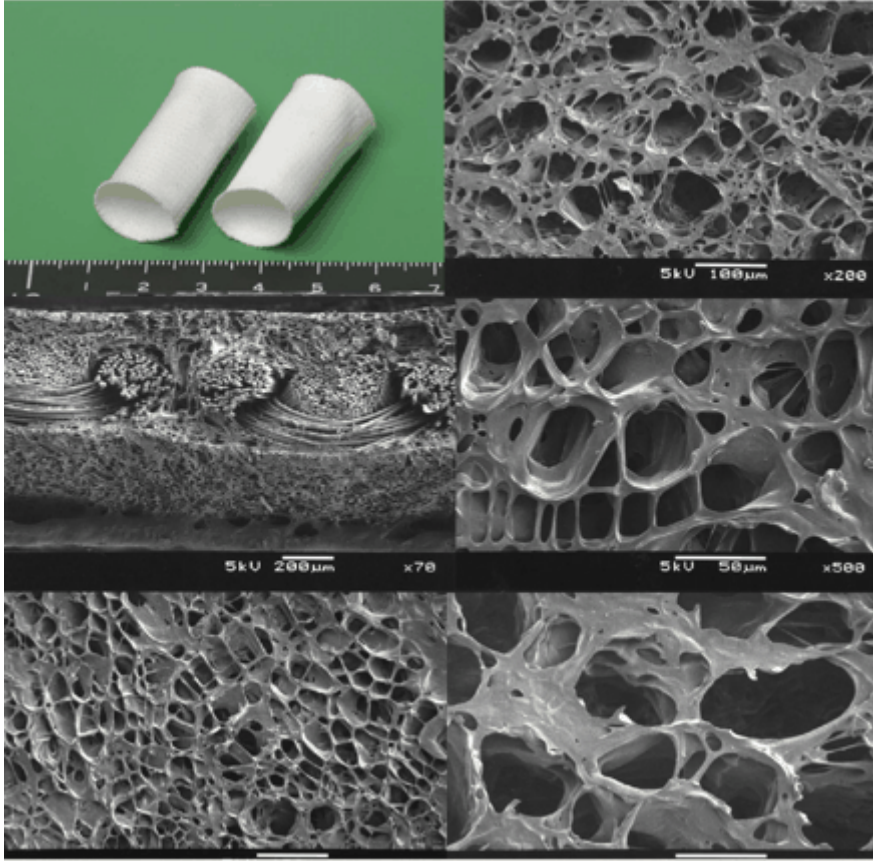
morfolojilerini kazanmalarında olumlu rol oynamaktadır (Silver ve ark. 1992). Aselüler matriksler de hücre barındırmayan kollajence zengin yapılardır. Mekanik ve kimyasal olarak manipölasyon ile canlı dokuların hücreden arındırılması yoluyla oluşturulurlar. En sık kullanılan aselüler matriks ince barsak submukozasıdır (Chen ve ark. 1999).(Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Doğal biyomateryaller a) Kollajen fibrilleri b)Kollajen bazlı aselüler ince barsak sub mukozal grefti.

A-hidroksi asit polyesterleri olan PLA, PGA ve PLGA doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan biyomalzemelerdendir. Sütürlerin de dahil olduğu pek çok insan uygulaması için FDA onayı almışlardır. Yapılarındaki

gevşek ester halkaları sayesinde enzimatik olmayan hidroliz ile kolayca indirgenebilirler. Biyobozunmaları sonucunda ortaya çıkan rezidual maddeler toksik özellik taşımamakta ve vücuttan karbon dioksit ve su olarak atılmaktadır. Biyobozunma süreleri kristalinite değişimi, monomerin başlangıç moleküler ağırlığı ve kopolimer oranlarının düzenlenmesi ile istenildiği gibi ayarlanabilir. Bunların yanısıra bir diğer avantajları ise termoplastik yapıda olmalarından ötürü istenen mikroyapı ve formda şekillendirilerek üç boyutlu hücre yapı iskelesi olarak kullanılabilmesidir (Freed ve ark, 1994). (Şekil 2.6).

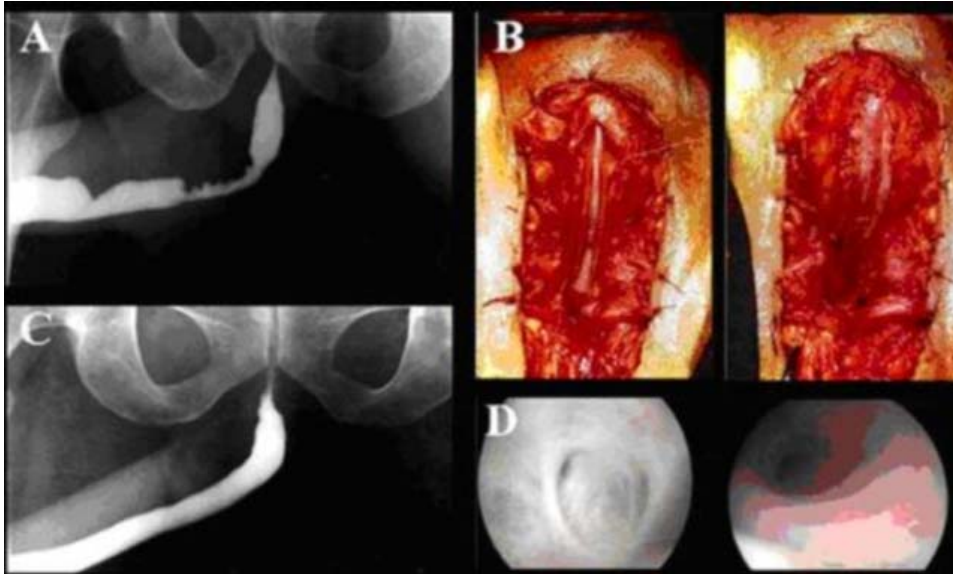


Şekil 2.6. Sentetik polimer bazlı hücre iskeleleri ve hazırlanan tübüler iskele (PLA/PGA ve p-kaprolakton)

2.2.2.2 Ürolojik Yapıların Doku Mühendisliği

Üretra

Hücre içermeyen pek çok farklı biyomalzeme üretral dokunun rejenerasyonu için denenmiştir. Kollajen matriksler ve aselüler mesane submukozası kökenli yapı iskelelerine otolog hücre ekimi yapılarak klinik olarak üretral rekonstrüksiyonu gerçekleştirilmiştir (Sievert ve ark. 2000). Kollajen kökenli matrikslerle ilgili hayvan sistemlerinde gerçekleştirilen deneylerde kollajen matriks yerleştirilen üretranın üroteliyal epitel ile tamamen epitelize olduğu tespit edilmiştir. Arkasından gelen klinik çalışmalarda ise idrar yolu tıkanması olan hasta grubuna kadavra kökenli, 2 ila 16 cm boyut aralığında aselüler matriks implantasyonu yapılmış (Şekil 2.7) ve 4 yıllık vaka takibi sonucunda %83 başarı elde edilmiş, hastaların genelinde idrar akış oranının normalize olduğu tespit edilmiştir (Elkassaby ve ark, 2003). Ancak bu yaklaşım, total tübüler üretra onarımı için uygun değildir. Tübüler yapının total olarak onarımı için elde edilen hücre iskelelerine otolog hücre ekimi gerçekleştirilmiştir (DeFilippo ve ark 2002). Hayvan sistemlerinde gerçekleştirilen çalışmada hücre içeren ve hücre içermeyen yapı iskelelerinin implantasyonu sonrasında otolog hücre içeren implantların doku biçiminde farklılaştığı, hücresiz implantlarda ise fibroze bağlı tıkanmalar ve çöküntüler tespit edilmiştir.

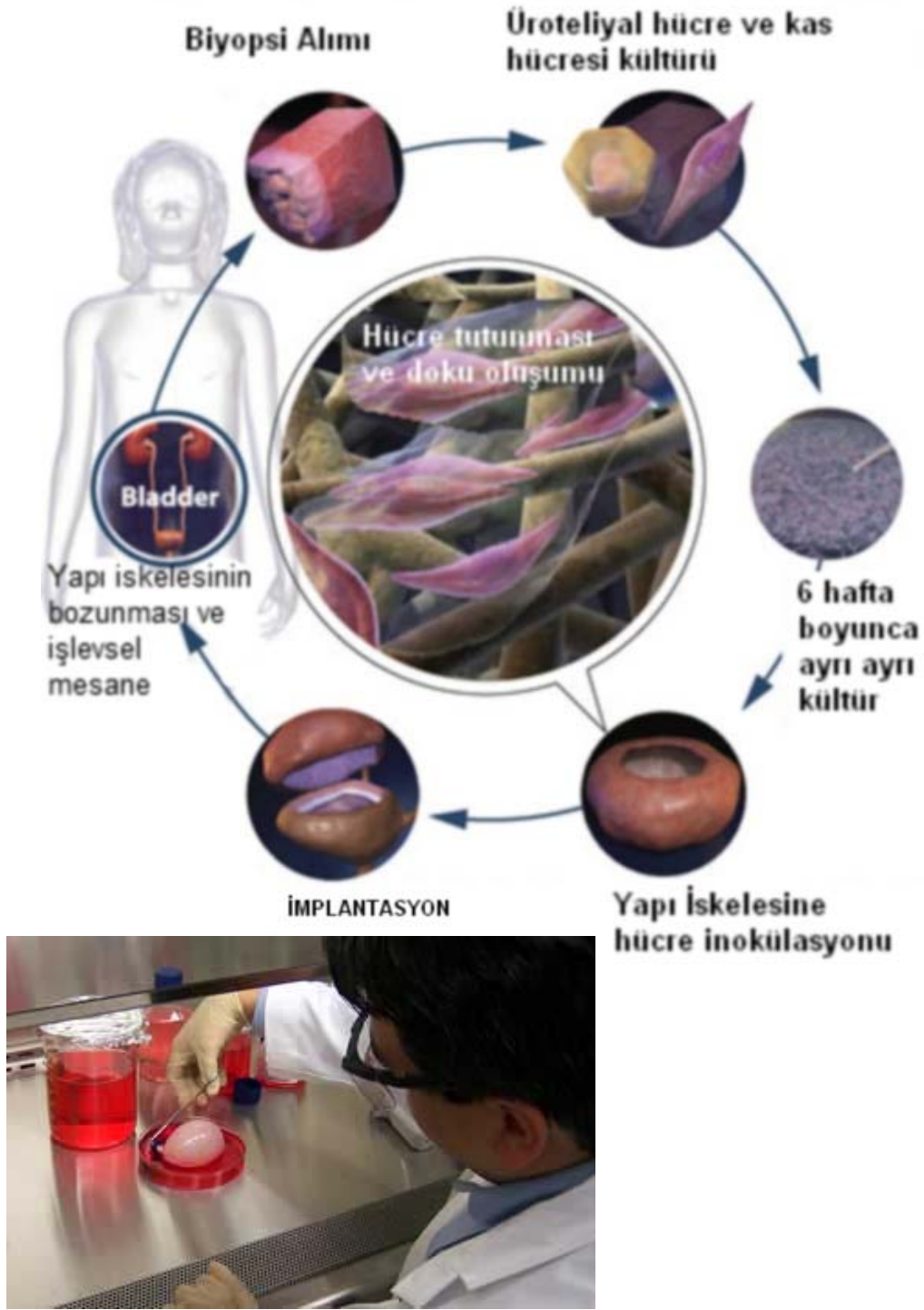


Şekil 2.7. Kadavra kökenli aselüler matriks ile gerçekleştirilen üretral rekonstrüksiyon(b). İmplantasyon sonrası yokolan daralma (a) ve (b), sistoskopi ile açık kanalın görüntüsü (d).

Mesane

Halen mesane onarımı için en sık kullanılan yöntem gastrointestinal segmentlerin mesane grefti olarak kullanımıdır. Ancak, gastrointestinal dokular spesifik çözünmüş maddelerin emilimi için spesifikleşmiş dokular iken, özellikle mesane üroteliyal dokusu, çözünmüş maddelerin atılımı için farklılaşmış bir yapıdadır. Bu sebepten ötürü mesane onarımı için alternatif biyomalzemeler kullanılması gündeme gelmiştir. İnce barsak harici aselüler matrikslerin kullanıldığı çalışmalarda (Sutherland ve ark, 1996), (Probst ve ark 1997) üroteliyal tabakada rejenerasyonun olduğu, ancak kas tabakasının tam olarak gelişemediği gözlemlenmiştir. Kollajen yapı-iskelelerinin kullanıldığı bir çalışmada ise (Lai ve ark. 2002) greftleme sonrası yoğun fibröz doku oluşumu ve greft kasılması gözlemlenmiştir. Sentetik materyaller ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise yoğun biçimde mesane taşı oluşumu, hidrostatik basınca karşı dayanıksızlık ve fibroblast birikimi gibi sorunlarla karşılaşmıştır.

Kollajen bazlı hücre iskeleleri ile Wake Üniveristesinde Anthony Atala ve araştırma grubu tarafından 2006'da gerçekleştirilen çalışmada, mesane işlev bozukluğu olan 7 hastadan otolog olarak alınan mesane dokusundan üroteliyal ve kas dokusu hücreleri izole edilerek ayrı ayrı kültürleri yapılmıştır (Şekil 2.8). Kollajen bazlı yapı iskelesinin iç yüzeyine üroteliyal hücre ekimi yapılmış ve tabaka oluşturması beklenmiş, daha sonra dış yüzeyine otolog mesane kas hücreleri aktararak olgunlaştırıldıktan sonra elde edilen mesane dokusunun transplantasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, dünyada insanlara uygulanan ilk *in vitro* organ rejenerasyonu çalışması olarak tarihe geçmiştir. Şu anda ticari uygulama olarak Tangion *Neo-Bladder Augment*™ markasıyla faz II klinik denemeleri tamamlanmış durumdadır.

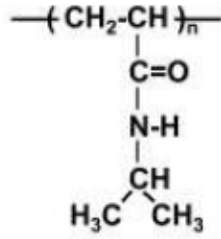


Şekil 2.8. Kollajen yapı iskelesi üzerinde otolog üroteliyal hücre ve kas hücresi ekilmesiyle üç boyutlu hücre kültürü ve biyo-yapay mesane uygulaması.

2.3 Sıcaklık-duyarlı polimerler ve PNIPAAm

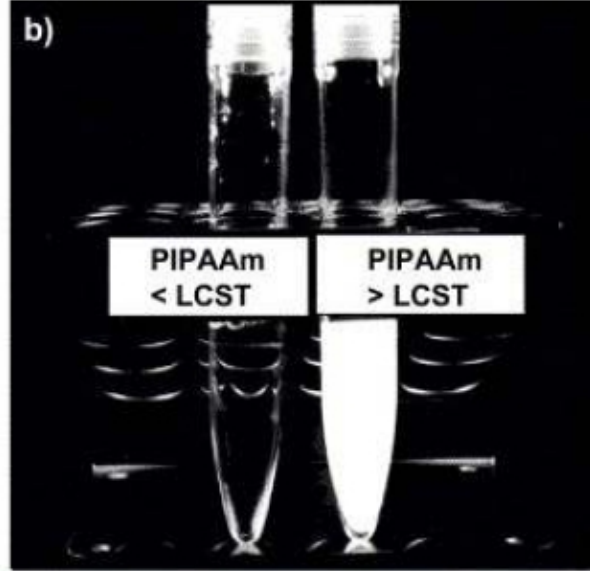
“Akıllı” polimerler pH, elektriksel alan, ışık ve sıcaklık gibi çevresel koşullarda ki değişimlerin olduğu durumlarda geri dönüşümlü olarak keskin yapısal değişimler gösteren polimerlerdir. Tepki duyarlı polimerler arasında en sık kullanılanları ortam değişiminde kontrolünün kolaylığı da düşünülürse, sıcaklık-duyarlı polimerlerdir. Gerek ilaç salım sistemleri gerekse biyomühendislik alanında kullanılan pekçok sıcaklık-duyarlı polimer tipleri bulunmaktadır. Ancak poli(N-izopropilakrilamid) yani PNIPAAm, üzerinde en çok çalışma yapılmış sıcaklık-duyarlı polimer olarak öne çıkmaktadır. Bunun sebebi sıcaklık değişimine dayalı olarak polimerin yapısında gerçekleşen akut faz değişiminin insan vücut sıcaklığı olan 37°C civarında gerçekleşmesidir. Su içerisinde PNIPAAm 32 °C’lik LCST (Lower Critical Solution Temperature=alt kritik çözünme sıcaklığı) sıcaklığında faz seperasyonu göstermektedir. IUPAC tanımına göre LCST terimi, bir karışımın çözünmemiş halden tamamen çözünmüş hale geçebileceği alt sıcaklık sınırını tanımlamaktadır. Eğer ortam sıcaklığı LCST sıcaklığı olan 32 °C’nin üzerine çıkartılırsa PNIPAAm zincirleri yoğunlaşıp sıkılaşmış bir hale gelerek hidrofobik bir hale gelmektedir. Ortam sıcaklığının LCST altına düşürülmesi halinde ise, polimer zincirlerinin genişleyip açılması ile yapı hidrofilik hale gelmektedir (Pan ve ark, 2001). PNIPAAm’ın değişen ortam sıcaklığına karşı davranışı Şekil 2.9 ‘da gösterilmektedir. NIPAAm’ı kullanışlı kılan özelliği olan LCST derecesinin oda sıcaklığı ve insan vücut sıcaklığı arasında olması, bu polimeri biyomedikal uygulamalar için faydalı hale getirmektedir. Sonraki sayfada ki şekilde de görülebileceği üzere (Şekil 2.9), PNIPAAm yapısında -NH ve C=O olmak üzere hidrofilik gruplar ve –izopropil biçiminde bir hidrofobik grup içermektedir. Suda gerçekleşen faz değişimi sıcaklık-bağımlı hidrojen bağlanması ve moleküller arası hidrofobik etkileşimler vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Lin ve ark. 1999). LCST üzerindeki sıcaklıklarda gerçekleşen dehidrasyon ağırlıklı olarak moleküller arası hidrofobik etkileşimlerle gerçekleşirken, LCST altındaki sıcaklıklarda hidrojen bağlanması ve su-polimer arası moleküler etkileşimler polimer zincirinin hidrasyonunu sağlarlar.

a)

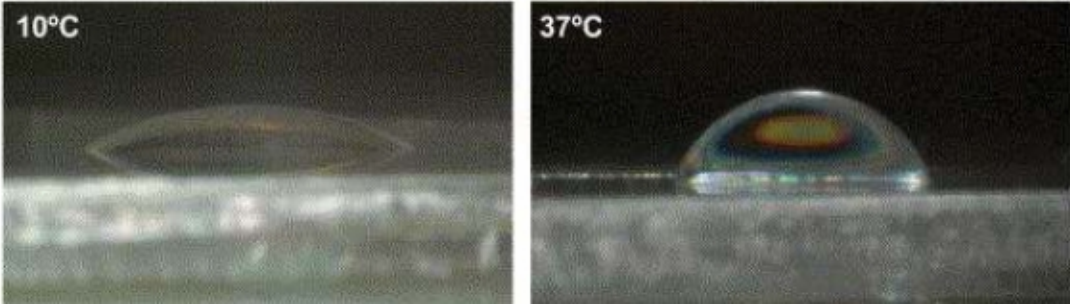


LCST: 32°C

b)



c)

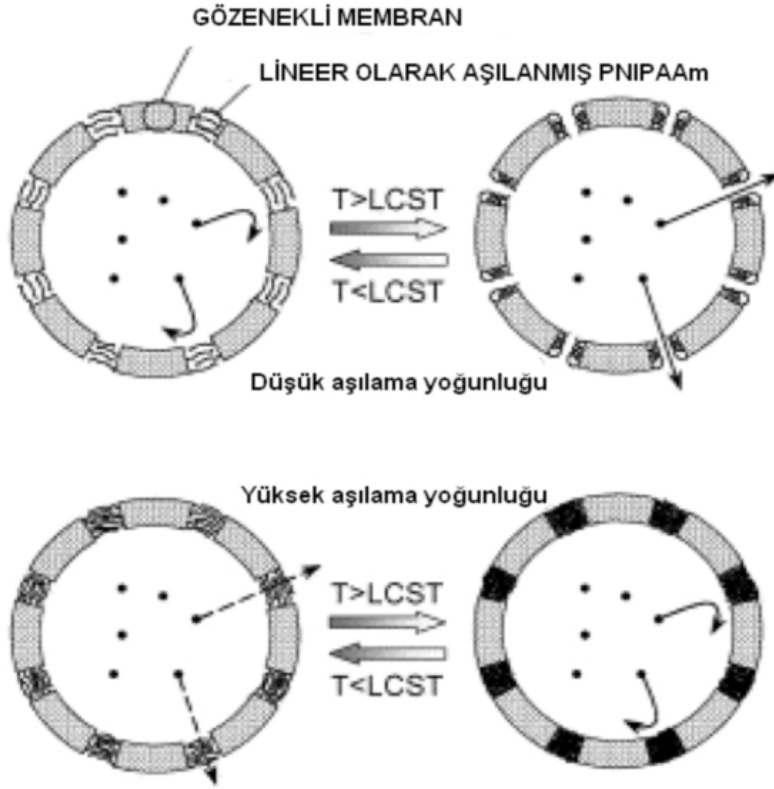


Şekil 2.9. Sıvı içerisinde ve yüzeylerde PNIPAAm yapısı ve özelliği.a) PNIPAAm yapısal formülü b) LCST altında ve üzerinde sıvı içerisinde çözünme/çözünmeme durumunun gösterilmesi c)Yüzeyler üzerinde sıcaklık- duyarlı hidrofilitite/hidrofobisite değişimi.

2.3.1 PNIPAAm Uygulamaları

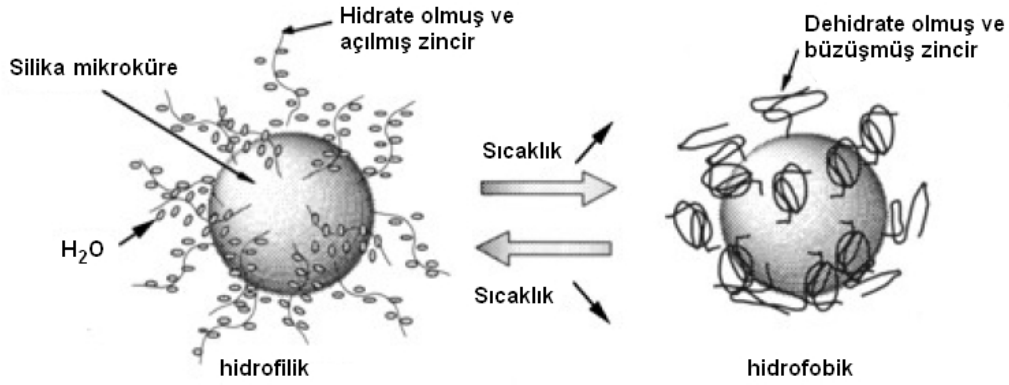
Plastik veya tekstil kökenli yüzeylere kaplanan PNIPAAm ile farklı malzemelere sıcaklık-duyarlı özellik kazandırılabilmekte ve malzemelerin farklı alanlarda kullanım potansiyeli ortaya çıkartılabilmektedir. Bunun yanısıra vücut sıcaklığı ve dolayısıyla hücre kültürü ortam sıcaklığına yakın bir LCST değerine sahip oluşturma kontrollü ilaç salım sistemi uygulamaları, kromatografik uygulamalar ve doku mühendisliği uygulamaları için için idealdir. Kontrollü ilaç salım sistemleri için örnek bir çalışmada Chu ve ark., porlu bir yapıda olan poliamid mikrokapsüllerine

PNIPAAm kaplayarak mikrokapsül membranında sıcaklık-kontrollü geçitler oluşturmuş ve kontrollü ilaç salımı gerçekleştirmişlerdir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Düşük ve yüksek aşılama yoğunluğu ile hazırlanan “sıcaklık-duyarlı geçit” içeren mikro-kapsüllerden kontrollü ilaç salımı.

Kromatografik uygulamalarda kullanılmak üzere silika boncuklar üzerine kaplanan NIPAAm kopolimerleri kolon dolgu materyali olarak kullanılmış (Kikuchi ve ark. 2004), farklı biyomoleküller için tutulum süreleri belirlenerek sadece sıcaklıkta gerçekleştirilen değişimlerle mobil fazda bir değişikliğe gidilmeksizin karışımdan istenen biyomolekülün elusyonu mümkün hale getirilmiştir (Şekil 2.11).

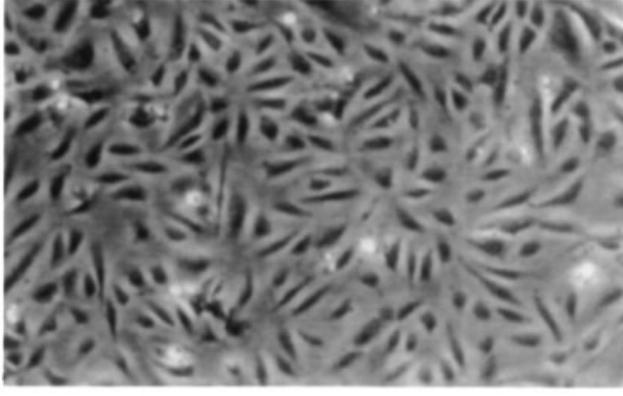


Şekil 2.11. Kolon kromatografisi için sabit faz olarak PNIPAAm aşılınmış silika mikroküreler

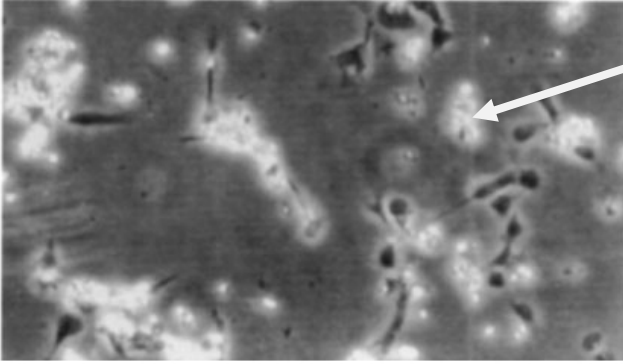
Doku mühendisliği uygulamalarında PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı polimerlerinin en geniş kullanımı hücre kültürü için sıcaklık-duyarlı yüzeyler oluşturulması biçiminde gerçekleşmiş ve “**hücre tabakası mühendisliği**” kavramı ortaya çıkmıştır.

2.3.1.1 Sıcaklık-duyarlı hücre kültürü yüzeyleri:

Geleneksel olarak, hücreler TCPS (Tissue culture polystyrene:doku kültürü polistireni) üzerinde tam yayılım gösterene kadar üretilip daha sonra EDTA gibi interkalasyon ajanları kullanılarak hücre-hücre bağlantılarının bozulması ile veya tripsin veya dispaz gibi enzimler vasıtası ile proteolitik olarak yüzey adhezyon proteinlerinin parçalanması ile yayıldıkları yüzeyden ayrılırlar (Şekil 2.12). Ancak kullanılan kimyasallar ve enzimler seçici olmadıkları için iyon kanalları, büyüme faktörü reseptörleri gibi hücre transmembran proteinleri de bu ayırma işleminden büyük zarar görmüş biçimde çıkarlar.



A

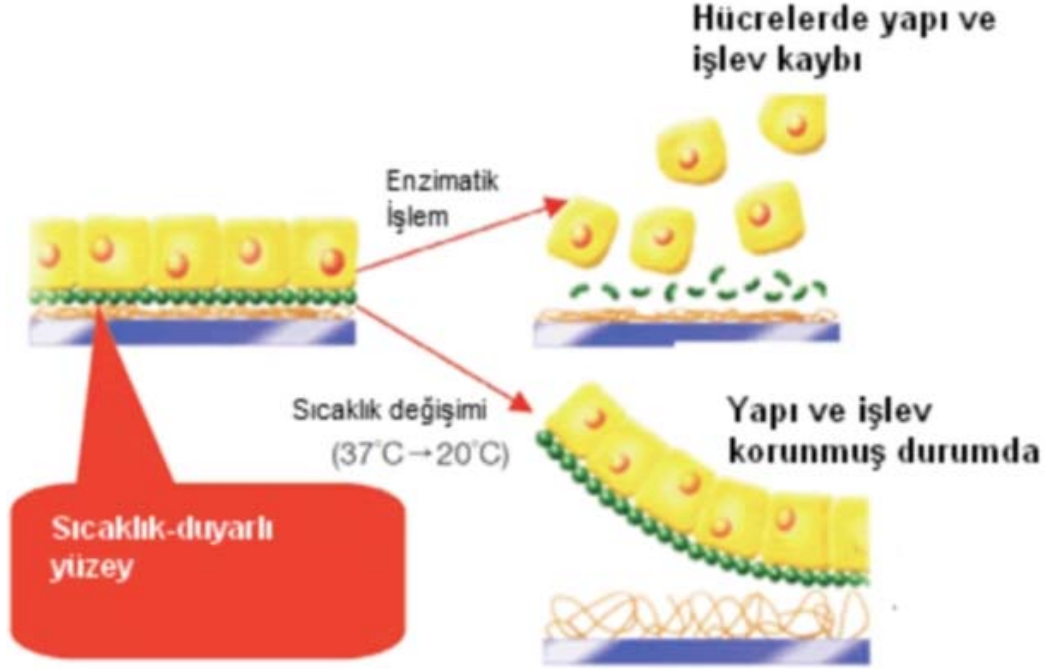


B

Şekil 2.12. Tripsinizasyon ile yüzeyden hücre ayrılması.a)Monolayer HUVEC hücreleri b)Tripsinle işelme gördükten sonra HUVEC hücreleri. Ok işareti yüzeyde kümelenmiş ölü-canlı hücre yığınlarını göstermektedir.

1990 yılında Teruo Okano ve çalışma arkadaşları, öncü çalışmaları ile hücre kültür sistemlerinden hücre hasadı için sıcaklık-duyarlı hücre kültür kaplarını içeren yeni bir yaklaşım ortaya çıkartmışlardır. N-izopropilakrilamid'in izopropil alkol içerisinde çözülmesi ve TCPS üzerine yayılarak elektron demeti ile polimerizasyonu sonucunda polistiren yüzeylere kovalent olarak bağlanmasına dayalı bu yeni yaklaşım, hücrelerin hasarsız biçimde kültür kaplarından hasat edilmesine olanak tanımıştır. PIPAAm (poli-n-izopropil akrilamid) kaplanmış yüzey, 37°C'de hidrofobik özellik göstererek hücrelerin yapışmasına ve proliferasyonuna olanak sağlarken, ortam sıcaklığının 20 °C'ye getirilmesi ile polimerin LCST derecesi olan 32 °C'nin altına inilmesinden dolayı hidrofilik özellik kazanarak şişmesi sonucu hücrelerin bir hücre tabakası biçiminde ortamdan hasat edilmelerine olanak tanımıştır. Bu yaklaşım sayesinde hücre transmembran proteinleri hiç bir zarar görmedikleri gibi, sadece hücrenin bazalinde yer alan bağlantılardan ayrılma olduğu için hücre-hücre bağlantıları zarar görmeden tabaka biçiminde bir ayrılma

sağlanabilmektedir. Bu sayede enzimatik hasat işlemlerine göre çok daha etkin biçimde farklılaşmış hücre elde edebilmek mümkün olabilmektedir (Okano, 1995, Kushida ve ark.2001) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Enzimatik işlemler ve sıcaklık-kontrollü hücre ayrılması.

2.3.1.2 Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin tasarımı :

Doku mühendisliği uygulamaları için sıcaklık-duyarlı yüzeylerin tasarımı pekçok farklı yol kullanılmaktadır. Ancak bu metodlardan sadece birkaç tanesi hücre – tabakası mühendisliği için uygundur. Bazı durumlarda PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeylerde LCST'nin altında bile hücre tutunmasının meydana gelmediği görülmüş, dolayısıyla hücre kültürü için uygun ortam oluşturmadıkları ortaya çıkmıştır. Hücre tabakası mühendisliği için sıcaklık-duyarlı yüzey oluşturulmasında kullanılan polimerizasyon yaklaşımları aşağıda özetlenmiştir (Şekil 2.14).

Radyasyonla indüklenmiş greft polimerizasyonu:

Bu yüzey kaplama yaklaşımı biyomateryallerin yüzey modifikasyonunda yaygın biçimde kullanılmaktadır (Stannett, 1990). UV radyasyonu, elektron demeti, plazma aktivasyonu ve plazma polimerizasyonu olmak üzere pek çok farklı

biçimde uygulanabilmektedir. Morra ve Cassinelli tarafından 1997 'de benzofenol varlığında UV radyasyonu ile polistiren hücre kültürü kaplarına PNIPAAm kaplanması gerçekleştirilmiştir. Propanol içerisinde çözülmüş monomer çözeltisi 365 nm dalga boyunda 30 dakika boyunca UV'ye maruz bırakılmış ve PIPAAm yüzeye kaplanmıştır. Sıcaklık-duyarlı biçimde modifiye edilen yüzeylerde L-292 fibroblast hücreleri kültürü yapılmış, hücre tabakası elde edilmiştir. Elektron demeti radyasyonu ile TCPS üzerine homojen biçimde yayılmış olan NIPA monomer çözeltisi 3.2 Gy radyasyona maruz bırakılarak yüzeye kovalent olarak aşılanmış (Şekil 2.14 a) ve çeşitli hücre tipleri modifiye sıcaklık-duyarlı yüzey üzerine yapışıp üremiş, ortam sıcaklığının düşürülmesi ile yüzeyden intakt hücre tabakaları biçiminde hasat edilmişlerdir (Nagase ve ark 2009). Yakın zamanda Pan ve arkadaşları plazma polimerizasyonu ile PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeyler elde etmişlerdir. NIPAAm monomerine plazma deşarjı ile cam, silika, TCPS gibi katı yüzeylere polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Radyasyonla indüklenmiş polimerizasyon ve özellikle elektron demeti polimerizasyonu, hızlı bir biçimde sıcaklık-duyarlı yüzey oluşturulması için uygun olsalar da, ekipman gereksiniminden ötürü maliyetli yaklaşımlardır.

Yüzeye Aşılama (Grafting To) Yaklaşımı :

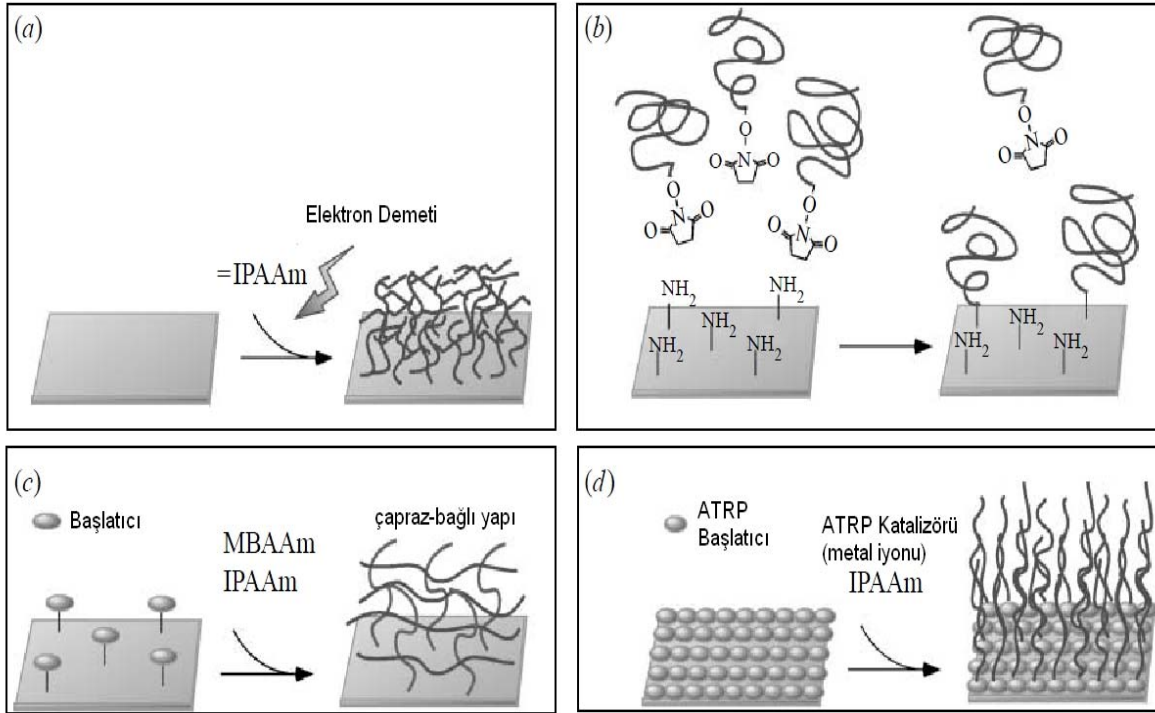
Bu yaklaşımda yüzeye kaplanacak polimerin fonksiyonel gruplar ile hazırlanması ve fonksiyonel grup bağlanmış polimerin yüzey ile reaksiyona sokularak aşılama olmak üzere iki temel prosedür uygulanır. Diğer yaklaşımlara göre avantajı polimerizasyon koşullarının kontrolü ile yüzeye kaplanmış polimer zincirlerinin moleküler ağırlıklarının ayarlanabilmesine imkan vermesidir. Ancak, bu yaklaşım kullanılarak gerçekleştirilen polimer aşılama aşılama yoğunluğu yüzeye bağlanacak fonksiyonel gruplar tarafından sterik olarak sınırlandırıldığı için kısıtlı olabilmektedir (Şekil 2.14 b). Takei ve ark. tarafından 1994 yılında gerçekleştirilen çalışmada, başlatıcı olarak AIBN varlığında PIPAAm polimeri hazırlanmış ve 3-merkaptopropionik asit fonksiyonel grup olarak polimere bağlanmıştır. Yüzeyin kaplanması polimer zincirine bağlanmış olan fonksiyonel karboksil gruplarının polistiren yüzeydeki amino grupları ile kovalent olarak bağlanarak yüzeye tutunması ile gerçekleşmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda yüzeyin sıcaklık-duyarlı özelliği olduğu ortaya çıkartılmıştır.

Yüzeyden Aşılama (Grafting From) Yaklaşımı :

Bu yaklaşımda önce başlatıcı ajan yüzeye immobilize edilir ve daha sonra yüzeye immobilize aktif gruplar vasıtası ile eklenen monomerin polimerizasyonu yüzeyden başlatılmış olur (Şekil 2.14 c). Örnek çalışma olarak Yakushiji ve ark. 1999 yılında mikroskop lameli yüzeyine immobilize ettikleri azo başlatıcısı ile NIPAAm monomeri ve çapraz bağlayıcı ajan olarak N,N-metilenbisakrilamid kullanarak yüzeye immobilize hidrojel tabakaları oluşturmuşlardır. Elde edilen sıcaklık-duyarlı hidrojel ile modifiye edilmiş yüzey, kromatografik uygulamada sabit faz olarak kullanılmıştır.

Atom Transferi Radikal Polimerizasyonu :

Son yıllarda daha yeni bir yüzeye aşılama yaklaşımı olarak Atom Transferi Radikal Polimerizasyonu ile sıcaklık-duyarlı yüzeyler oluşturulmaya başlanmıştır (Şekil 2.14 d). Bir kontrollü polimerizasyon tekniği olan ATRP, ligand olarak metal iyonları varlığında gerçekleştirilir ve polimerizasyon sırasında aktif ve inaktif zincirler arasında denge kurulmasını sağlayarak istenmeyen zincir sonlanmalarının önüne geçilmesini sağlar. NIPAAm bazlı uygulamalarda ATRP tekniği ile “polimer fırça” yapısında yüzey aşılama yapılmıştır. poli(4-vinilbenzil klorid) kaplanmış polistiren yüzeylere aşılama yapılmış PNIPAAm ile hazırlanan sıcaklık-duyarlı hücre kültürü kaplarında endotelial hücre kültürü yapılmış ve sürekli (confluent) tek tabaka elde edilmiştir (Mizutani ve ark. 2008).

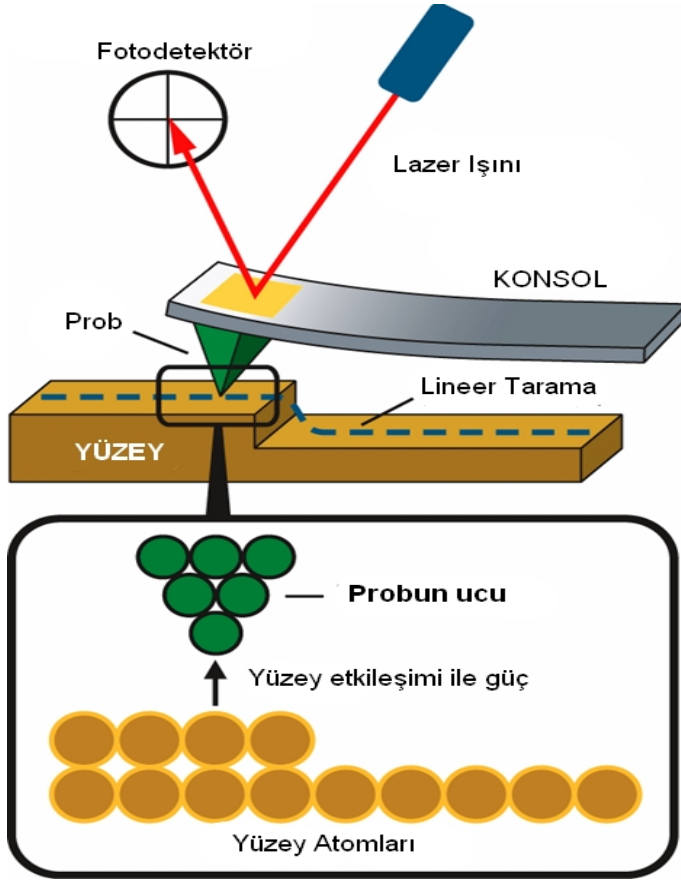


Şekil 2.14. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin tasarımı ve alternatif aşılama teknikleri: a)Elektron demeti ile polimerizasyon b) Fonksiyonel grup bağlanmış zincirin yüzeye aşılınması c) Başlatıcının yüzeye immobilizasyonu ve çapraz-bağlı zincrin aşılınması d)Atom transfer radikal polimerizasyonu.

2.3.1.3 Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Karakterizasyonu

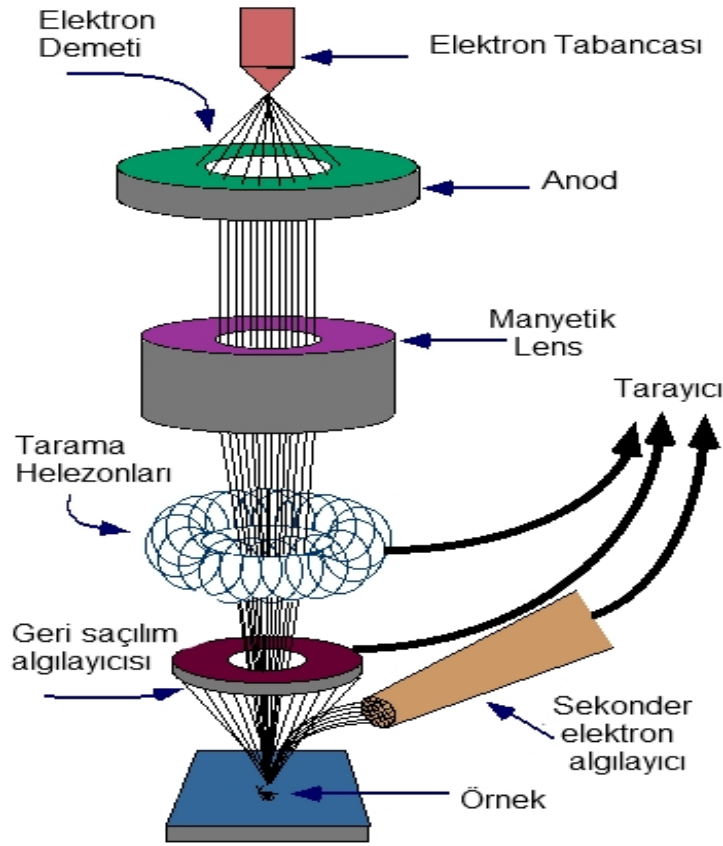
Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin enstrümental analiz teknikleri kullanılarak karakterize edilmesi , polimer aşılmasının başarılı olup olmadığının anlaşılması açısından son derece önemlidir. Polimerik bir substrata aşılana PNIPAAm bazlı polimerin karakterizasyonu için yüzey-oryante spektroskopik metodlar sıklıkla kullanılmıştır. Kalitatif karakterizasyon için sıklıkla tercih edilen yöntem XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi)'dir. Bu yöntemle incelenecek yüzeye vakum koşullarında X-ışını gönderilir, kinetik enerjide meydana gelen değişimler ve elektron durumundaki değişimler ölçülerek yüzeyin elemental yapısı hakkında bilgi sahibi olunması sağlanır. NIPAAm söz konusu olduğunda yüzeydeki karbon, nitrojen ve oksijen kompozisyonunun monomerin bilinen stokiyometrisi ile uyum içerisinde olup olmadığına bakılır (Akiyama ve ark. 2007). Yüzey karakterizasyonu için en sıklıkla kullanılan yöntem AFM (Atomik Güç Mikroskopisi)'dir. Bu yöntem çok yüksek çözünürlüklerde nano ölçülerde yüzey topografisi belirlenmesi ve görüntülenmesini sağlar. Çalışma prensibi cihazda bulunan ve genellikle silikon nitrat'dan imal edilen

konsolun (cantilever) yüzeye olan etkileşimi ile konsolda oluşan titreşimlerin ölçümüne dayalıdır. Konsolun ucunda bulunan nanometrik boyutta bir prob, yüzeye temas ettirilmeden belirlenen bir alan boyunca hareketi sonucunda ve gerek van der waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler, kimyasal bağlanmadan kaynaklanan etkileşimler gibi faktörlere bağlı olarak yüzeye yaklaşır yada uzaklaşır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Atomik Güç Mikroskobu çalışma prensibi

Yüzey karakterizasyonunda kullanılan bir diğer metod ise SEM (Taramalı Elektron Mikroskopisi)'dir. Taramalı elektron mikroskobisinde örneğin bulunduğu yüzeye yüksek enerjili elektron bombardımanı yapılır, incelenecek numunenin yüzeyindeki atomlar ile etkileşen elektronların yarattığı sinyallerin sensörler tarafından algılanmasıyla görüntüleme gerçekleştirilir. Ancak SEM ile görüntüleme yapılabilmesi için incelenecek numunelerin elektrik iletkenliği olması mecburidir. Bu nedenden ötürü inceleme yapılmadan önce numuneler altın, altın/palladyum, platin, ozmium gibi iletkenlerle kaplanmalıdır (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Taramalı Elektron Mikroskobu çalışma prensibi

FT-IR /ATR tekniği de yüzeye aşıl原因 sıcaklık-duyarlı polimerin kantitatif tespiti açısından önem taşıyan bir karakterizasyon metodudur. Infrared spektroskopisi (IRS) atomik ve moleküler birimlerin titreşimlerinden faydalanarak malzemelerin kimyasal yapıları ve oryantasyonları hakkında bilgi verir. Yüzey FTIR çalışmaları, yüzey sinyal yoğunluğunun artışı ve bulk sinyalinin azalması esasına dayanmaktadır. Bu teknikler, ATR-FTIR (attenuated total reflectance), dışsal yansıma oranı ve difüz yansıma oranı olarak sıralanabilir. Özellikle ATR, biyomalzemelerle ilgili çalışmalar da tercih edilir. Teknik, yüzeyden 1-5 μ derinliğe kadar indiğinden tam anlamıyla yüzeye hassas olmayıp, yüzey yakınındaki bölgeyi de inceler. Protein ve polimerlerin su altındaki çalışmaları ATR ile yapılabilir. Bu çalışmalarda spektrumdan su sinyali çıkartılarak yalnızca yüzey (örneğin adsorblanmış protein) incelenebilir. Karakterizasyonla ilgili teknikler Çizelge'de özetlenmiştir.

YÖNTEM	PRENSİP	Derinlik	Ayırıcılık	Analitik Hassasiyet
XPS	X-ışınlarının malzeme ile etkileşimi	10-250 Å	10-150µm	% 0.1 atom
AFM	Yüzey güç etkileşimi	10 Å -1µm	100 Å	Çok yüksek
FTIR-ATR	IR radyasyonu	1-5 µm	10µm	% 1 mol
STM	Kuantum tünelleme	5 Å	1 Å	Tek atomlar
SEM	İkincil elektron emisyonu	5 Å	40 Å	Yüksek kantitatif değ

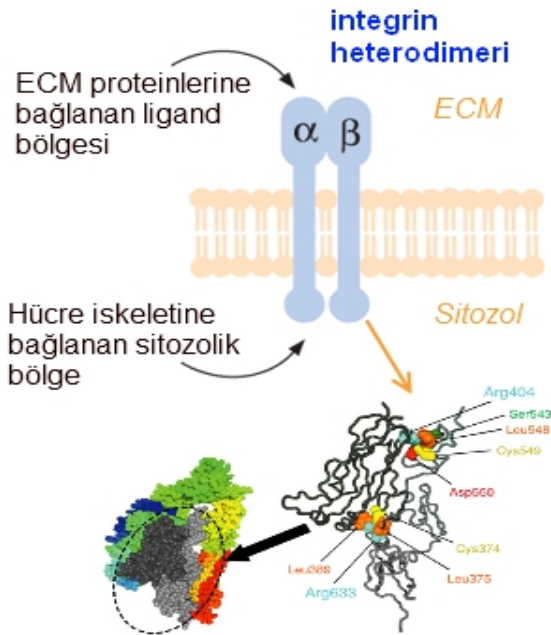
Çizelge 2.2. Yöntem, çalışma prensibi ve analitik hassasiyet açısından yüzey karakterizasyonu teknikleri

2.3.1.4 Sıcaklık-duyarlı Yüzeylere Hücre Yapışması ve Ayrılması

Hücre adhezyonu, hücrelerin üç boyutlu biçimde organize olarak doku ve organları oluşturmaları açısından ön şarttır. Hücre adhezyonu (yapışması), aslında ECM (hücre dışı matriks) ile bağlantılar, hücre-hücre arası bağlantılar ve hücre membran adhezyon sistemlerinin hücre içi iskeleti elemanları ile bağlantılarından oluşan bir bütünlüğü temsil eder. Hücre adhezyonundan sorumlu protein yapıları üç farklı sınıfta değerlendirilebilir (Lee, 1993):

- Adhezyon reseptörleri : Hücre substrat bağlantısı için integrinler ve hücre-hücre bağlantısı için kadherinler.
- ECM proteinleri : Kollajen gibi, fibriller yapıda, büyük glikoprotein zincirleri.

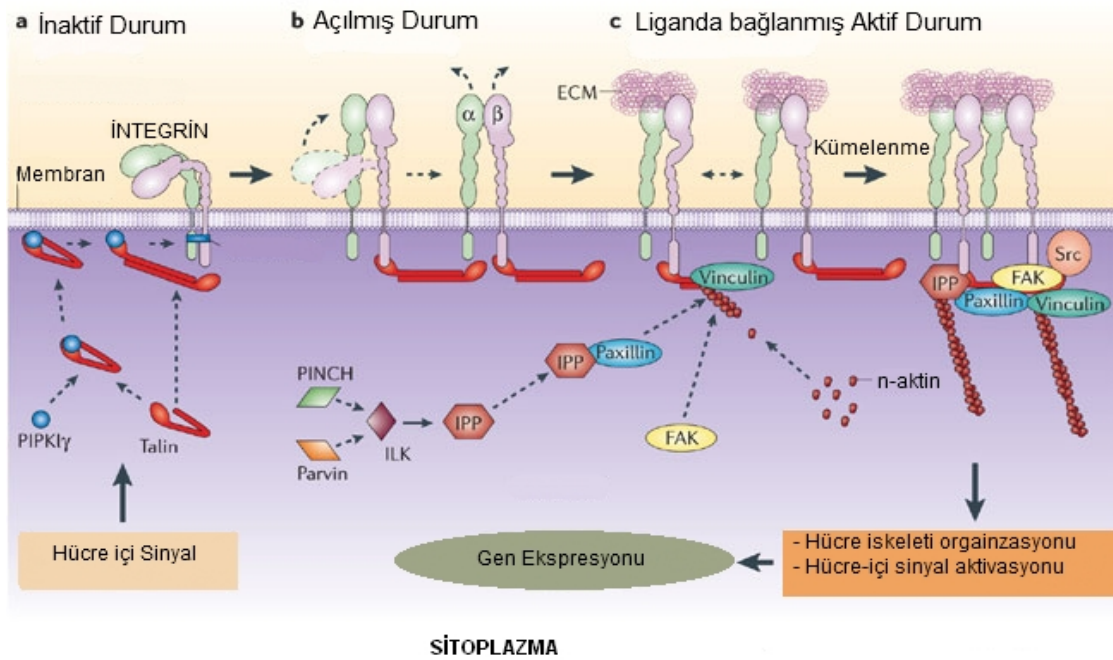
- Sitoplazmik periferel membran proteinleri : Transmembran adhezyon proteinlerine bağlı olan ve aktin hücre iskeleti ile adhezyon reseptörü ilişkisini sağlayan sitoplazmik yapılardır. Hücre yüzeyinden sinyal iletiminde kritik rol oynayan Katenin örnek olarak verilebilir.
- Hücre ve substrat arası adhezyon ilişkisini gerçekleştiren reseptörler arasında integrin familyası sayıca en fazla ve en sık rastlanan grubu oluşturmaktadır. İntegrinler, hücre farklılaşması, embriyogenez, yara iyileşmesi ve hemostaz gibi proseslerde önemli rol oynayan reseptörlerdir. İntegrinler, α ve β olarak isimlendirilen iki transmembran alt birimin biraraya gelmesiyle oluşmaktadır. İntegrin yapısı Şekil 2.17’de gösterilmektedir. Bugüne kadar saptanmış olan 18 α ve 8 β altünitesi bulunmakta ve bunlar 24 farklı dimer yapısı oluşturmaktadır. α ve β altünitelerinin kombinasyonu integrinin ligandlara olan eğilimini belirlemektedir (van der Flier, 2001).



Şekil 2.17. İntegrinlerin yapısı ve lokalizasyonu

İntegrinler aracılığı ile hücre yapışması birbirini takip eden dört basamakta gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla; hücrenin yüzeye tutunması, hücrenin yüzey üzerinde yayılması, hücre iskeletinin organizasyonu ve fokal yapışmanın oluşmasıdır. Öncelikle, hücrenin yüzeye tutunma basamağında, hücre yüzeyle temasa geçmekte ve hücrenin hafif kayma gerilimlerine direnç göstermesini sağlayacak olan ligand bağlanması gerçekleşmektedir. İkinci aşamada, hücrenin

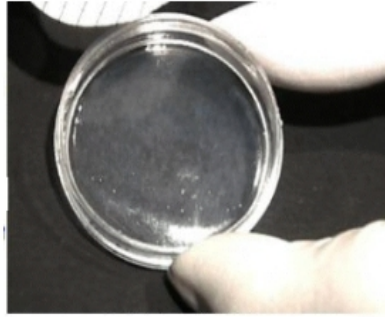
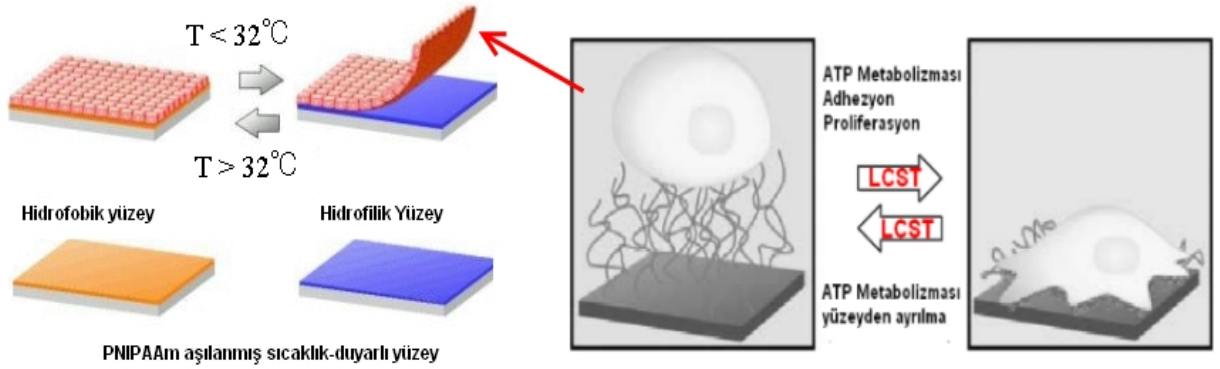
plazma membranı yüzey üzerinde yayılır ve hücre yassı bir görünüm alır. Bu durumda hücrenin uzunlamasına boyutu, yüksekliğinin 3-10 katı arasındadır. Hücrenin yüzey üzerinde yayılmasını tamamlamasıyla, üçüncü aşamada aktin organizasyonu gerçekleşir ve hücrenin yüzeye yapışmasını sağlayan lif demetleri oluşur. Son basamakta, hücre iskeletinin hücre dışı matriks proteinlere bağlandığı fokal yapışma gerçekleşir (Şekil 2.18). Dört basamakta gerçekleşen hücrenin yüzeye yapışması olayı sırasında integrinler, bir taraftan hücre ile yüzey arasında fiziksel bir tutucu görevi görürken bir taraftan da hücre membranındaki periferal proteinler ile etkileşerek hücre iskeletinin konformasyonel değişimini başlatırlar. İntegrinler aracılığı ile sağlanan sinyal iletimi her iki yönde de gerçekleşir ve integrinlerin hücre dışı bağlanma aktivitelerini kontrol eder. İntegrinler aracılığı ile gerçekleşen hücre yayılmasının ve bunu takiben fokal yapışmanın, yüzeye bağımlı hücrelerin yaşaması ve üremesi için gerekli olduğu kanıtlanmıştır (Hersel ve ark., 2003).



Şekil 2.18. İntegrin aktivasyonu mekanizması ile hücrenin ECM ile bağlanması

Hücre kültürü ortamında yüzeye adhezyonu gerçekleştiren hücrelerin yüzeyden ayrılması EDTA gibi interkalasyon ajanları kullanılarak hücre-hücre bağlantılarının bozulması ile veya tripsin veya dispaz gibi enzimler vasıtası ile proteolitik olarak yüzey adhezyon proteinlerinin parçalanması ile gerçekleştirilmektedir. Ancak

sıcaklık-duyarlı yüzeylerde gerçekleştirilmiş hücre kültürü sistemlerinde sıcaklık değişimine bağlı olarak hücrelerin yüzeyden ayrılmasının, ilk olarak sıcaklığın LCST altına düşürülmesi ile polimer zincir yapısında gerçekleşen hidrasyona bağlı pasif adım ve bunu takip eden hücresel metabolizma ve hücre iskeletindeki değişimleri içeren aktif adımı içeren iki adımlı bir mekanizma sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (Yamato ve ark. 2000). Yüzey hidrofilitesi arttıkça hücrelerin kademeli olarak morfolojik değişime uğrayarak yüzeyden ayrıldıkları görülmüştür. Aktif adımda hücre metabolizmasının devrede olduğu, ortama eklenen ATP sentezi inhibitörleri varlığında ayrılmanın durduğunun gözlemlenmesi ile kesin olarak belirlenmiştir (Şekil 2.19).



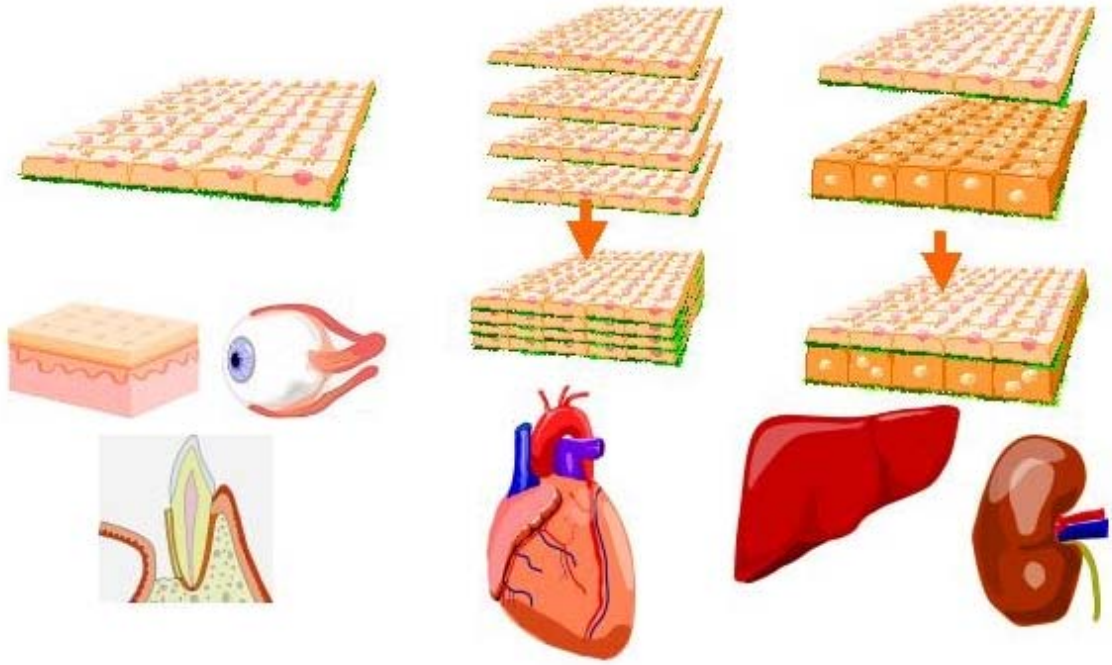
EPİTELİYAL HÜCRE TABAKASI

Şekil 2.19. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerden aktif biçimde hücre tabakası ayrılması

2.4 Rejeneratif Tıp için Hücre Tabakası Mühendisliği :

Genel olarak, pek çok organda bulunan parenkim ve epitelial dokular birbirleriyle sıkışık biçimde bitişik duran, üstüste yerleşmiş, ECM'den bazal lamina ile ayrılmış ve nispeten kopuk biçimde duran hücre tabakalarından oluşmaktadırlar. Daha önce bahsedilen sebeplerden ötürü özellikle bu tip dokuların biyobozunur yapı

iskelelerinde oluşturulması son derece güçtür. Bu nedenle sıcaklık-duyarlı yüzeylerden elde edilen hücre tabakaları epitel veya parenkim dokuların rejenerasyonu için son derece uygundur (Şekil 2.20).

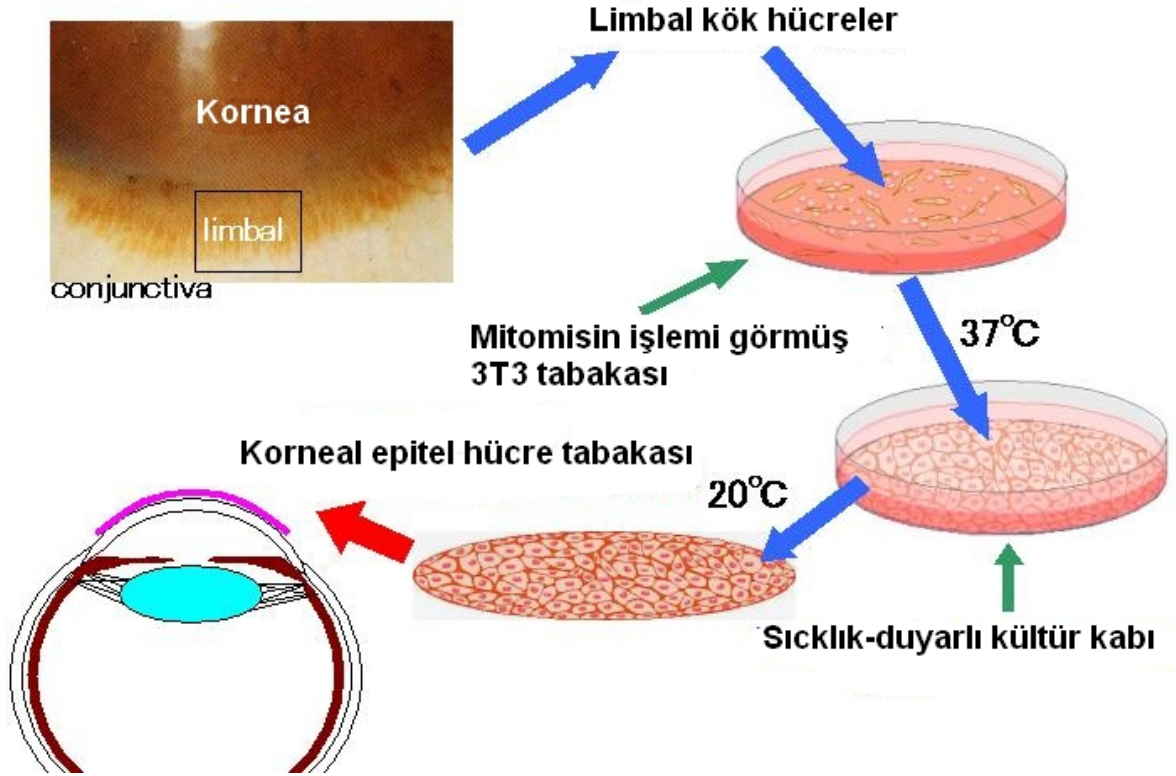


Şekil 2.20. Basitten komplekse hücre tabakası mühendisliği ile doku rekonstrüksiyonu. Hücre tabakalarının tek olarak kullanımı ile kornea ve epitel doku oluşturulabildiği gibi, birden fazla tabaka ile miyokardiyal doku rejenerasyonu, sıcaklık-duyarlı bölgeler yaratılmasıyla ko-kültür ve böbrek, karaciğer gibi yüksek kompleks organların rekonstrüksiyonu potansiyeli.

Hücreler kültür ortamına tamamen yayıldıktan sonra (confluent layer) sıcaklığın LCST seviyesinin altına düşürülmesi ile tek bir hücre tabakası biçiminde hücre hasadı yapılabilir. Hücre kültürü sırasında oluşan ECM de hücrelerle beraber hasat edildiği için elde edilen hücre tabakası TCPS, başka hücre tabakaları veya dokular gibi herhangi bir yüzeye rahatlıkla yapışabilmektedir.

1990 yılındaki öncü çalışmadan itibaren “**hücre tabakası mühendisliği**” adı verilen bu yaklaşımla sıcaklık duyarlı yüzeyler kullanılarak pek çok doku rejenerasyonu çalışması gerçekleştirilmiştir (Shingvi ve ark. 1994, Yamato, 2000, Okano, 2007),. Hücre tabakası mühendisliği, saf hücre kültürleri ile in vitro koşullarda inşa edilen dokuların transplantasyonu için ideal bir yaklaşım olduğunu

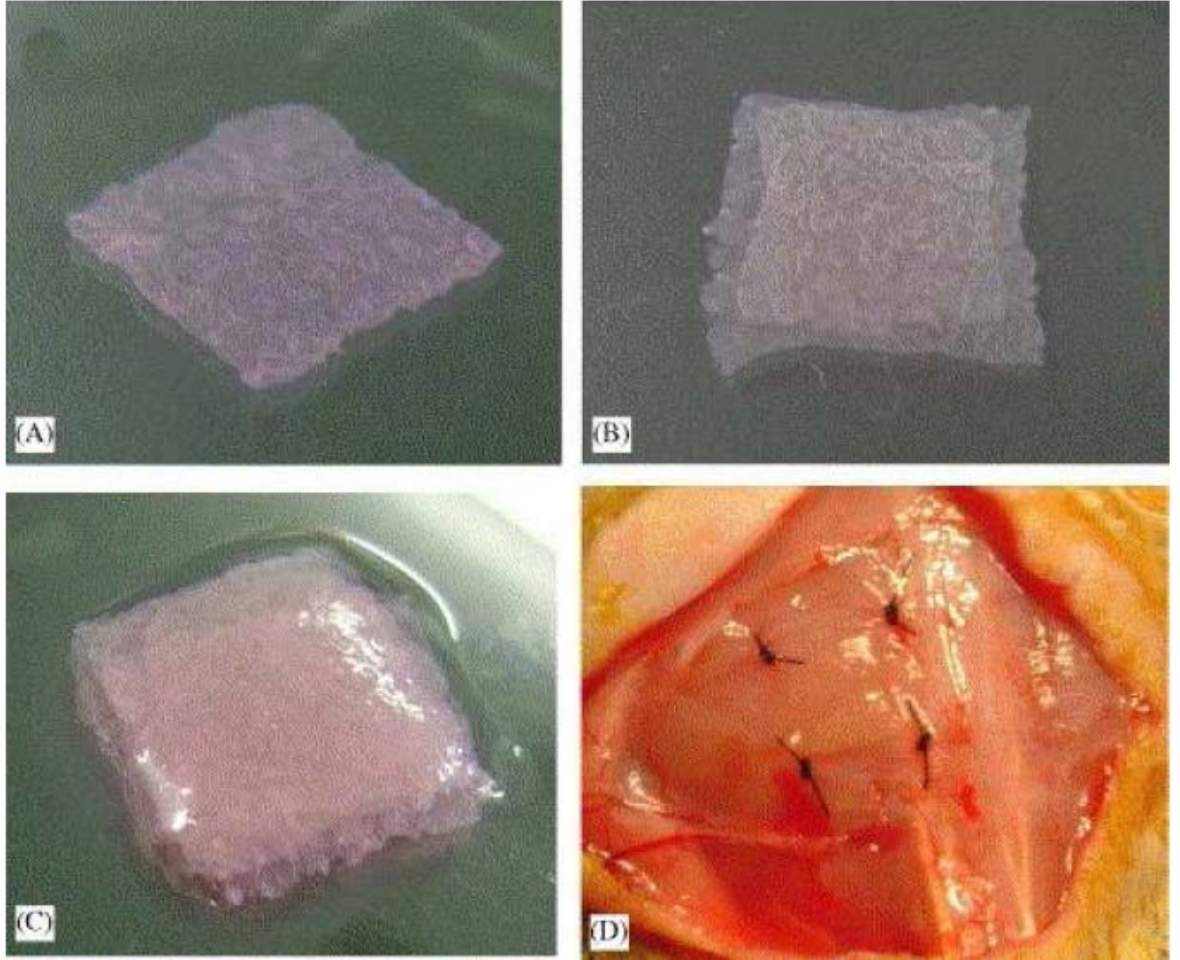
göstermiştir. Klinik koşullarda rekonstrüktif ve plastik cerrahi ve (Yamato ve ark. 2001), oftalmolojik (Nishida ve ark. 2004) uygulamaları mevcuttur. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde besleyici tabaka oluşturan 3T3 hücre tabakası üzerinde insan epidermal keratinosit hücre kültürü yapılmış ve elde edilen hücre tabakasının dermal defektli bölgelere otolog transplantasyonu gerçekleştirilmiştir. Benzer biçimde, kornea epitel kök hücre yetersizliği görülen hastalara, elde edilen epitel hücre tabakalarının transplantasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.21). Şeffaflık, kornea'nın işlev gösterebilmesi için son derece önemli olduğundan fibrin jeli veya amniyotik membranlar gibi opak hücre yapı-iskelelerinin yerine direkt olarak dokunun kendisinden oluşan hücre tabakalarının kullanılması elbette çok büyük bir avantajdır.



Şekil 2.21. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde limbal kök hücre kültürü ve korneal epitel hücre tabakası elde edilerek hasarlı korneaya transplantasyonu

Kalın yapıdaki dokuların rejenerasyonu açısından da hücre tabakası mühendisliği büyük potansiyel vaatmektedir. Kronik kalp yetmezliği tedavisinde kardiyak miyosit hücre tabakaları, iskelet kası kökenli miyoblast hücre tabakaları ve mezenkimal kök hücre tabakaları (Akiyama ve ark., 2007) hayvan sistemlerinde başarı ile uygulanmıştır. Transplantasyon öncesi, iki veya üç hücre tabakası üst

üste yerleştirilerek daha kalın bir yama oluşturulmuştur. Hücre tabakasının bazal kısmında yer alan bağlantı proteinlerinin zarar görmemiş olması, birden fazla hücre tabakasının birbirleri üzerine kolayca yapışmasına olanak tanımaktadır (Shimizu ve ark. 2002). Bu biçimde bir mimari ile üç boyutlu bir kardiyak doku grefti elde edilmiş ve konakçı dokuya transplantasyon gerçekleştirilmiştir. Şu ana kadar 1 mm kalınlığında 30 kardiyak hücre tabakası başarılı biçimde kalp dokusuna transplante edilmiştir(Şekil 2.22).



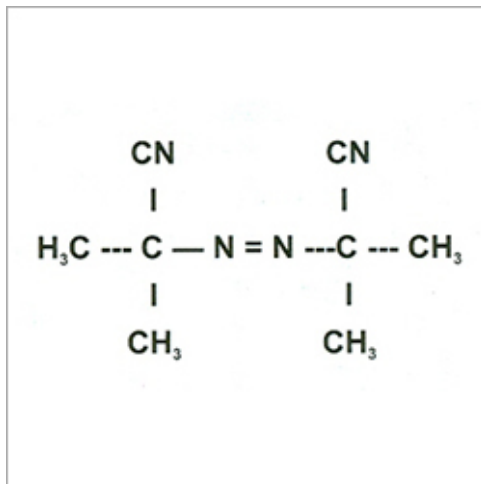
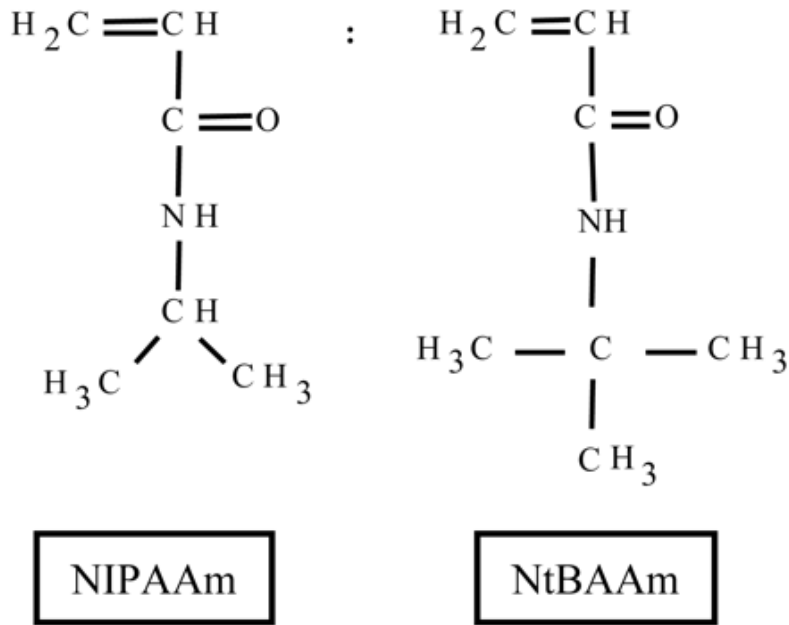
Şekil 2.22. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde hücre tabakası mühendisliği ile gerçekleştirilen düz kas hücresi kültürü ve elde edilen tabakaların birbirine yapışmasıyla üç boyutlu miyokardiyal doku olarak kalp enfarktüs bölgesine implantasyonu.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde, sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ile ilgili bilgi sunulmaktadır. İlk bölümde; araştırmalarda kullanılan polimerik malzemelerin sentez yöntemleri açıklamıştır. İkinci bölümde; üretilen sıcaklık duyarlı yüzeylere kollajen kaplaması ile modifikasyon yöntemi açıklanmıştır. Üçüncü bölümde seçilen sentez metodu ile üretilen sıcaklık duyarlı polimerin yapısal karakterizasyon çalışmalarına yönelik olarak, biyomodifikasyon öncesi ve sonrasında gerçekleştirilen şişme deneyleri, AFM ve SEM analizleri açıklanmıştır. Son bölümde ise; üretilen yüzeylerin doku mühendisliğinde hücre tabakası elde edilmesi ile kullanım potansiyellerinin araştırılması amacıyla yürütülmüş olan hücre kültürü çalışmaları ve analitik teknikler ile ilgili deneysel yöntemler anlatılmıştır.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Tez çalışması kapsamında sıcaklık-duyarlı, vinil-eter bazlı hidrojellerin sentezinde kullanılan N-izopropilakrilamid (NIPAAm), Aldrich, Almanya, N-tert-bütillakrilamid (NtBA) Fluka (İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Başlatıcı olarak kullanılan 2,2'-Azobisisobüronitril (AIBN) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Sıcaklık duyarlı membranların stabilizasyonunda Merck (Almanya) firmasından temin edilen hekzan(C_6H_{14}) ve aseton (C_3H_6O) kullanılmıştır. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin modifikasyonunda kullanılan kollajen Tip I Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Biyomalzemelerin oluşturulmasında kullanılan malzemelerin kimyasal yapıları Şekil 3.1'de verilmiştir.



AIBN (Azobisisobutyronitrile)

Şekil 3.1. Sıcaklık duyarlı yüzeylerin hazırlanmasında kullanılan monomerlerin ve başlatıcı ajanın kimyasal yapıları.

Fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH:7.4) hazırlamak için Sigma (Almanya) firmasından temin edilen tabletler kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan

diğer kimyasal malzemeler; hekzan(C_6H_{14}), aseton (C_3H_6O), etanol (%96) ve asetik asit Merck firmasından temin edilmiştir. Biyomodifikasyon çalışmalarında kullanılan kollajen (Collagen Type I from Rat's Tail) (Sigma) Almanya, firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM), fetal sığır serum (FBS), tripsin-EDTA (0.01% tripsin/ 10 mM EDTA) Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre üremesinin takibinde kullanılan 3-[4, 5-dimetilthiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) Sigma (Almanya) firmasından, Alamar Blue Gibco (ABD) firmasından satın alınmıştır. Lusiferin-lusiferaz ATP test kiti Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Biyoanalitik olarak CLDN4 protein ekspresyonu tayini için Western Blot Kiti, Invitrogen (ABD) ve primer antikör olarak Rabbit AntiClaudin, Antiuroplakin polyclonal antibody, Invitrogen (ABD) kullanılmıştır.

3.2. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan sıcaklık-duyarlı PNIPAAm bazlı polimerlerin sentez yöntemleri ve polistrien hücre kültür kaplarına kaplanmaları süreci aşağıda açıklanmıştır.

3.2.1. Polimerik Malzemenin Sentezi

PNIPAAm Sentezi

Çalışmalarda ilk etapta kullanılması planlanan sıcaklık-duyarlı PNIPAA (poli-n-izopropilakrilamid) polimeri olmuştur. İlk olarak, polimer sentezi için gerekli deney düzeneği (sıcak su banyosu içerisine oturtulmuş mekanik olarak karıştırılan cam bir reaktör) içerisinde hazırlanmış PIPAAm polimerinin uygun monomer(NIPAAm), başlatıcı (AIBN) ve zincir transfer ajanı(2-merkaptotilamin) oranlarının tespiti

yapılmıştır. Monomer 75 ml etil alkol içerisinde eklenmiş ve çözümüştür. Başlatıcı ve zincir transfer ajanı ortama eklenmiş ve 250 ml hacme sahip reaktör içerisinde ortama 3 dakika boyunca N₂ gazı verilmiştir. Monomer çözeltisi 65°C sıcaklıkta 120 rpm hızla 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon bu süre bitiminde durdurulduktan sonra elde edilen polimer çözeltisi 50°C sıcaklıkta vakum etüvünde kurutulmuş ve daha sonra saf su içerisinde çözülerek polistiren yüzeylere kaplanmaya uygun hale getirilmiştir.

NIPAAm-NtBAm Kopolimer Sentezi

Sıcaklık duyarlı yüzeylerin hazırlanmasında kullanılan ikinci metod serbest radikal polimerizasyonu olmuştur. PIPAAm yerine NIPAAm-NtBAm kopolimeri (Poli(NIPAAm-ko-NtBAm)) sentezlenmiştir. Başlatıcı olarak yine AIBN kullanılmış, molar olarak %85 NIPAAm - %15 NtBAm olacak biçimde monomer çözeltisi reaktör içerisinde benzen'de çözülerek 3 dakika boyunca argon gazına maruz bırakılmıştır. Reaksiyon süresi 60 °C'de 24 saat olarak belirlenmiştir.

Reaksiyon süresinin sonunda polimer karışımı hekzan içerisinde çöktürülmüştür. Presipitasyon işlemi çözücü olarak aseton, non-solvent olarak hekzan kullanılmış ve çöktürme işlemi üç defa tekrarlanmıştır. İşlemden sonra elde edilen ürün 45 °C'de vakum etüvünde kurutulmuştur.

3.2.2. Polimerlerin Yüzeye Kaplanması

Sentez aşamasından sonra elde edilen polimer çözeltileri hücre tabakası eldesi için sıcaklık-duyarlı yüzeylerin oluşturulması amacıyla TCPS (Tissue Culture Polystyrene) üzerine kaplanmıştır. Kaplama işlemi için iki farklı metod izlenmiştir. PNIPAAm polimeri aşamadan sonra, polimerler, polistiren bazlı doku kültür kaplarının (TCPS) yüzeyine kovalent olarak aşılması planlanmıştır. Bu amaçla monomerler öncelikle uygun çözücüde (2-propanol) çözülüp TCP yüzeylere homojen olarak yayılmış ve ardından elektron demeti ile yapılan ışınım (Lineer hızlandırıcılı Varian Cliniac THX, Gazi Hastanesi Tıp Fakültesi Radyoloji ABD) ile

polimerleşme gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrası dönüşmeyen monomerler ve yüzeye tutunmayan polimerler distile su ile yapılacak yıkama sonrası uzaklaştırılmış ve hazırlanan yüzeyler parafin filmle kapatılarak 37 °C'de hücre kültürü için bekletilmiştir.

PNIPAAm-NtBAm kopolimeri ise %4 konsantrasyonda olacak biçimde etanol içerisinde çözülerek 24 kuyucuklu polistiren hücre kültürü kaplarına ve 35mm lik TCPS hücre kültür kaplarına olmak üzere 24'lük kap için her kuyucuğa 20µL, 35mm'lik kap için 80 µL olacak biçimde mikropipetle aktarılmıştır. Aktarımın yapıldığı polistiren kaplar vakum etüvünde 40 °C'de 18 saat bekletilerek kurutulmuş ve yüzeye kaplanmıştır.

3.3. Sıcaklık-Duyarlı Yüzeylerin Modifikasyonu

Çalışmada kullanılan NIPAAm-NtBAm kopolimeri kullanılarak hazırlanmış sıcaklık-duyarlı yüzeyler, hücre adhezyon destekleyicisi olarak kollajen kaplanarak modifiye edilmiştir. Adhezyon destekleyicisi (Rat Tail Collagen Type I) 3mg/L'lik başlangıç konsantrasyonundan PBS içerisinde 200µg/L'ye seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti, sıcaklık-duyarlı kopolimer ile kaplanmış 35mm polistiren kaplara 150 µL olacak biçimde pipetlendikten sonra kaplar laminar akış kabini (Metisafe Type II) 6 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra inkübatörde 37 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.

3.4. Karakterizasyon Çalışmaları

Çalışma da kapsamında hazırlanan sıcaklık-duyarlı yüzeylerin özellikleri aşağıda açıklanan yöntemlerle karakterize edilmiştir.

3.4.1. AFM Analizi

Çalışma kapsamında kullanılan biyomalzemelerin yüzey pürüzlülüğü ve morfolojilerini mikro ve nano boyutta belirlemek amacıyla AFM analizi yapılmıştır. Analizler, SAM:Seramik Araştırma Merkezi (Eskişehir) inde bulunan mikroskop ile

gerçekleştirilmiştir (Nanoscope III, Veeco, A.B.D). Yüzey görüntüleri silikon kantilever kullanılarak “*tapping mode*” koşullarında alınmıştır. Analiz sırasında oda sıcaklığı 23°C ve nem oranı %30’dur. Ölçümler, 1 µm’lik karesel bölgelerde gerçekleştirilmiştir. Herbir yüzey için üç ayrı bölgeden alınan ölçümlerle yüzeylerin ortalama pürüzlülük değerleri (R_a), cihazda bulunan standart yazılım (Digital Instruments, Nanoscope IV) kullanılarak rasgele seçilen 1x1 µm² ‘lik alanlarda hesaplanmıştır.

3.4.2. SEM ile Morfolojik Analiz

Sunulan çalışmada hazırlanan biyomalzemelerin yüzey yapısının karakterizasyonu SEM analizi ile gerçekleştirilmiştir (Zeiss Gemini 1530, Almanya). Örnekler vakum ortamında altın-palladyum ile kaplandıktan sonra yüzeylerin morfolojisi SEM fotoğrafları ile incelenmiştir.

3.5. Hücre Kültür Çalışmaları

Çalışmanın bu bölümünde, sentezlenen sıcaklık-duyarlı biyomalzemeler ile kaplanan yüzeylerin kullanımı sonucu elde edilecek hücre tabakasının üroteliyal greft olarak kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları açıklanmıştır. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan hücre tipi ve özelliklerinin yanısıra Kollajen Tip I yüzey adhezyon destekleyicisi ile modifiye edilen ve modifiye edilmemiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerde hücre gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları ve hücre tabakası oluşumuna değinilmiştir.

3.5.1. Çalışmalarda Kullanılan Hücre Tipi ve Karakterizasyonu

Hücre kültür çalışmaları DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Almanya) hücre bankasından sağlanan g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri ile yürütülmüştür (No: ACC224) -80°C’de soğuk dayanımlı ampuller içerisinde dondurulmuş olarak saklanan hücreler süratli biçimde 37°C’deki su banyosuna alınarak çözülmüş ve santrifüjlendikten (4 dakika, 1000 rpm) sonra besi ortamı içerisine alınıştır. Daha sonra hücreler, kültür kaplarında (Nunc,

Almanya), %10 FBS, %45 HAM's F10 içeren DMEM besi ortamı kullanılarak 37°C 'daki %5 CO₂ içeren inkübatörde (New Brunswick Scientific, ABD) inkübasyona bırakılmıştır. Yüzeyde tek tabaka haline gelen ve logaritmik üreme fazında bulunan aktif hücreler %0.01 tripsin/10mM EDTA çözeltisi kullanılarak tripsinizasyon yöntemi ile yüzeylerden koparılmış ve santrifüjledikten sonra tekrar besi ortamı içeren hücre kültür kaplarına alınarak üremesi devam ettirilmiştir. Hücreler ile yapılan ve steril ortam gerektiren tüm işlemler Laminar Akış Ünitesi'nde (Metisafe, Type II Laminer Akış Kabini, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Hücrelere ait görüntüler invert mikroskop (Leica DMI4000B, Almanya) altında dijital kamera (Leica 475) ile alınmıştır.

Çalışmada kullanılan g/G fare mesane ürotelyal hücre hattının hücre kültürü kaplarındaki üreme davranışları ve hücre canlılığı **hemositometrik sayım**, **mitokondriyal fonksiyonların analizi (MTT deneyleri)** ve **ATP(lusiferin-lusiferaz) analizi ve Alamar Blue deneyi** ile belirlenmiştir.

Hücre yapışmasının incelendiği çalışmalarda, yüzeye yapışan hücre sayısı **hemositometrik sayım** yöntemiyle tayin edilmiştir. Deneyler parafilm ile kaplanmış ve UV ile sterilize edilmiş (30 dakika) 24 gözlü Petri kaplarında (Nunc, Almanya) gerçekleştirilmiştir. 15 dakika süreyle steril DPBS içerisinde bekletilerek yıkanmıştır. Son olarak, hücre süspansiyonunun yüzeylere aktarılmasından önce, sıcaklık-duyarlı yüzey kaplı hücre kültürü kapları 15 dakika süreyle düzenleyici ortamda bekletilmiştir. Üretildikleri hücre kaplarından tripsinizasyon ile ayrılan hücreler, %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 5×10^4 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 1'er ml alınarak steril edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerin bulunduğu Petrilere aktarılmıştır. Yapışma deneyleri 37°C'daki %5 CO₂ içeren etüvde gerçekleştirilmiştir. Yüzeylere yapışan hücre miktarının tayini amacıyla, belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 12, 24 saat) yüzeyler üzerindeki supernatant alınarak hemositometrik yöntemle hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan değer başlangıçtaki hücre sayısından çıkartılarak yüzeye yapışan hücre sayısı tayin edilmiştir. Elde edilen değerler yüzey alanına bölünmüş ve zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

Hücre canlılığı ve miktarı **Alamar Blue** analizi gerçekleştirilerek gerek primer hücreler gerekse elde edilen hücre hatları için belirlenmiştir. Alamar Blue bir redoks indikatörü olan resazurin içeren mavi renkli bir çözeltilidir.. Resazurin normal şartlarda floresans özelliği göstermeyen bir moleküldür. Ancak canlı hücrelerin membranlarından geçerek metabolize edildiğinde resafurin'e dönüşür (Şekil 3.3). Resafurin kırmızı renkte, 540-570nm dalga boyları arası ışıktaki floresans özellik gösteren bir moleküldür. Hücre lizisine gerek duymadığı için canlı kültür ortamlarında hücre viabilitesinin saptanması için kolorimetrik indikatör görevi de görür. g/G fare üroteliyal epitel hücrelerinin primer kültürü ve 8. pasajlamadan elde edilen hücre hattı 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında 4 kuyucuk kontrol, 4 kuyucuk primer kültür, 4 kuyucuk da hücre hattından olmak üzere toplam 12 kuyucuğa, her birine 100µL süspanse hücre çözeltisi, 10'ar µL Alamar Blue çözeltisi eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde 580 nm'deki floresans emisyonları ölçülmüş ve grafiğe geçirilmiştir. Proliferasyonun belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen Alamar Blue deneylerinde belirlenen zamanlarda (24, 48, 72, 96, 120, 144 saat) kültür kaplarındaki hücreler tripsinizasyonla süspanse hale getirilmiş ve 100µL lik hücre süspanسیونları 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına aktarılmış; yukarıda anlatılan protokole göre deney gerçekleştirilmiştir.

Üreyen hücrelerin **mitokondriyal fonksiyonlarının** takibi amacıyla **MTT deneyleri** yapılmıştır. MTT yöntemi ile, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı kolorimetrik olarak tayin edilebilmektedir. Canlı hücrelerin mitokondrileri tetrazolyum bileşenini (3-[4, 5-dimetilthiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür) indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan bu kristaller çözüldüğünde ortaya çıkan mor renkli çözeltinin absorbans değeri belirlenir. Elde edilen bu absorbans değeri üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. MTT deneyleri, Petri kaplarında sabit başlangıç konsantrasyonunda kültürlenmiş hücreler ile gerçekleştirilmiştir. Belirlenen zamanlarda (24, 48, 72, 96, 120, 144 saat) kültür kabındaki besi ortamının yarısı atılarak yerine taze besi ortamı (%10 FBS içeren DMEM, 1.5 ml) ve 300 µl MTT çözeltisi (2.5 mg/ml DPBS) eklenmiştir. Hücreler 37°C 'daki %5 CO₂ içeren etüvde 4 saat süreyle inkübe edildikten sonra üzerlerindeki çözelti uzaklaştırılmıştır. Oluşan formazan kristallerinin çözünmesi için isopropanol:HCl (0.1 N) çözeltisi eklenmiş ve 37°C'da

1 saat süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen çözeltinin 540 nm’de absorbans değeri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

g/G mesane üroteliyal epitel **hücrelerinin metabolik aktivitesi ATP (lusiferin-lusiferaz)** yöntemi kullanılarak da izlenmiştir. Metabolik olarak aktif olan canlı memeli hücrelerinde ATP oluşumu gerçekleşmektedir. Dolayısıyla ortamdaki ATP miktarı canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. Bunun yanısıra, hücre-substrat ve hücre-hücre bağlantısını sağlayan integrinlerin büyük çoğunluğu ATP varlığında form değiştirerek çalışmakta olduklarından hücre ATP miktarının takibi aktif yapışmanın olup olmadığının bir göstergesidir. Biyoluminesans yapabilen bir molekül olan lusiferin, lusiferaz enzimi katalizi ve ATP varlığı ile lusiferil adenilat’a dönüşür, Lusiferil adenilat oksijen varlığında oksilusiferine dönüşerek ışık açığa çıkartır (Şekil 3.4). Luminometre ile 550-660 nm arasında ki ışık emisyonları ölçülerek ortamdaki ATP miktarı isabetli olarak belirlenir. Belirlenen zamanlarda (24, 48, 72, 96, 120, 144 saat) kültür kaplarındaki hücreler tripsinizasyonla süspanse hale getirilmiş ve 100µL lik hücre süspansiyonları 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına aktarılmıştır. Standart olarak 6 kuyucuğa süspanse hücre kültürü eklenmiş, 2 kuyucuğa kontrol amaçlı olarak hücre büyümesi durdurucu olarak sitotoksik etkisi olan 5FU (250 mg/mL dozda) eklenmiştir. 37°C ‘daki %5 CO₂ içeren ortamda 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında kuyucuklara tripsin tamponu içerisinde lusiferaz, lusiferin, MgSO₄, EDTA, DTT and BSA içeren ATP test çözeltisi (FLAAM, Sigma, Almanya) 5 µL olarak eklenmiştir. Lusiferaz enziminin stabilitesinin kontrolü açısından luminometrik ölçüm yapılmadan hemen önce ve yapıldıktan hemen sonra serbest ATP içeren kalibrasyon çözeltisi kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Elde edilen emisyon değerleri zaman karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.5.2. Sıcaklık-duyarlı yüzeyler ile Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışmaları

Bu bölümde, çalışma kapsamında sentezlenen NIPAAm bazlı sıcaklık duyarlı yüzeyler üzerinde g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerinin yapışması ve üremesinin incelendiği çalışmalarla ilgili bilgi verilmiştir.

3.5.2.1. Elektron Demeti Polimerizasyonu ile hazırlanan PIPAAm Yüzeyler ile Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışmaları

Çalışma kapsamında hazırlanan sıcaklık-duyarlı yüzeylerde gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarında, sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerinin yapışması ve üremesi incelenmiştir. Bu çalışmalarda elektron demeti ile hazırlanmış yüzeyler ile Bölüm 3.3.1’de açıklanan yöntemle kollajen ile modifiye edilmiş serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanmış poli(NIPAAm-NtBA) yüzeyler kullanılmıştır.

Hücre yapışmasının incelendiği çalışmalarda, yüzeye yapışan hücre sayısı **hemositometrik sayım** yöntemiyle tayin edilmiştir. Deneyler parafilm ile kaplanmış ve UV ile sterilize edilmiş (30 dakika) 24 gözlü Petri kaplarında (Nunc, Almanya) gerçekleştirilmiştir. 15 dakika süreyle steril DPBS içerisinde bekletilerek yıkanmıştır. Son olarak, hücre süspansiyonunun yüzeylere aktarılmasından önce, sıcaklık-duyarlı yüzey kaplı hücre kültürü kapları 15 dakika süreyle düzenleyici ortamda bekletilmiştir. Üretildikleri hücre kaplarından tripsinizasyon ile ayrılan hücreler, %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 5×10^4 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 1’er ml alınarak sterilize edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerin bulunduğu Petrilere aktarılmıştır. Yapışma deneyleri 37°C’daki %5 CO₂ içeren etüvde gerçekleştirilmiştir. Yüzeylere yapışan hücre miktarının tayini amacıyla, belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 12, 24 saat) yüzeyler üzerindeki supernatant alınarak hemositometrik yöntemle hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan değer başlangıçtaki

hücre sayısından çıkartılarak yüzeye yapışan hücre sayısı tayin edilmiştir. Elde edilen değerler yüzey alanına bölünmüş ve zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerinin üreme davranışının incelendiği çalışmalarda ise, hücre üremesi **hemositometrik sayım, MTT ve ATP deneyleri** ile takip edilmiştir.

%10 FBS, %45 HAM's F10 ve %45 DMEM besi ortamı içerisinde 2×10^4 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanan hücre süspansiyonundan 1'er ml alınarak PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı polimerlerin kaplandığı Petrilere aktarılmıştır. Üreme deneyleri 37°C 'daki %5 CO₂ içeren inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Yürütülen deneylerde belirli zaman aralıklarında (24, 48, 72, 96, 120 saat) ortamdan alınan örnekler üzerinde Bölüm 3.5.1'de detaylı olarak açıklanan floresan propium iodyd, MTT ve ATP yöntemleri uygulanmıştır. 48 saatte bir besi ortamı yenilenmiştir. Her iki yöntemde de elde edilen absorbans değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Hücrelere ait görüntüler invert mikroskop (Leica DMI 4000B, Almanya) altında dijital kamera (Leica 475) ile alınmıştır. MTT yöntemi konsantrasyonu bilinen süspanse hücre çözeltilerine uygulandığında, birim hücre konsantrasyonuna karşılık absorbans değerlerinin elde edildiği bir kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kalibrasyon grafiği kullanılarak yüzeyler üzerinde üreyen hücre sayısı tayin edilmiştir.

3.5.2.2 Serbest Radikal Polimerizasyonu ile Hazırlanan Yüzeylerde Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışmaları

g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerinin serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanmış ve kollajen ile kaplanmış sıcaklık-duyarlı P(NIPAAm-NtBA_m) yüzeylere olan yapışmasının incelendiği çalışmalarda fiziksel olarak kopolimer yüzeye bağlanmış hücre adhezyon promotörü olarak Kollajen Tip I içeren sıcaklık-duyarlı yüzeylere UV sterilizasyonu yapıldıktan sonra %10 FBS, %45 HAM's F10 ve %45 DMEM ortamda 5×10^4 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanan hücre süspansiyonundan 1 ml alınarak yüzeylere aktarılmıştır. Yüzeyler 37°C 'daki %5

CO₂ içeren etüvde 2 saat inkübe edildikten sonra ortamdan alınarak DPBS ile iki kez yıkanmıştır. Yüzeye yapışan hücreler invert mikroskop (Leica DMI4000B, Almanya) altında gözlenmiştir.

Hücre yapışmasının incelendiği çalışmalarda, yüzeye yapışan hücre sayısı **hemositometrik sayım** yöntemiyle tayin edilmiştir. Deneyler parafilm ile kaplanmış ve UV ile sterilize edilmiş (30 dakika) 24 gözlü Petri kaplarında (Nunc, Almanya) gerçekleştirilmiştir. 15 dakika süreyle steril DPBS içerisinde bekletilerek yıkanmıştır. Son olarak, hücre süspansiyonunun yüzeylere aktarılmasından önce, sıcaklık-duyarlı yüzey kaplı hücre kültürü kapları 15 dakika süreyle düzenleyici ortamda bekletilmiştir. Üretildikleri hücre kaplarından tripsinizasyon ile ayrılan hücreler, %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde 5×10^4 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonundan 1'er ml alınarak steril edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerin bulunduğu Petrilere aktarılmıştır. Yapışma deneyleri 37°C'daki %5 CO₂ içeren etüvde gerçekleştirilmiştir. Yüzeylere yapışan hücre miktarının tayini amacıyla, belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 12, 24 saat) yüzeyler üzerindeki supernatant alınarak hemositometrik yöntemle hücre sayımı yapılmıştır. Bulunan değer başlangıçtaki hücre sayısından çıkartılarak yüzeye yapışan hücre sayısı tayin edilmiştir. Elde edilen değerler yüzey alanına bölünmüş ve zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerinin üreme davranışının incelendiği çalışmalarda ise, hücre üremesi **hemositometrik sayım, MTT ve ATP deneyleri** ile takip edilmiştir.

%10 FBS, %45 HAM's F10 ve %45 DMEM besi ortamı içerisinde 2×10^4 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanan hücre süspansiyonundan 1'er ml alınarak PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı polimerlerin kaplandığı petrilere aktarılmıştır. Üreme deneyleri 37°C 'daki %5 CO₂ içeren inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Yürütülen deneylerde belirli zaman aralıklarında (24, 48, 72, 96, 120 saat) ortamdan alınan örnekler üzerinde, MTT ve ATP yöntemleri uygulanmıştır. 48 saatte bir besi ortamı yenilenmiştir. Her iki yöntemde de elde edilen absorbans

değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Hücrelere ait görüntüler invert mikroskop (Leica DMI 4000B, Almanya) altında dijital kamera (Leica 475) ile alınmıştır. MTT yöntemi konsantrasyonu bilinen süspanse hücre çözeltilerine uygulandığında, birim hücre konsantrasyonuna karşılık absorbans değerlerinin elde edildiği bir kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kalibrasyon grafiği kullanılarak yüzeyler üzerinde üreyen hücre sayısı tayin edilmiştir.

3.5.2.3. Sıcaklık-Duyarlı Yüzeylerde Hücre Tabakası Oluşumu ve Hücre Tabakasının Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında Bölüm 3.2.1'de açıklanan yöntemlere göre sentezlenen poliNIPAAm P(N-izopropil akrilamid) ve kollajen ile modifiye edilmiş (N-izopropil akrilamid-N-tert-bütül akrilamid) P(NIPAAm-NtBA) sıcaklık-duyarlı yüzeylerden g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerinin sıcaklık-etkisiyle yüzeyden hücre tabakası halinde geri kazanımları incelenmiştir. Sıcaklık etkisi ile hücre tabakası geri kazanımı makroskopik olarak da incelenmiştir. Canon EOS 1000D kamera ve 50.2 mm makro lens ile 20 dakika boyunca çekilen fotoğraflarla tabaka ayrışması izlenmiştir.

3.5.2.4 Hücre Tabakasının Üroteliyal Greft Olarak Kullanılabilirliğinin Tayini

Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları sonucunda oluşturulan hücre tabakasının makroskopik olarak incelenmesinin yanısıra, üroteliyal greft olarak kullanılabilirliği ve doku olarak farklılaşıp farklılaşmadığının anlaşılması için immunoblotting tekniği uygulanarak üroteliyal dokuya spesifik hücreler arası bağlantı proteinleri olan Claudin 3, Claudin 4 ve Uroplakin 1'in ekspresyonlarına bakılmıştır. İlgili western blot protokolü Ek 4'de ayrıntılı olarak açıklamıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Hücre kültür çalışmalarından elde edilen tüm sonuçlar standart sapma değerleri ile verilmiş ve istatistiksel karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde en düşük $p < 0.01$ olduğu durum istatistiksel olarak önemli olan fark kabul edilmiştir (Özdamar, 2002).

4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI

Bu bölümde üroteliyal hücre tabakası elde edilmesinde kullanılmak üzere tasarlanan polimerik malzemelerin sentezlenmesi, modifikasyonu, yapısal karakterizasyonu, ve *in vitro* ortamda gerçekleştirilen hücre kültürü ile ilgili deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerinde tartışılmıştır. Sonuçlar, elektron demeti polimerizasyonu ve serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanmış sıcaklık-duyarlı yüzeyler ve kollajen ile modifiye edilmiş sıcaklık duyarlı yüzeyler olarak iki ana başlık altında toplanmıştır. Bahsedilen metodlar ile hazırlanmış sıcaklık-duyarlı yüzeylerin sentezi, fiziksel yollarla gerçekleştirilen hücre adhezyon destekleyici modifikasyon işlemi, yüzey özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yönelik olarak AFM, ve SEM ile gerçekleştirilmiş olan karakterizasyon çalışmaları ve sıcaklık-duyarlı yüzey üzerine immobilize olan hücre adhezyon destekleyici molekülün kantitatif tayinine yönelik sonuçlar açıklanmıştır. İkinci başlıkta ise, hazırlanan sıcaklık-duyarlı polimerik malzeme kaplı yüzeylerin üroteliyal greft olarak kullanılmak üzere üroteliyal hücre tabakası oluşumu potansiyelinin araştırılması amacıyla yönelik olarak g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları ve oluşturulan hücre tabakasının doku özelliği gösterip göstermediğine yönelik olarak yapılan CLDN3, CLDN4 ve Uroplakin I ve II antikorları ile yapılan Western Blot analizi ve sonuçları sunulmuştur.

4.1. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Oluşturulması

Sunulan çalışmada sıcaklık-duyarlı yüzeylerde hücre tabakası yaklaşımı ile hücre kültürü ve üroteliyal doku grefti tasarımında kullanılan polimerik malzemenin seçim nedenleri, polimerin sentezlenmesi, elektron demeti polimerizasyonu ile polistiren yüzeylere kaplanması ve karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar aşağıda açıklanmıştır.

4.1.1. Sıcaklık-duyarlı polimerin sentezlenmesi ve yüzeye kaplanması

Sıcaklık-duyarlı polimerler bir ya da daha çok sayıda monomerin polimerizasyon reaksiyonu ile hazırlanırlar. Ana zincirler arasındaki hidrojen bağları veya van der Waals etkileşimleri nedeni ile çözünmezdirler. Çapraz-bağlı formda hidrojel olarak da hazırlanabilen sıcaklık-duyarlı polimerlerin, biyomedikal ve doku mühendisliği uygulamalarında sahip oldukları üstün özellikler nedeni ile kullanım potansiyeli artmıştır (Hoffman, 2002). Hidrojeller arasında özellikle biyobozunur yapıya sahip olanların 3-boyutlu iskelet yapı olarak kullandığı çalışmalarda, hücre dışı matriks yapıya alternatif sağlanmak istenmiştir (Li ve ark., 1999). Bunun yanısıra, son yıllarda hidrojellerin kullanıldığı sistemlerde, doku mühendisliği'ndeki gelişmeler içinde, 3-boyutlu yapıların yerine, sıcaklık-duyarlı hidrojellerin kullanıldığı **hücre-tabaka mühendisliği** ile ilgili dikkat çekici çalışmalar bulunmaktadır. Sıcaklık-duyarlı hidrojeller kullanılarak hücrelerin yüzeye yapışmasının ardından enzimatik yöntemler kullanılmaksızın yüzeyden koparılması sağlanabilmektedir. Hücreler hidrofobik karakterli hücre kültür kaplarına alındıklarında, hücre dışı matriks proteinlerinin yüzeye absorpsiyonu sonucu kültür kaplarının yüzeyine yapışarak ürerler. Üremesini tamamlayan hücrelerin yüzeyden koparılarak tekrar pasajlanması için kullanılan en yaygın yöntem enzimatik yöntemdir. Proteolitik ajanların kullanıldığı bu yöntem, membran reseptörleri ve yapıştırıcı proteinleri olumsuz olarak etkilemekte ve yüzeyden koparılan hücreler zarar görmektedir. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak amacıyla Yamada ve grubu (1990) tarafından sıcaklık-duyarlı hidrojellerin kullanıldığı bir sistem önerilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan ticari Petri kapları elektron ışın demetleri kullanılarak sıcaklık-duyarlı özelliğe sahip poli(N-izopropil akrilamid) (PIPAAm) ile kaplanmıştır. Hücre kültür koşullarında hidrofobik özellik gösteren bu yapı üzerinde, 37°C'de hücre üremesi gerçekleşmiştir. Sıcaklık 32°C'nin altına (LCST=32°C) düşürüldüğünde, yapı tersinir olarak hidrofilik olmakta ve hızlı hidrasyon ve şişme davranışı sonucu hücreler yüzeyden ayrılmaktadır. Enzimatik yöntemle karşılaştırıldığında, yalnızca hücre yapıştırıcı proteinler ile malzeme yüzeyi arasındaki etkileşim bozulmuş ve yüzeyden ayrılan hücrelerin membran proteinleri zarar görmemiştir. 1990 yılındaki bu çalışmadan sonra, Shimizu ve Okano tarafından (2003) yapılan araştırmalarda sıcaklık-duyarlı hidrojeller kullanılarak, hücrelerin üremiş oldukları yüzeyden 2-

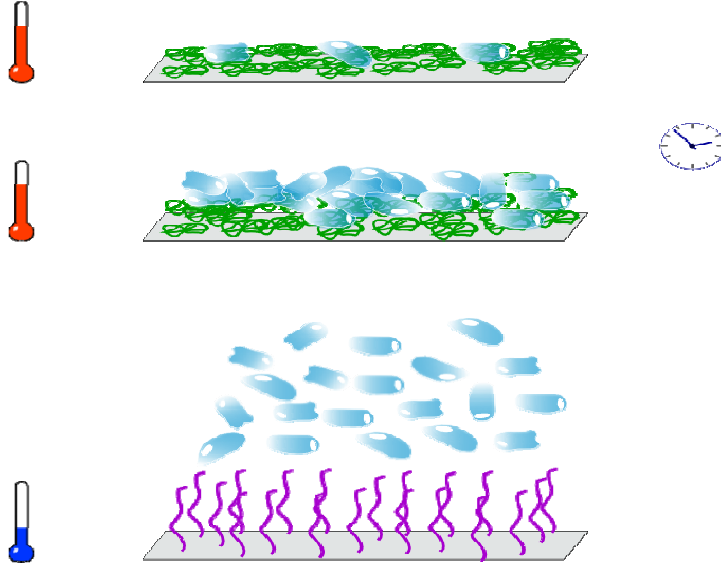
boyutlu tabakalar halinde ayrılabilceği fikri ortaya atılmıştır. Enzimatik yöntemler kullanıldığında yüzeyden koparılma sırasında kaybolan hücre-hücre birleşmesi, sıcaklık etkisiyle yüzeyden ayrılma sırasında zarar görmemekte ve böylelikle hücreler teker teker değil, bir tabaka halinde yüzeyden ayrılabilmektedir (şekil 2.7). Kalp kası dokusu ile ilgili yapılan başarılı bir çalışmada neonatal sıçan kardiyomiyosit hücreleri PIPAAm yüzey üzerinde üretildikten sonra sıcaklık etkisi uygulanmış ve tabaka halinde yüzeyden ayrılmıştır. Elde edilen bu hücre tabakalarının senkronize ritmik atım karakterine sahip olduğu saptanmıştır (Shimizu ve ark., 2003).

Doku mühendisliği uygulamaları için sıcaklık-duyarlı hidrojeller genel olarak yüzeylere hücre adhezyonu ve ayrılmasını sıcaklık değişimlerine bağlı olarak kontrol etmek üzere kullanılmaktadırlar. Doğal koşullarda, pek çok memeli hücresi süspanse olarak değil, ECM (Ekstra Selüler Matriks) üzerine immobilize olmuş biçimde bulunurlar. Buna ek olarak, yine hücrelerin çoğunluğunun normal fonksiyon gösterebilmesi katı substratlara tutundukları zaman mümkün olabilmektedir.

Konvansiyonel hücre kùltüründe, polistiren hücre kùltürü kaplarında hücreler tutundukları yüzeyden tripsin enziminin proteolitik aktivitesi ile ECM'in parçalanması ve EDTA (etilendiamin tetraasetikasit) ile Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının kalasyonu ile tutundukları yüzeyden ayrılırlar. Ancak, seçici olmayan proteolitik aktivite sonucunda hücre membran proteinleri de zarar görebilmektedir. Bunun yanısıra, doku benzeri bir yayılma göstermiş bir hücre tabakasının bozulması doku mühendisliğinin amacı açısından istenmeyen bir durumdur.

Sıcaklık-duyarlı polimerler ile kaplanmış yüzeylerde gerçekleştirilmiş hücre kùltürü çalışmalarına bakıldığında PNIPAAm (poli-n-izopropilakrilamid)'in en sık kullanılan malzeme olduğu gör÷lmektedir. Sıcaklığa bağlı değişkenliği ile ilgili ilk çalışma 1967'de yapılmıştır (Scarpa ve ark.). Sıvı ortamlarda izole edilmiş PNIPAAm zincirlerinin LCST üzeri sıcaklıklarda konformasyonel dönüşüm geçirerek dışarı

uzamış sarmal formdan globüler büzüşmüş forma dönüştükleri gözlenmiştir (Fujishige ve ark, 1989). Bunun anlamı, PNIPAAm LCST üzerinde ki sıcaklıklarda hidrofobik özellik taşıırken, LCST altında ki sıcaklıklarda zincir gruplarının hidrate olması ile hidrofilik hale gelmesidir(Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde sıcaklık değişimine bağlı polimer zincir yapısındaki değişimler buna bağlı olarak değişen yüzey hidrofilisitesi

Sıcaklık-duyarlı PNIPAAm'ın polistiren yüzeylere kaplanarak bitişik hücre tabakası elde edilebileceğini gösteren ilk çalışma, Takezawa ve ark. Tarafından 1990 yılında yapılmıştır. Çalışmada PS kaplara sıcaklık-duyarlı PNIPAAm ve kollajen karışımı kaplanmış ve fibroblast hücre tabakası elde edilmiştir.

Aynı yılda yapılan bir başka çalışmada ise Yamada ve ark., enzimatik hücre hasadına karşı son derece duyarlı olan hepatosit hücrelerini PNIPAAm ile kaplanmış sıcaklık-duyarlı polisitren yüzeylerden başarıyla hasat etmişlerdir.

Günümüze kadar, bu ve benzeri pek çok çalışmada PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı polimerlerin hücre tabakası oluşumunda başarıyla kullanıldığı görülmektedir. Yakın zamanda PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı polimer kaplı hücre kültür kapları ticari olarak da piyasaya sürülmüştür (UpCell™ Nunc, ThermoScientific).

Sunulan çalışmada PNIPAAm bazlı polimerler; özellikleri ve yapılan çalışmalar göz önüne alınarak hücre tabakası yaklaşımı ile ürtoteliyal hücre kültürü için en uygun malzeme olarak seçilmiştir. Çalışmada sıcaklık-duyarlı polimerin sentezi ve yüzeye immobilizasyonu için iki farklı yöntem kullanılmıştır.

Kullanılan ilk yöntem, hücre tabakası elde edilmesi için sıcaklık-duyarlı yüzey oluşturulmasında en sık kullanılmış metod olan elektron demeti polimerizasyonudur. Radyasyonla indüklenmiş polimerizasyon biyomateryallerin yüzey modifikasyonunda sıklıkla kullanılmış bir yaklaşımdır (Stannett, 1990). Radyasyonla indüklenmiş polimerizasyon metodları arasında UV radyasyonu, elektron demeti, plazma aktivasyonu ve plazma polimerizasyonu sayılabilir.

Hücre tabakası eldesi için sıcaklık-duyarlı PNIPAAm kaplanmış PS yüzeylerin eldesi, kütlece%40'lık izopropil alkol'de çözülmüş NIPAAm monomer çözeltisi 35 mm'lik polistiren hücre kültürü kaplarına aktarılmış ve 0.17 ml'lik miktarlarda aktarılmış ve 0.25 MGy elektron demeti radyasyonuna maruz bırakılmıştır.(Okano ve ark. 1990).

Ancak sunulan çalışmada da aynen izlenen bu yöntemle hazırlanan sıcaklık-duyarlı yüzeylere hücre yapışması gerçekleşmemiştir. Sıcaklık-duyarlı PNIPAAm yüzeylerde hücre tutunmasının 1.4-2.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 'lik aşılama yoğunluklarında, yani 30 nm ve altında olan kalınlıklarda gerçekleştiği bilinmektedir (da Silva ve ark, 2007).

AFM yüzey karakterizasyonu sonucunda yüzeye polimer kaplamasının yok denecek kadar az olduğu gözlemlenmiştir. PNIPAAm kaplamasının başarısız olması elektron demeti uygulamasında sorun olduğunu düşündürmektedir.

Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin hazırlanmasında kullanılan ikinci yöntem serbest radikal polimerizasyonu'dur. Uygulanan metod çerçevesinde literatür verilerine

uygun olarak Molar yüzdesi %85 NIPAAm ve %15 NtBAm olacak biçimde monomerler %10 AIBN içeren benzen çözeltisi içerisine eklenmiş ve argon gazı varlığında reaktör içerisinde 60°C sıcaklıkta 120 rpm karışma hızında 24 saat boyunca polimerizasyon yapılmıştır (Rochev ve ark, 2004). Elde edilen kopolimer karışımı hekzan içerisinde çöktürüldükten sonra 45 °C'de vakum etüvünde kurutulmuştur. Elde edilen kopolimer etanol içerisinde çözülerek 35 mm'lik polistiren petri kaplarına her birine 120 µL olacak biçimde aktarılmış ve ağızları kapatılarak 18 saat boyunca vakum etüvünde kurutulmuştur.

Hücre adhezyon destekleyici moleküller ile sıcaklık-duyarlı polimer kaplanmış yüzeylerin modifikasyonu PNIPAAm bazlı polimerin aşılama yoğunluğundan bağımsız olarak yüzeye hücre tutunmasını sağlayabilmektedir (Moran ve ark, 2007). Sunulan çalışmada yüzey sıcaklık-duyarlı yüzey modifikasyonu Kollajen Tip I'in PBS içerisinde çözülerek NIPAAm-NtBAm kopolimeri ile kaplanmış yüzeylere aşılama ile sağlanmıştır. Aşılamanın yapıldığı kaplar laminar akış kabiniinde 6 saat boyunca bekletilmiş, sonrasında HBSS ile yıkanarak 37°C'de inkübatörde bekletilmiştir.

4.1.2. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerin Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında hazırlanan PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeylerin yüzey özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, şişme deneyleri, AFM ve SEM çalışmaları yapılmıştır.

4.1.2.1. AFM Analizi

Çalışma kapsamında hazırlanan yüzeylerin mikro ve nano boyutta morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla AFM analizi gerçekleştirilmiştir. AFM analizleri için polistiren lameller üzerine kaplanan yüzeyler kullanılmıştır. Analizler Bölüm 3.4.3'de açıklanan şekilde yapılmıştır. 5 µm, 1µm ve 500 nm'lik karesel bölgelerde gerçekleştirilen ölçümlerden rasgele seçilen 1x1 µm²'lik alanlarda yüzeylerin

ortalama pürüzlülük değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler Çizelge 4.5’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.1. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin 1x1 µm²’lik alanlarda hesaplanan R_{ms} ve R_a değerleri.

Yüzeyler	R _{ms} (nm)	R _a (nm)
PS	1.159±1.10	3.277±0.83
P(NIPAAm-NtBA _m)	0.416±0.44	1.93±0.38
Kollajen kaplı kopolimer	2.058±0.15	1.67±0.19

Çizelge 4.1’de R_{ms} olarak ifade edilen yüzey pürüzlülük parametresi AFM görüntüsünden elde edilen yükseklik değerlerinin (z) standart sapmasını göstermektedir ve Eşitlik 4.1. ile ifade edilmektedir. Görüntüdeki en alçak noktanın z değeri sıfır olarak alınır. Noktaların ortalama yüksekliği sıfır noktası referans alınarak hesaplanır.

$$R_{ms} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^{n=N} (z_n - \bar{z})^2} \quad (4.1)$$

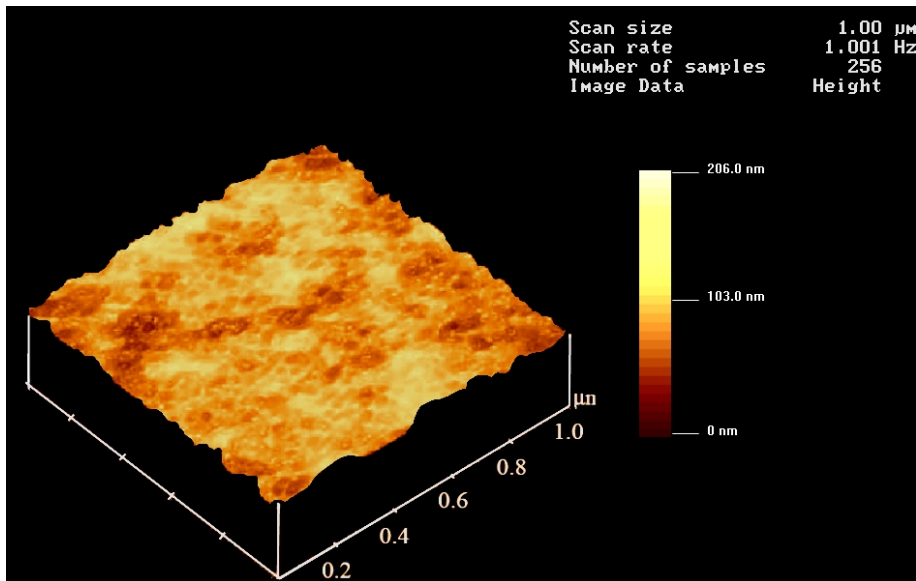
Burada; N yükseklik ölçümünün alındığı nokta sayısını göstermektedir. Ortalama yükseklik ise Eşitlik 4.2 ile ifade edilmektedir.

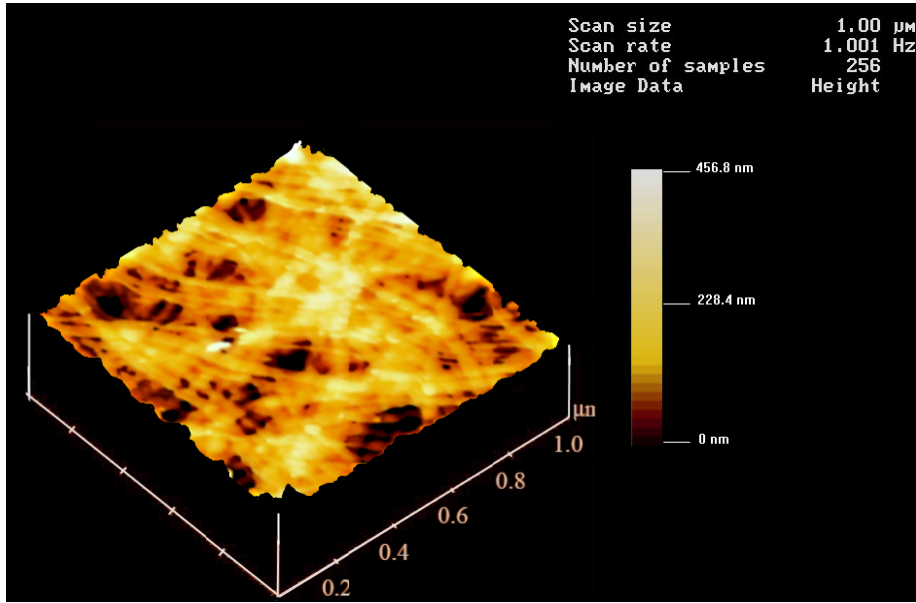
$$\bar{z} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^{n=N} z_n \quad (4.2)$$

R_a ile ifade edilen parametre ise yüzey üzerinde bulunan topografideki en yüksek ve alçak noktalar arasındaki ortalama mesafeyi ifade etmektedir (Eşitlik 4.3).

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^{n=N} |z_n - \bar{z}| \quad (4.3)$$

Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin modifikasyon öncesi ve sonrasında $1\mu\text{m}$ 'lik karesel bölgelerden alınan AFM görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir.





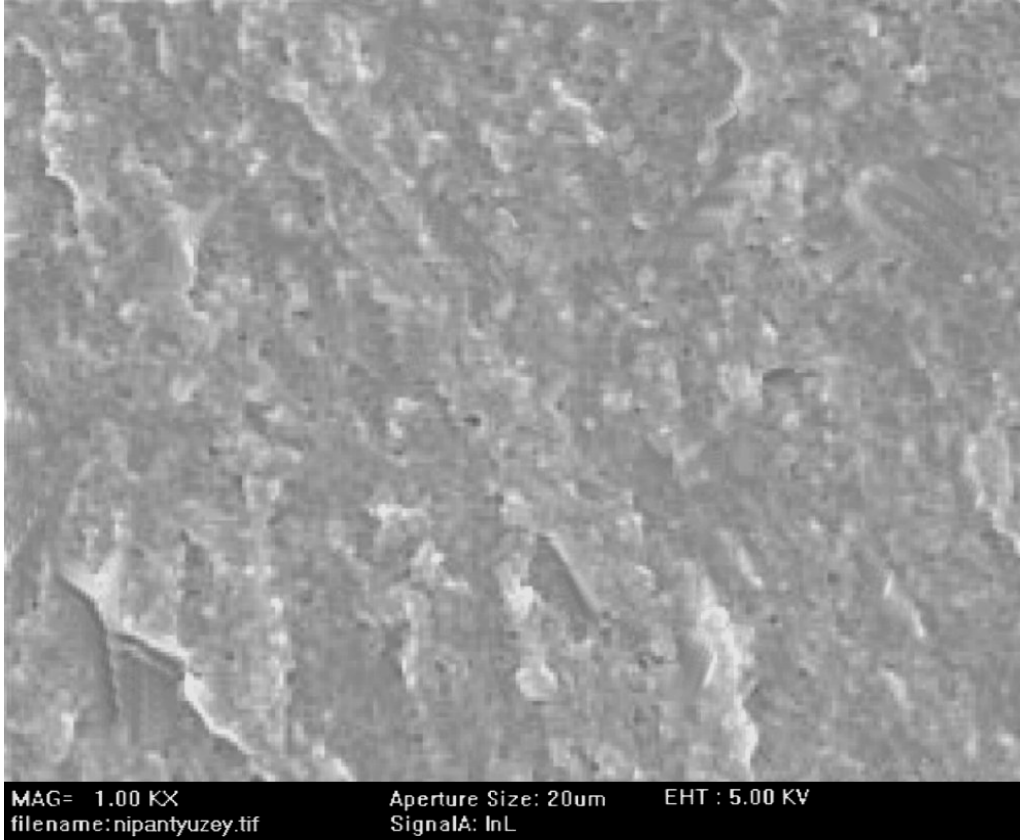
Şekil 4.2. P(NIPAAm-NtBAm) aşılantısı sıcaklık-duyarlı yüzey ve Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık duyarlı-yüzeylerin $1\mu\text{x}1\mu$ karesel alan AFM görüntüleri

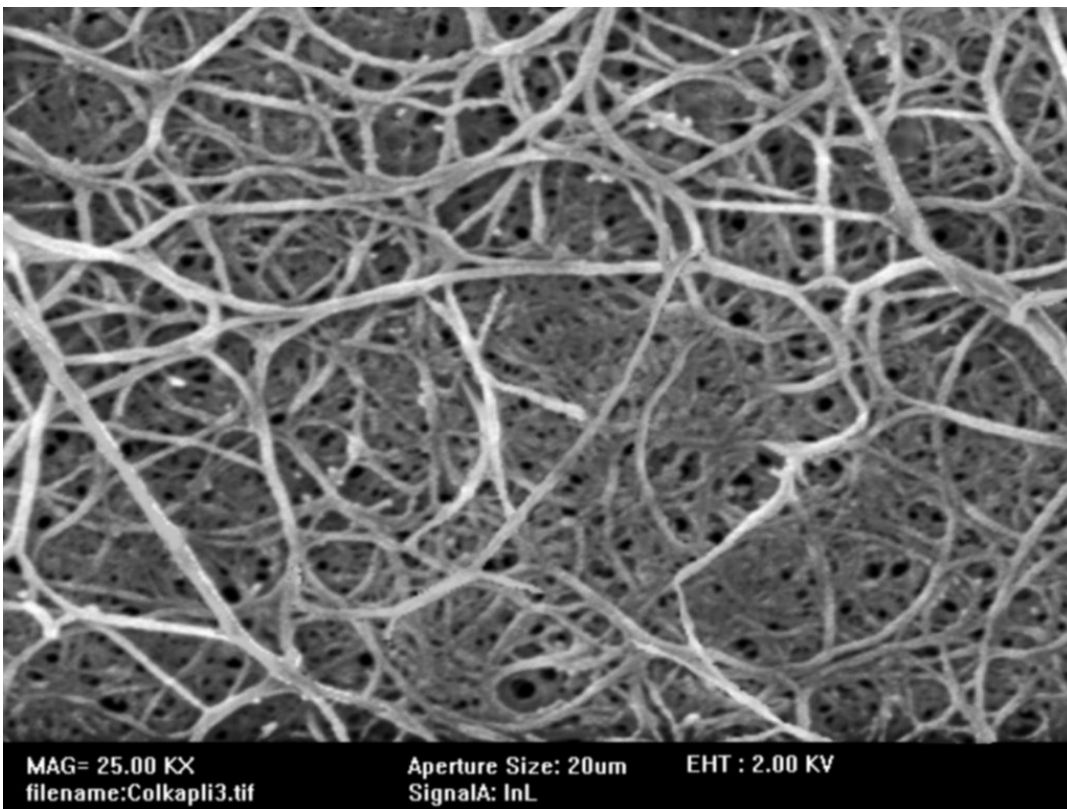
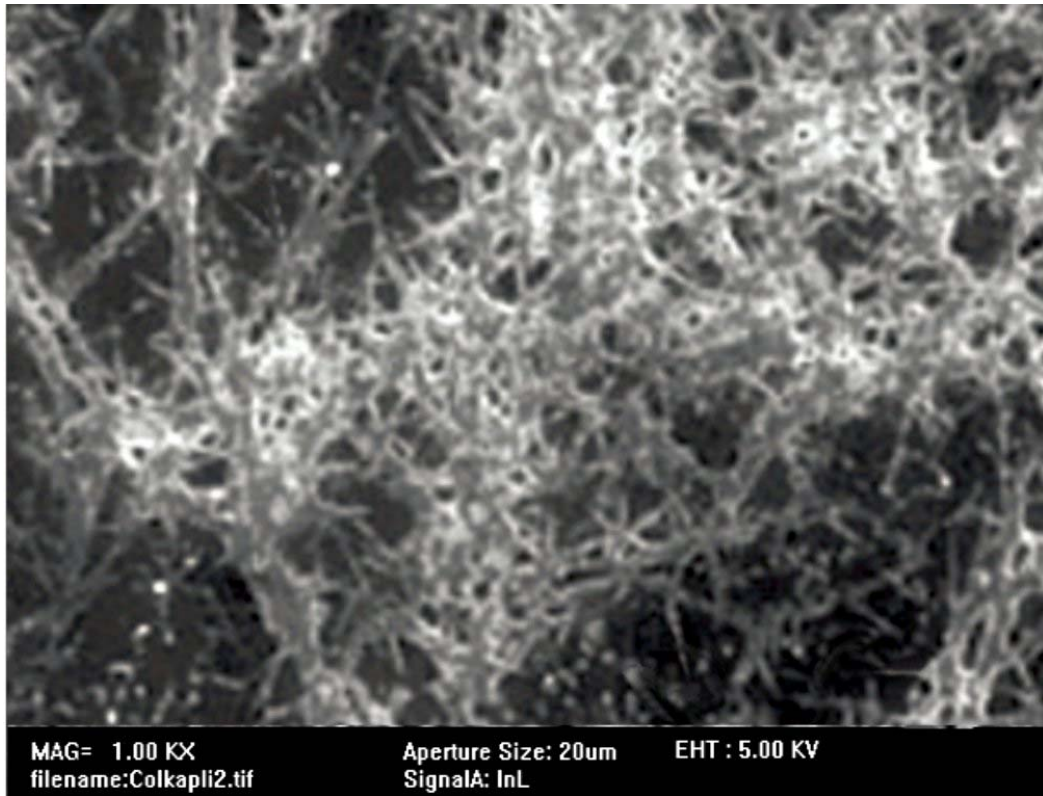
Modifiye edilmemiş P(NIPAAm-NtBAm) yüzeylerin topografisi, nanometrik boyutlarda, 206.0 ± 2 nm yüksekliğinde ve 40-50 nm çapındaki yapılar ile karakterize edilmektedir. Kollajen ile modifikasyon sonrasında yüzey kalınlığı maksimum 456.8 nm, ortalama 298 ± 3 nm olarak ölçülmüştür. Yapı üzerinde kollajen fibrilleri gözlenmekle birlikte, modifiye edilmemiş sıcaklık duyarlı yüzeydeki karakteristik yapıların immobilizasyon sonrası kaplanması sonucu yüzey pürüzlülük değerleri azalmıştır. Kollajen ile modifiye edilen yüzeyler incelendiğinde ise yüzey pürüzlülüğünün daha da azaldığı ve nanometrik boyuttaki kollajen fibrillerinin yüzeyi homojen olmayan, randomize bir biçimde kapladığı görülmüştür.

AFM analizi biyosinyal moleküllerin yüzeylere immobilizasyonu ya da adsorpsiyonunun ardından yüzey pürüzlülüğündeki değişimleri karakterize etmek için kullanılan bir tekniktir. Moran ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada (2004), sıcaklık-duyarlı poly(NIPA-NtBA) yüzeyler üzerine fiziksel olarak kollajen ve PLL(poli-L-lizin) molekülleri immobilize edilmiştir. Çalışmada elde edilen yüzeyler üzerinde yapılan AFM analizinde modifikasyon sonrasında sonrası yüzey pürüzlülüğünün azaldığı görülmüştür.

4.1.2.3. SEM Analizi

Çalışma kapsamında hazırlanan PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeylerin biyomodifikasyon öncesinde yüzey ve kesit morfolojik yapıları Bölüm 3.4.4'de açıklanan yöntemle uygun olarak SEM ile incelenmiştir. Şekil 4.3'de kollajen kaplı P(NIPAAm-NtBA) yüzeyine ait SEM fotoğraflarına yer verilmiştir.





Şekil 4.3. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin SEM görüntüleri.

Şekillerde de görüldüğü üzere polimer yüzeyi Kollajen lifleri ile kaplanmıştır. Yüksek magnifikasyonda bakıldığında 3-4 tabaka halinde kollajen lifleri görülmektedir.

4.2. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerden Üroteliyal Hücre Tabakası Elde Edilmesi

Bu bölümde çalışma kapsamında hazırlanan sıcaklık-duyarlı polimerik malzeme kaplı yüzeylerin üroteliyal greft olarak kullanılmak üzere üroteliyal hücre tabakası oluşumu potansiyelinin araştırılması amacıyla yönelik olarak g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültür çalışmaları ve oluşturulan hücre tabakasının doku özelliği gösterip göstermediğine yönelik olarak yapılan CLDN3, CLDN4 ve Uroplakin I ve Uroplakin II antikoru ile yapılan Western Blot analizi ve sonuçları sunulmuştur. Uygulanan protokol Ek'de sunulmuştur.

4.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

g/G fare üroteliyal epitel hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda, öncelikle kullanılan hücre hattının karakterizasyonu yapılmış, daha sonra sıcaklık-duyarlı yüzeylere olan hücre yapışması ve hücre üremesi incelenmiştir. Hücre kültür çalışmalarına ilişkin sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

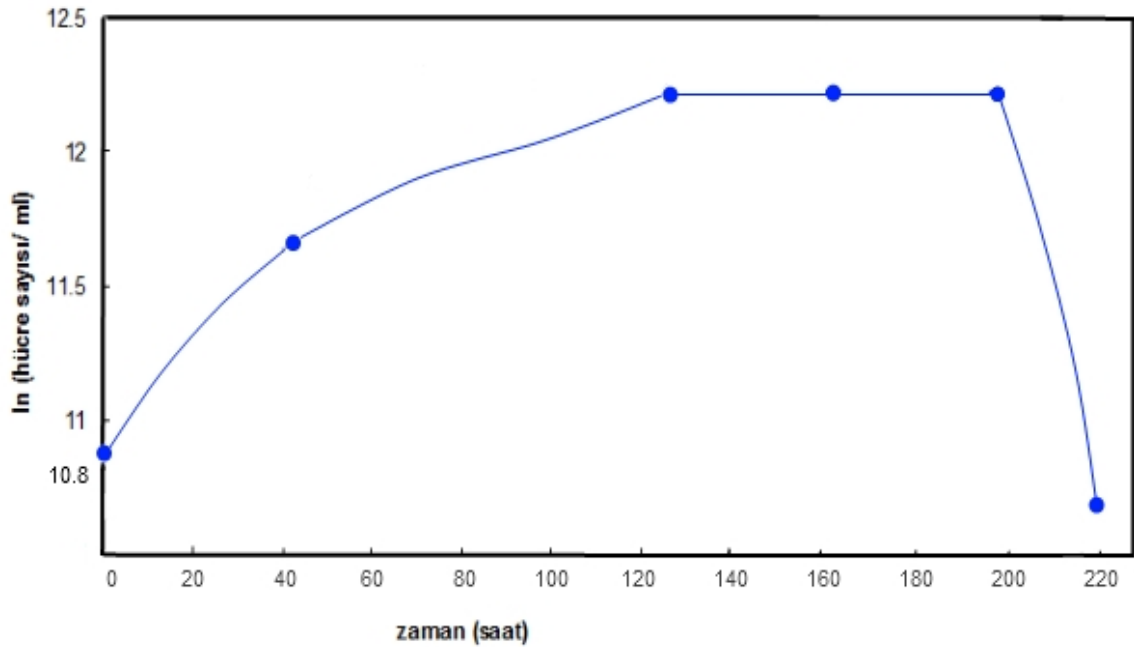
4.2.1.2 g/G Fare Mesane Üroteliyal Epitel Hücrelerinin Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan g/G fare üroteliyal epitel hücrelerinin hücre kültürü kaplarındaki üreme davranışı Bölüm 3.5.1'de açıklanan yöntemlerle karakterize edilmiştir. Hemositometrik yöntemle hücre sayımı çalışmalarından elde edilen veriler kullanılarak hücrenin özgül üreme hızı ve ikilenme süresi hesaplanmıştır. Şekil 4.4'de g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri için üreme eğrisi sunulmaktadır. Gecikme fazının gözlenmediği üreme sürecinde, üstel üremenin

123. saate kadar devam ettiği, 123. saatten sonra hücre üremesinin durgun faza geçtiği görölmüştür. Durgun faza geçişin kontakt inhibisyon sonucu olduğu gözlemlenmiştir. İmmortalize bir hücre hattı olan g/G mesane üroteliyal hücrelerinin üremesi 200. saate kadar takip edilmiş, durgun üreme fazının sürdüğu belirlendikten sonra aşırı doz 5FU verilerek kültür sonlandırılmıştır. Aşağıda üreme eğrisi kullanılarak hesaplanan özgül üreme hızı ve ikilenme süresi verilmiştir. Yapılan hesaplamalar Ek 2’ de sunulmuştur.

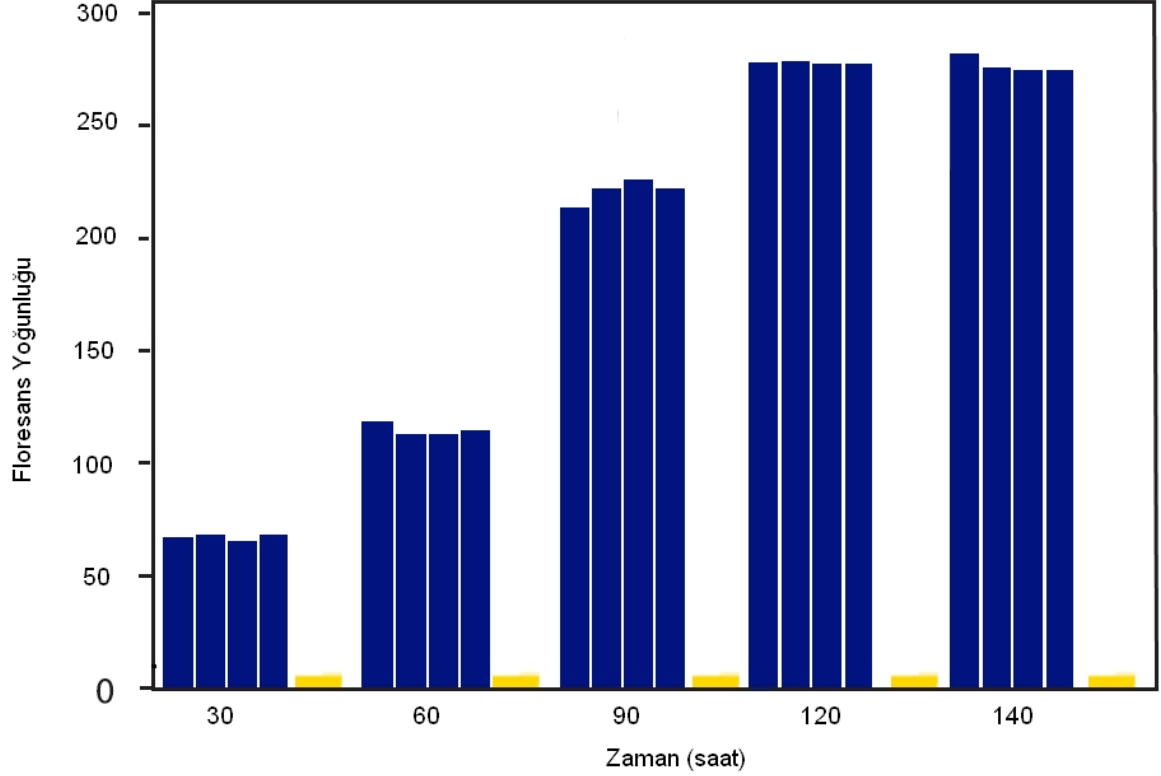
Çizelge 4.2. g/G mesane üroteliyal epitel hücrelerine ait özgül üreme hızı ve ikilenme süresi değerleri.

Hücre tipi	Özgöl üreme hızı, μ (saat ⁻¹)	Hücre ikilenme süresi, t_d (saat)
g/G fare mesane üroteliyal	0.017	41



Şekil 4.4. g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri için üreme eğrisi (Başlangıç hücre konsantrasyonu: 5×10^4 hücre/ml'dir).

Şekil 4.5’de g/G fare üroteliyal epitel hücrelerinin Petri kabındaki üreme davranışını incelemek üzere Bölüm 3.6.1’de açıklanan Alamar Blue metodu ile yapılan analizden elde edilen grafik sunulmuştur.

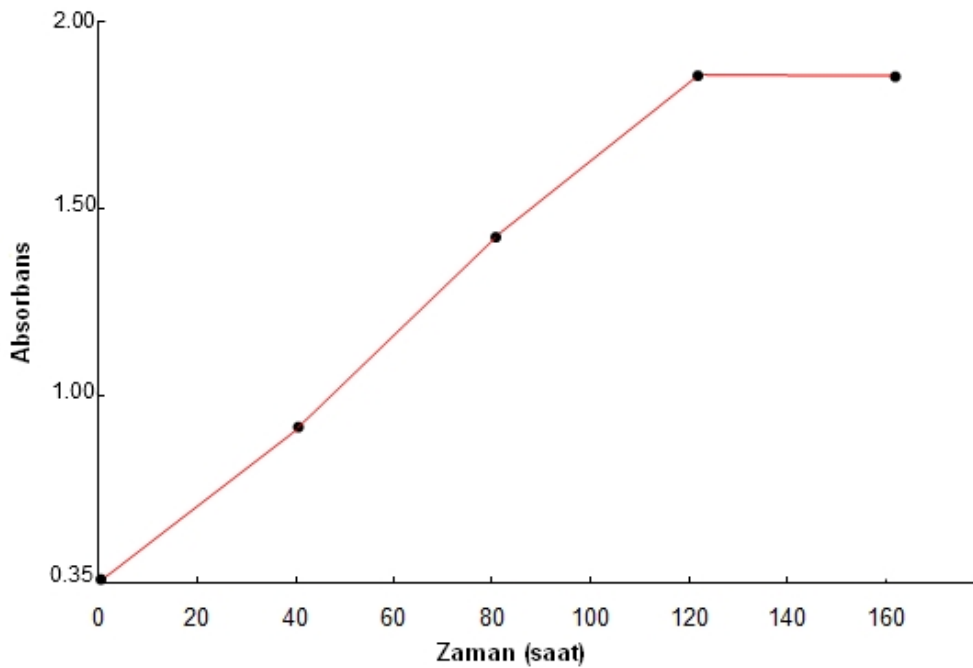


Şekil 4.5. g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri için yapılan Alamar Blue testi. Mavi sütunların her biri bir hücre içeren kuyucuk iken, sarı sütunlar hücre içermeyen kontrol çözeltisidir.

Görüldüğü üzere, 30, 60, 90, 120 ve 140. saatlerde alınan örneklerden elde edilen floresans yoğunlukları hemositometrik sayım sonuçları ile paralellik göstermektedir. 140. Saatte alınan hücrelerin 4 saatlik inkübasyonu sonucunda hücre kültürünün durağan faza geçtiği görülmüştür.

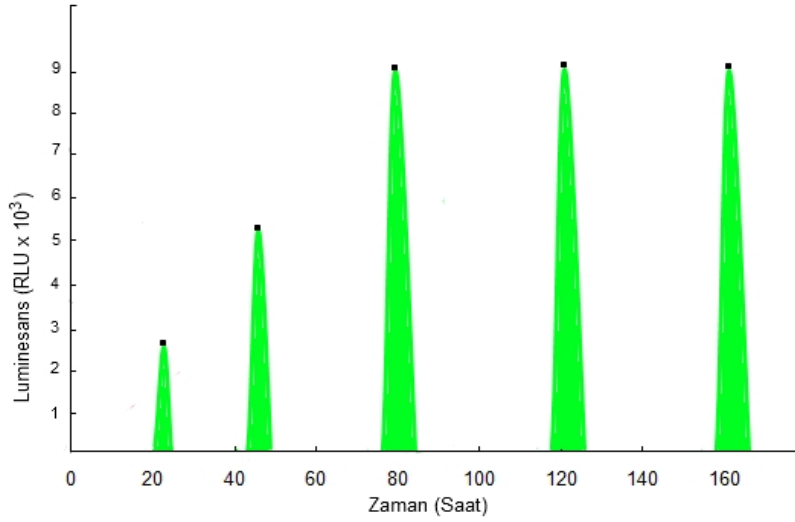
g/G mesane üroteliyal epitel hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonlarının takibi amacıyla yapılan MTT deneyleri Bölüm 3.6.1’de açıklanan şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6’da sunulmuştur.

MTT yöntemi, üreme fonksiyonu gösteren hücre miktarının tayininde kullanılan bir yöntemdir. Aşağıdaki şekilde de açıkça görüleceği gibi, 123. saate kadar g/G mesane ürotelyal epitel hücrelerinin üremelerinin devam ettiği ve hücrelerin mitokondriyal aktivitelerini sürdürdükleri bulunmuştur. 123. saatten itibaren hücreler durağan faza geçmişlerdir.



Şekil 4.6.g/G fare mesane ürotelyal epitel hücreleri için üreme eğrisi (Başlangıç hücre konsantrasyonu: 5×10^4 hücre/ml'dir).

g/G fare mesane ürotelyal hücrelerinin hücre içi metabolik aktivitesinin ölçümü için ATP testi gerçekleştirilmiştir. 562 nm'deki biyoluminesans emisyonunun yoğunluğu RLU (Relative Light Intensity) cinsinden ölçülmüştür (Şekil 4.7). Ancak 82. Saat sonrası artan hücre yoğunluğundan ötürü emisyon eşik limitini aştığından ötürü ölçüm yapılmasına imkan vermemiştir.



Şekil 4.7. g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerinin zamana bağlı sitozolik ATP miktarları

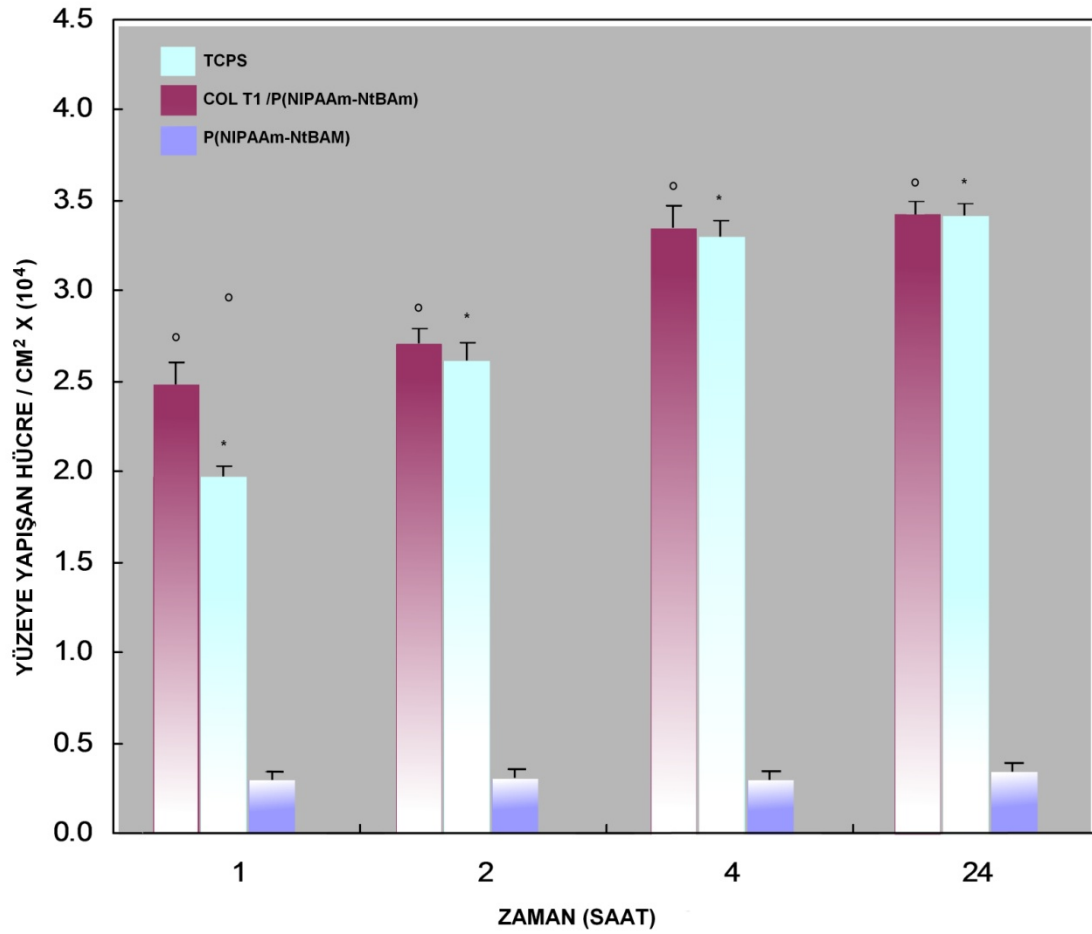
4.2.1.3. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerde Gerçekleştirilen Hücre Kültür Çalışmaları

Sunulan çalışmada hazırlanan PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeyler ve P(NIPAAm-NtBA_m) kopolimerinin kapandığı polistiren yüzey üzerinde hücre yapışmasını arttırmak amacıyla fiziksel olarak immobilize edilmiş Kollajen Tip I yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal hücreleri kullanılarak hücre proliferasyonu, hücre yapışması ve hücre tabakası biçiminde ayrılması araştırılmıştır. Standart TCPS (Tissue Culture Polystyrene), P(NIPAAm-NTBA_m) kaplanmış yüzey ve Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş P(NIPAAm-NTBA_m) yüzeylerdeki çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

Bölüm 3.6.2.1’de açıklanan yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, hemositometrik sayım yöntemi ile TCPS (Tissue Culture Polystyrene), P(NIPAAm-NTBA_m) kaplanmış yüzey ve Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş P(NIPAAm-NTBA_m) yüzeylerde birim yüzey alanına yapışan hücre sayısı tayin edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.8’de verilmiştir. Tüm yüzeyler üzerinde hücre yapışmasının zamanla artışı gözlenmiştir. Sadece kopolimer kaplı polistiren yüzeylere hücre yapışması minimum olarak gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, 2 saatlik kültür sonunda Kollajen Tip I immobilize edilmiş yüzeylerde hücre yapışmasının modifiye edilmemiş yüzeylere oranla %100 daha fazla olduğu bulunmuştur. 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda kollajen ile

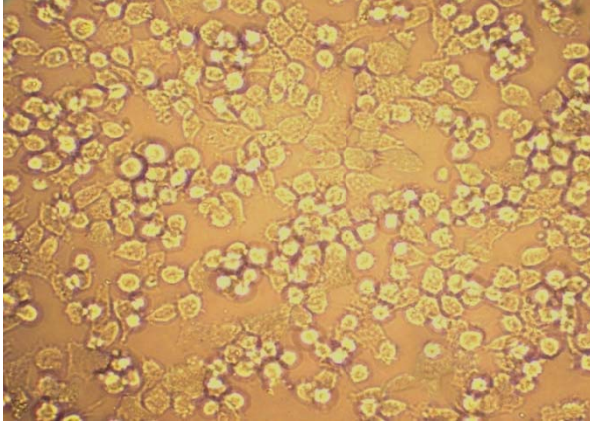
modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeye yapışan hücre sayısının, standart TCPS yüzeye yapışan hücre sayısına oldukça yakın bir değere ulaştığı gözlemlenmiştir, değerler arasında istatistiksel fark mevcuttur. 24. saat sonunda Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı P(NIPAAm-NTBA) yüzeye hücre yapışması %100 olarak bulunmuş, bu değer modifiye edilmemiş P(NIPAAm-NTBA) yüzeyde %0 oranında olduğu saptanmıştır. Hemositometrik hücre sayımı ile yüzeye yapışan hücre sayısından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerin hücre yapışmasına olan pozitif etkisi rahatlıkla görülebilmektedir.

Hücre yapışması değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Bölüm 3.6.3'de belirtilen biçimde gerçekleştirilmiş ve standart TCPS yüzeyleri kontrol grubu olarak alınmıştır.

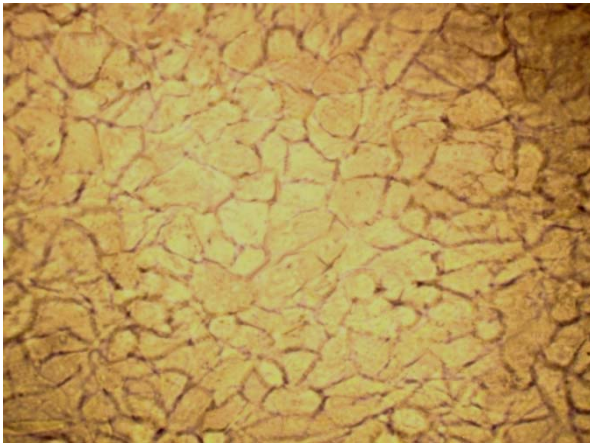


Şekil 4.8. TCPS, P(NIPAAm-NtBAm) ve Kollajen Tip I ile modifiye edilen P(NIPAAm-NtBAm) kaplı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal epitel hücrelerin yapışma davranışı. Başlangıç hücre konsantrasyonu: 5×10^4 hücre/ml'dir. [*p<0.01 , o p<0.01]

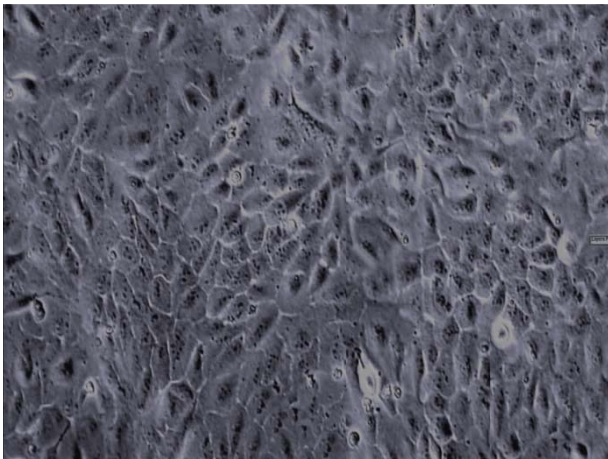
Mikroskopik olarak invert ve faz kontrast modda hücre yüzey morfolojilerine bakıldığı zaman, santimetre kare başına yapışan hücre sayılarını destekler nitelikte görüntüler elde edilmiştir. 2. Saat ve 24. saatte alınan görüntülerde sadece sıcaklık-duyarlı polimer kaplı yüzey ile Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş yüzeylere hücre yapışmasındaki fark açıkça görülebilmektedir (Şekil: 4.9)



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.9. TCPS,P(NIPAAm-NtBAm) ve Kollajen Tip I ile modifiye edilen P(NIPAAm-NtBAm) kaplı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal epitel hücreleri; a) 2. Saatte yapışmaya başlayan hücreler (x20) b) 24. Saatten oluşan hücre

tabakası (x20) c) 24 saat sonunda oluşan tabakanın faz kontrast mikroskopisi (x20)

Şekil 4.9'da 2.saat sonunda yüzeylere yapışan hücreler incelendiğinde, Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş olan yüzeye yapışmış olan hücrelerin (Şekil 4.9 b) yayılmaya başlayarak tipik epitel morfolojisine geçmeye başladıkları açıkça görülmektedir. Bununla birlikte modifiye edilmemiş sıcaklık-duyarlı yüzeye tutunan hücrelerin süspanse halde bulunmaya devam edip yuvarlak şekillerini koruduğu ve hücre yayılmasının başlamadığı saptanmıştır (Şekil 4.9 a). Yüzeye tutunan hücrelerin morfolojik yapılarındaki bu açık farklılık yüzeyde bulunan kollajen fibrillerinin hücre tutunmasına olan pozitif etkisinden kaynaklanmaktadır. 24. saat sonunda alınan fotoğraflarda tipik parke taşı benzeri üroteliyal geçişken epitel morfolojisi Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerde (Şekil 4.9 d), modifiye edilmemiş P(NIPAAm-NtBAM) kaplı sıcaklık-duyarlı yüzeyler ile kıyaslandığında belirgin olarak izlenmektedir.

Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş yüzeylerde, modifiye edilmemiş sıcaklık-duyarlı yüzeylere oranla hücre yapışmasında ciddi bir fark olduğu saptanmıştır. Standart TCPS yüzeye yapışma ile karşılaştırıldığında hücre yapışması açısından ortaya çıkan farkın minimum olduğu tespit edilmiştir. Ancak ATP testi sonuçlarına bakıldığında, hücre metabolizmasına bağlı ATP sentezinin Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeyde daha fazla olduğu görülmüştür.

Literatür verilerine göre çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Akiyama ve ark. tarafından yapılan çalışmada hücrelerin 15-20 nm kalınlıkta gerçekleştirilen NIPAAm bazlı yüzeylere yapışıp üreyebildikleri, 30 nm ve üzeri kalınlıklarda hücre adhezyonunun olmadığı ortaya konulmuştur. 2004 yılında yapılan çalışmada ise Hep2 epitel hücrelerinin PNIPAA kaplanmış yüzeylere yapışamadıkları, P(NIPAAm-NtBAM) kaplanmış sıcaklık-duyarlı yüzeylerde ise hücre yapışmasının standart TCPS'e göre çok düşük kaldığı tespit edilmiştir (Rochev ve ark). Aynı çalışmada denenen bir diğer hücre tipi olan L929 fibroblastlarında ise sıcaklık-duyarlı yüzeye yapışan hücre miktarlarının epitel hücrelerine göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Sunulan çalışmada kullanılan g/G fare mesane üroteliyal hücreleri epitel kökenli hücrelerdir.

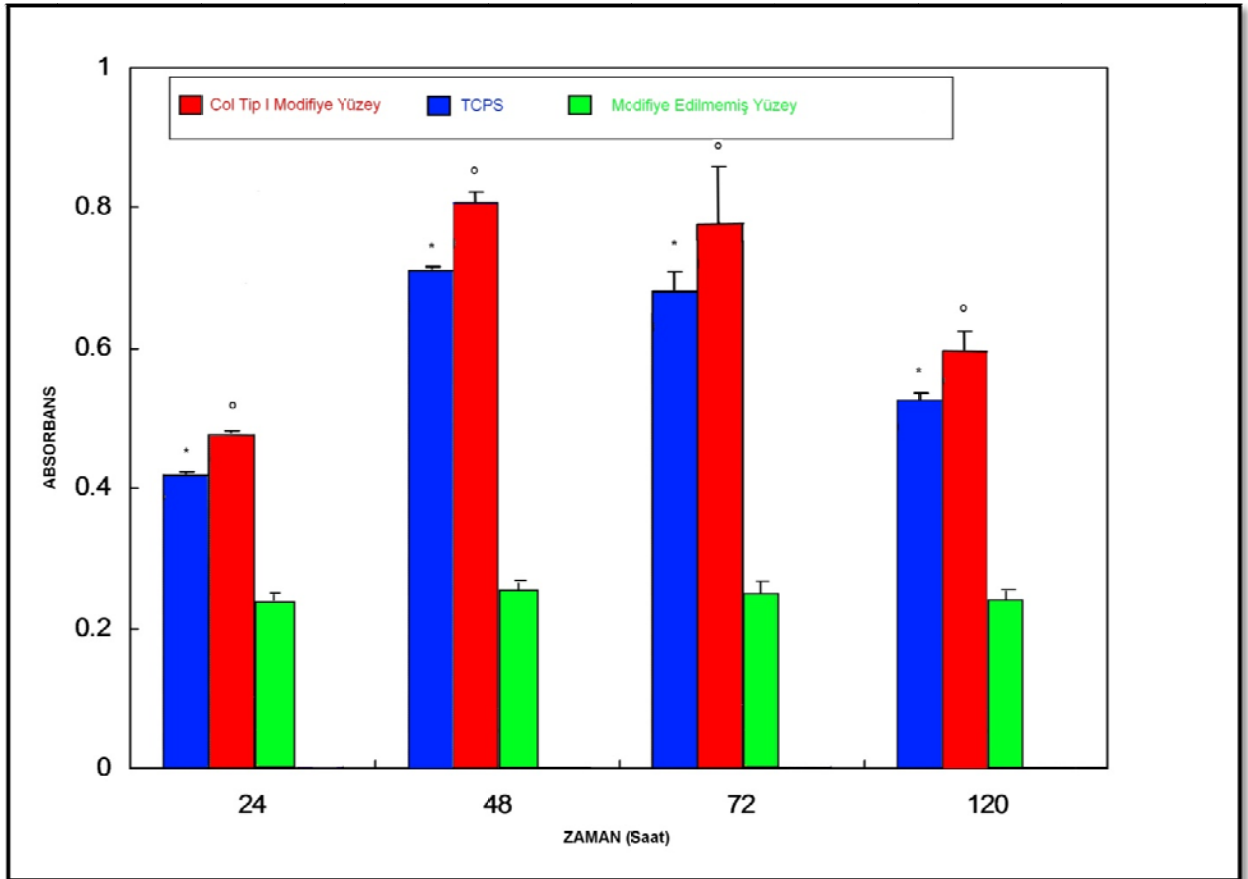
Pek çok farklı hücre türü için ATP molekülünün hücre-yüzey ve hücre-hücre yapışmasındaki rolü çeşitli araştırma gruplarınca belirlenmiştir (Yamato ve ark 1990). Aktif yapışma sürecinde hücreler ATP metabolizması sonucunda membran integrinlerin aktif hale gelmesi ile yüzeylere tam olarak yapışırlar. Bu durumda ortamdaki ATP miktarının belirlenmesi hücre kültüründeki hücrelerin aktif yapışma ve proeliferasyonunun ifadesi olarak ortaya çıkmaktadır (Parker ve ark, 2002). Modifiye edilmemiş sıcaklık duyarlı yüzeylerde ölçülen ATP miktarı TCPS ve Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş yüzeylere göre düşük çıkmıştır. Bu durum mikroskopik inceleme ile de doğrulanmıştır. Sunulan çalışmada da doğrulandığı üzere, Takezawa ve arkadaşlarının 1990'da yaptığı bir çalışmada kovalent yoldan PIPAAm kaplanmış sıcaklık-duyarlı yüzeylere hücre tutunması ve proliferasyonu olmadığı görülmüştür, ancak kollajen ile modifiye edilmiş yüzeylerde tutunma ve proliferasyonun normal biçimde seyrettiği tespit edilmiştir. Bu durumun gerekçesi olarak, yüzeye kaplanmış olan uzun serbest polimer zincirleri sebebiyle hidrofobisitenin çok artması ve hücre-yüzey bağlantısının kurulamadığı düşünülmektedir. In vivo koşullarda hücre dışı matriks yapıtaşlarından olan kollajen ile modifiye edilen yüzeylerde ise hücre membran reseptörlerinin doğal affinitesinden ötürü deneysel sonuçların da doğruladığı üzere hücre yapışması ve proliferasyonu normal biçimde seyretmiştir.

4.2.1.4. Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerde Hücre Üremesi

Sunulan çalışmada hazırlanan ve modifikasyonu gerçekleştirilen NIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeyler üzerinde g/G fare üroteliyal epitel hücrelerin üreme davranışı araştırılmıştır. Bölüm 3.6.1 ve Bölüm 3.6.2.1'de açıklanan şekilde alamar blue metodu ve MTT deneyleri yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

MTT Deneyi ile Mitokondriyel Fonksiyonların Takibi

Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerde mitokondriyal aktivitenin MTT deneyleri ile takip edildiği çalışmanın sonuçları Şekil 4.10'da verilmiştir. Çalışmalardan elde edilen veriler modifiye edilmemiş P(NIPAAm-NtBA) yüzey, Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş yüzey ve standart TCPS yüzey için toplu olarak sunulmuştur.

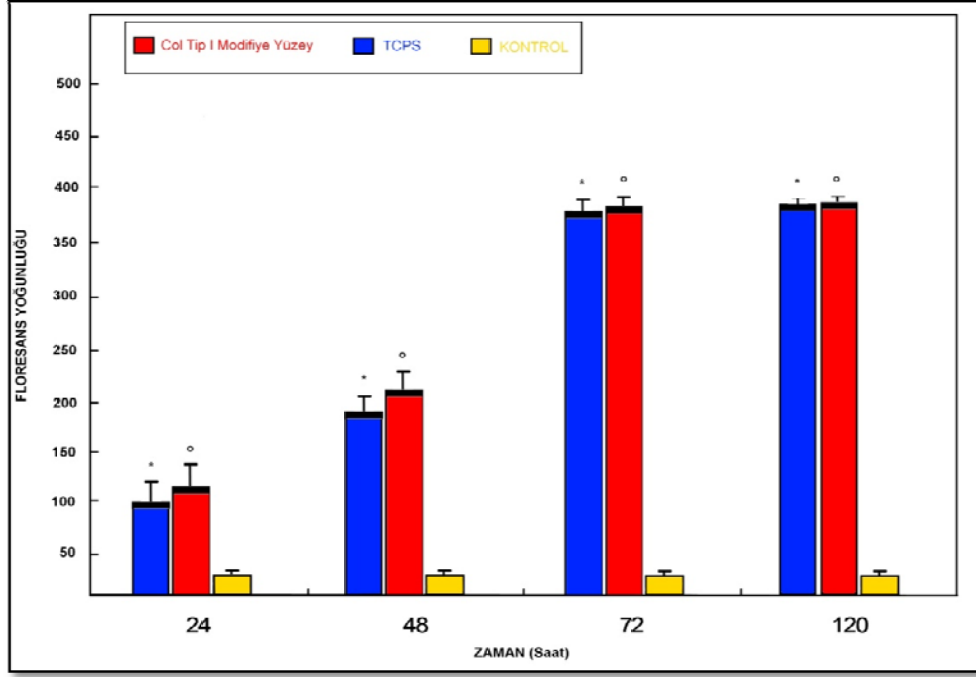


Şekil 4.10. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal hücrelerinin üreme davranışının MTT analizi ile mitokondriyel aktiviteye dayalı tayini. Başlangıç hücre konsantrasyonu: 2×10^4 hücre/ml'dir. [*p<0.01 , o p<0.01]

Şekilde de açıkça görüldüğü gibi hücresel mitokondriyal aktivitenin en yüksek olduğu durum kollajen Tip I ile modifiye edilmiş olan yüzeylerde görülmüştür. Standart TCPS üzerinde yapılan hücre kültürü ile modifiye sıcaklık-duyarlı yüzeyde yapılan arasında çok az bir fark görülürken, yüzey adhezyon destekleyicisi ile modifiye edilmeyen P(NIPAAm-NtBA) kaplı polistiren yüzeylerde hücre üremesi gerçekleşmemiştir. Elde edilen sonuç hücre yapışması sonuçlarını destekler niteliktedir. Modifiye edilmemiş yüzeylere hücre tutunması gerçekleşmediği için mitokondriyal metabolizma minimumda kalmıştır.

Alamar Blue Deneyi ile Metabolik Aktivitenin Takibi

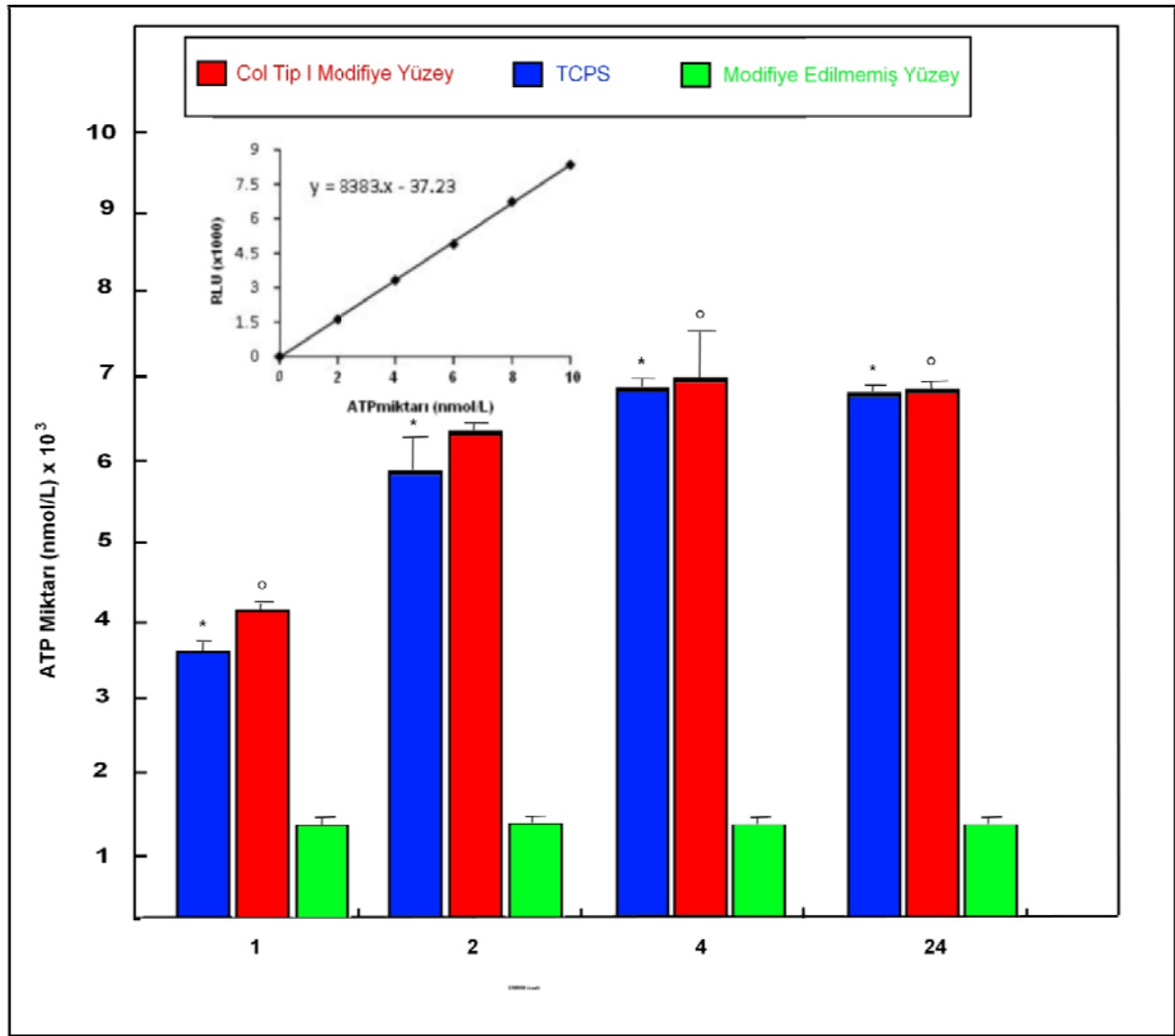
PNIPAAm bazlı, Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş ve edilmemiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerde hücre üremesinin Alamar blue metodu ile takip edildiği çalışmanın sonuçları Şekil 4.11'de sunulmuştur. Yüzeye bağlı durumda bulunan hücre yoğunluğunun artışı hakkında fikir veren Alamar Blue metodu sonuçları incelendiğinde hücre adhezyon destekleyicisi Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş olan sıcaklık-duyarlı yüzeylerdeki hücre yoğunluğunun modifiye edilmemiş yüzeye oranla daha yüksek olduğu açıkça görülmektedir. Standart TCPS yüzeydeki hücre yoğunluğu ile modifiye sıcaklık-duyarlı yüzeydeki hücre yoğunlukları arasında gözle görülür bir fark ortaya çıkmamıştır. Alamar Blue metodu ile elde edilen sonuçlar mitokondriyal aktivitenin ölçüldüğü MTT deneyleri ile uyum sağlamaktadır.



Şekil 4.11. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane ürotelial hücre yoğunluğunun Alamar Blue metodu ile takibi. Başlangıç hücre konsantrasyonu: 2×10^4 hücre/ml'dir. [*p<0.01 , ° p<0.01].

ATP Deneyi İle Proliferasyon ve Hücre Farklılaşmasının Takibi

Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde yapılan hücre kültürü çalışmalarında ATP testi gerçekleştirilmiştir. Hücrel ATP miktarındaki değişimlerin g/G fare mesane ürotelial hücrelerinin sıcaklık-duyarlı yüzeylere yapışması ve proliferasyonunun göstergesi olarak sonuçları Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G fare mesane üroteliyal hücre aktivitesinin ATP deneyi ile takibi. Başlangıç hücre konsantrasyonu: 2×10^4 hücre/ml'dir [* $p < 0.01$, o $p < 0.01$].

Şekilde de görülebileceği üzere Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeyde hücre ATP miktarı standart TCPS ve modifiye edilmemiş NIPAAm bazlı yüzeye göre yüksektir. Elde edilen sonuçlar her ne kadar MTT ve Alamar Blue deneylerini destekler nitelikte olsa da, MTT ve Alamar blue testlerinde TCPS ve modifiye yüzey arasındaki fark nispeten istatistiki boyutta iken ATP deneyinde kollajen ile modifiye yüzeylerdeki hücre ATP miktarı TCPS yüzeye göre özellikle ilk dört saatlik periyot içerisinde %17 daha fazla olarak ortaya çıkmıştır.

Hücrelerin substratlara yapışması ve proliferasyonu membran integrinlerinin ATP katalizinde aktivasyonuna bağlı olan bir süreçtir. ATP miktarının tayini, hücrelerin farklı substratlarda yapışma ve üreme ve farklılaşma davranışları hakkında fikir verebilen hassas bir metottur (Dexter ve ark. 2002). Bu durum aktif yapışmaya bağlı olarak hücre farklılaşmasının modifiye yüzeyde daha yoğun olarak gerçekleştiğinin göstergesidir.

4.2.1.5.Sıcaklık-duyarlı Yüzeylerde Hücre Yapışma Hız Sabitinin Hesaplanması

g/G mesane üroteliyal epitel hücreleri ile gerçekleştirilen ve hücre yapışmasının incelendiği çalışmalardan elde edilen deneysel bulgular, sıcaklık-duyarlı yüzeylerde gerçekleşen hücre yapışmasının kinetik olarak değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Hücre yapışması 1. dereceden kinetik ifadeyle verilmektedir. Yapılan hesaplamalarda, sıcaklık-duyarlı yüzeylerde özgül hücre yapışma hızı (k , saat⁻¹) tayin edilmiştir. Hemositometrik hücre sayımından elde edilen değerler ($\ln C_{i0} - \ln C_f$, ilk 4 saat) zamana karşı grafiğe geçirilmiş ve eğim değerinden k hesaplanmıştır. Ayrıca başlangıç hücre miktarının % 50'sinin yüzeylere yapışması için gerekli süre $t_{1/2}$ (saat) bulunmuştur. Yapılan hesaplamalara ilişkin ayrıntılı açıklamalar ve grafikler Ek 3' de verilmiştir. Çizelge 4.3'de hücre yapışmasının incelendiği yüzeyler için k ve $t_{1/2}$ değerleri toplu olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde g/G mesane üroteliyal epitel hücre yapışmasına ait k ve $t_{1/2}$ değerleri.

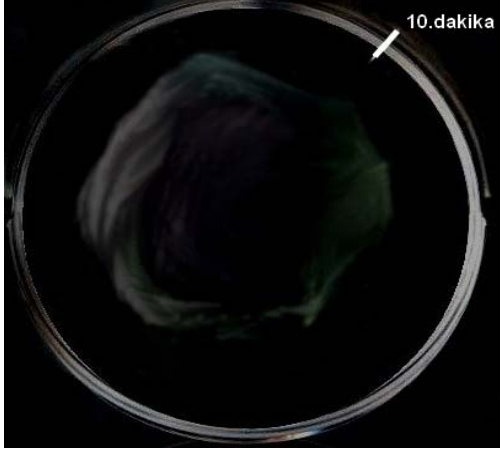
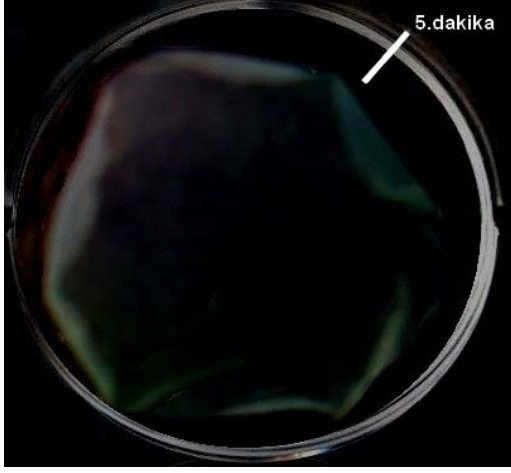
Yüzeyler	k (saat ⁻¹)	$t_{1/2}$ (saat)
Standart TCPS	0.69	0.94
P(NIPA-NtBA)	0.11	2.26
Col Tip I Modifiye Yüzey	0.87	0.84

Çizelge 4.3’de elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerin, standart TCPS yüzeylere oranla hücre yapışma hızının kısmen daha yüksek olduğu ve başlangıç hücre miktarının % 50’sinin yüzeye yapışması için geçen sürenin daha kısa olduğu görülmektedir. Adhezyon promotörü modifikasyonu gerçekleştirilmeyen sıcaklık-duyarlı yüzeylerden elde edilen sonuçlar da hücre yapışmasının son derece düşük ve yavaş olduğu görülmektedir. Modifiye edilmeyen yüzeylere hücre tutunması mikroskopik analizlerde görülmemiştir. Elde edilen sonuçlar PNIPAAm bazlı polimerlerde 30 nm’lik yüzey kalınlığının aşıldığı durumlarda hücre adhezyonunun olmadığı yönündeki bulguları destekler niteliktedir. Standart TCPS ile Kollajen modifiye yüzey arasında yapışma hızlarında gözlemlenen farkın, Kollajen’in hazır bir ECM olarak ortamda bulunmasıyla hücre transmembran integrinlerinin uyarılması ile aktif adhezyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. ATP testlerinin sonuçları da bu sonuçları destekler niteliktedir.

4.3 Sıcaklık Değişimi İle Hücre Tabakasının Yüzeyden Ayrılması

Daha önce açıklandığı üzere, sıcaklık-duyarlı hidrojel, 37°C’de bağıl olarak hidrofobik karakter göstermekte ve su moleküllerinin yapıdan uzaklaşması ile hidrojel hacmi azalmaktadır. Sıcaklığın 4°C’ye düşmesiyle yapıdaki hidrofilik etkileşimler önem kazanmakta ve su moleküllerinin hidrojel yüzeyine tutunmasıyla şişme artmaktadır. Bu doğrultuda sıcaklığın 4°C’den 37°C’ye artmasıyla hidrojinin bağıl olarak hidrofilik karakterden hidrofobik karaktere geçtiği söylenebilir. Sentezlenen hidrojinin bu özelliğinden faydalanarak yüzeye yapışmış olan hücrelerin enzimatik yöntemler kullanılmaksızın yüzeyden geri kazanımları önerilmektedir. Sunulan çalışmada Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş P(NIPAAm-NtBA) kaplanmış sıcaklık duyarlı yüzeylerden 5 günlük kültür süresi sonunda hücre tabakası haline gelmiş g/G fare mesane üroteliyal hücreleri ortamdaki besiyerinin 4°C dereceye getirilmiş besiyeri ile değiştirilmesi sonucunda yüzeyden koparılmıştır. Amaçlanan, hücrelerin yüzeyden hücre tabakası biçiminde alınmasıdır. Hücre tabakasının 20 dakika içinde yüzeyden tamamen ayrıldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.13’de görüleceği üzere hücre tabakası kültür kabının kenarlarından başlayarak içe doğru katlanma biçiminde ayrılmaya başlamıştır. 20.

dakikanın sonunda tamamen içe doğru üstüste katlanmış, buruşmuş bir yapı ortaya çıkmıştır.



şekil 4.13. g/G fare mesane üroteliyal tabakasının sıcaklık değişimine bağlı olarak ayrılmasının makroskopik görüntüleri.

Hücre tabakasının ayrılması için alternatif yaklaşım olarak buzdolabına aktarılan kültür kabı 30 dakika boyunca 4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Buna karşın, hücre tabakasının ayrışması tamamen aynı biçimde olmuştur. Literatürde hücre tabakasının intakt biçimde alınması için kültür kabı yüzeyine PVDF membran yerleştirilerek hücre tabakasının apikal yüzeyinin membrana tutunmasıyla membranla beraber tabakanın yapısının bozulmadan alınabileceği bildirilmiştir (Hirose ve ark 2000). Bu yaklaşım kullanılarak hücre tabakası bozulmadan alınabildiği takdirde, sunulan çalışmanın da sonuçlar dikkate alınarak oluşturulan ürotelial hücre tabakası greft formunda hayvan sistemlerine implante edilebilir nitelikte olduğu söylenebilir.

4.3.1 Hücre Tabakasının Farklılaşma Derecesinin Belirlenmesi

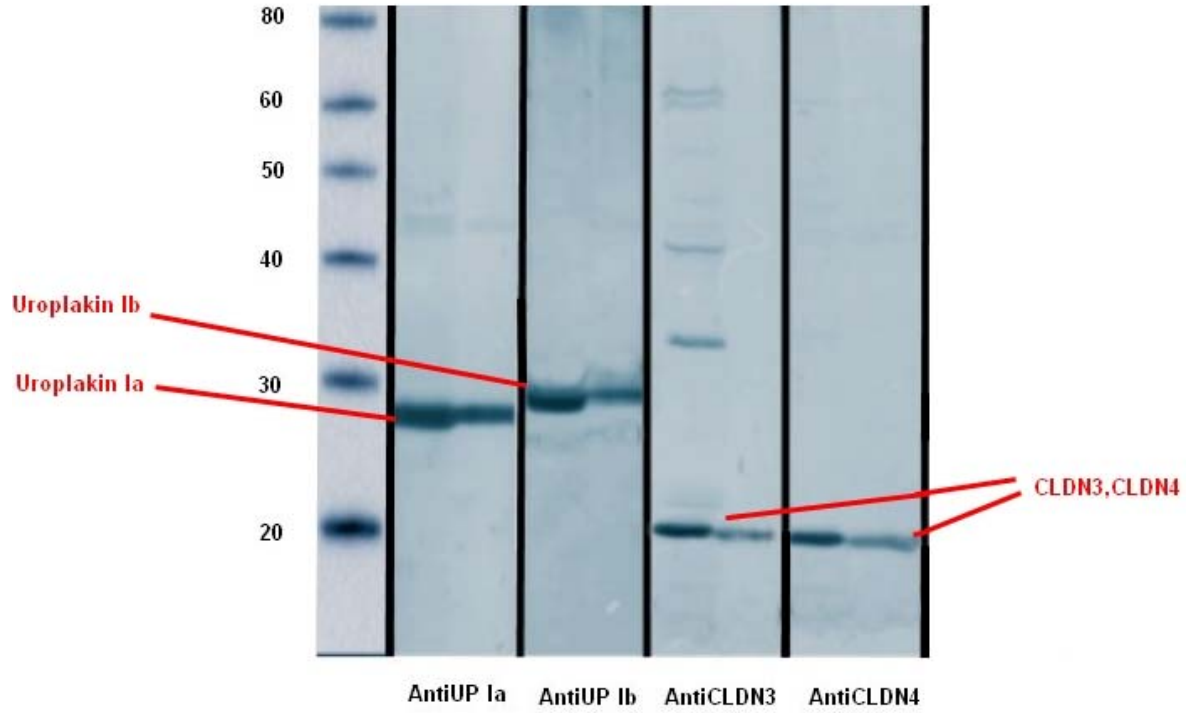
Sıcaklık-duyarlı yüzeylerde gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları sonucunda oluşturulan hücre tabakasının ürotelial greft olarak kullanılabilirliği ve doku olarak farklılaşıp farklılaşmadığının anlaşılması için western blotting tekniği uygulanarak ürotelial dokuya spesifik hücreler arası bağlantı proteinleri olan Claudin 3, Claudin 4 ve Uroplakin 1'in ekspresyonlarına bakılmıştır.

Claudin grubu transmembran proteinleri özellikle hücre-hücre arası adhezyonu sağlayan transmembran proteinleridir. Süspanse hücrelerde Claudin grubu protein ekspresyonu görülmemektedir (Masters ve ark, 1996). Uroplakin I ise tamamen farklılaşmış ürotelial hücrelere özgü, özellikle mesane apikal yüzeyini kaplayan ürotelial epitel hücrelerde ifade edilen bir proteindir. Uroplakin Ia, Ib ve Uroplakin II'den oluşan familya temel olarak ürotelial plakların yapısında yer alır. Asimetrik birim membranları olarak da adlandırılan ürotelial plaklar mesane içerisinde geçirgenliğin önlenmesi ve fiziksel stabilite sağlanması gibi önemli hücresel fonksiyonları yerine getirmektedirler (Liang ve ark. 2001). Transmembran 4 süperfamiliyasından olan Uroplakin I'in tamamen mesane ürotelial hücrelerine özgü bir protein olduğu 2006 yılında Xie ve ark. tarafından yapılan çalışmada ortaya çıkarılmıştır.

Scriven ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada hücre kültürü ortamında ürotelial epitel farklılaşması incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sitokeratin grubu protein ekspresyonu primer hücre kültüründe de görülse de hücre adhezyon

moleküllerinin ifadesinin yalnızca farklılaşmış üroteliyal hücrelerde gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

Literatür verilerinin ışığında elde edilen hücre tabakasının farklılaşma derecesi ve dolayısıyla hücre tabaka mühendisliği uygulaması olarak greft biçiminde kullanılmaya uygun olup olmadığının belirlenmesi için sözü edilen proteinlerin ekspresyonuna bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13’de gösterilmektedir.



Şekil 4.14. g/G fare mesane üroteliyal tabakasının farklılaşmasının ölçütü olarak Üroplakin ve Claudin transmembran proteinlerinin ifadesi. (CLDN3 ve CLDN4 20.2 kD, UPIa 27 kD, UPIb 28 kD), Invitrogen MagicMarkXP marker.

Sonuçlardan da görüldüğü üzere Claudin 3, Claudin 4 ve özellikle üroteliyal doku spesifik Üroplakinler hücre tabakasından elde edilen özütlerde net olarak ifade edilmektedir. İşaretleyici antikor varlığında SDS-PAGE yapıldığında Claudin grubu protein bantları 20 kD seviyesinde, Uroplakin Ia bandı 27 kD seviyesinde ve Uroplakin Ib bandı 28 kD seviyesinde tespit edilmiştir. Bahsedilen proteinlerin ifadesi hücrelerin ileri düzeyde farklılaştığını ve hücre tabakası mühendisliği ile üroteliyal hücre grefti olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak hücre tabakası yaklaşımı ile PNIPAAm bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeylerde ürotelial hücre tabakası eldesi ve ürotelial greft olarak kullanım potansiyeline yönelik bulgular elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Sıcaklık-duyarlı yüzey hazırlanmasında ilk olarak denenen elektron demeti ile polimerizasyon yaklaşımı başarılı olmamıştır. Bunun sebebinin uygulanan elektron demeti radyasyonunun yüzeye odaklanamaması ve dolayısıyla aşılamanın gerçekleşmemesi olduğu düşünülmektedir. Zira, elektron demeti uygulaması klinik radyoterapi cihazı ile gerçekleştirilmeye çalışılmış, her ne kadar lineer elektron hızlandırıcı cihaz teknik olarak istenen miktarda radyasyonu uygulamaya müsait olsa da, elektron demeti uygulanacak hücre kültür kapları boyut olarak cihaza küçük gelmektedir.
- Serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanan P(NIPAM-NtBA) kopolimerinin başlatıcı olarak AIBN varlığında yüzeye aşılama ile sıcaklık-duyarlı yüzey oluşturulması işlemi başarılı olmuştur.
- Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında, sıcaklık-duyarlı polimerin ve hücre yapışması için adhezyon promotörü olan Kollajen Tip I'in immobilizasyonu açıklanmıştır.
- AFM analizlerinden elde edilen sonuçlarda, ortalama yüzey pürüzlülük değerinin (R_a , nm) biyomodifikasyon sonrasında düştüğü belirlenmiştir.

- SEM analizlerinden elde edilen görüntülerde, P(NIPAM-NtBA) polimerinin yüzeye homojen olarak aşılandığı belirlenmiştir.
- Sıcaklık-duyarlı yüzeylerin Kollajen Tip I ile modifikasyonunun hücre yapışmasına ilişkin etkileri incelenmiştir. Modifiye edilmiş yüzeylerde hücre yapışmasının arttığı tespit edilmiştir.
- Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş yüzeylerde 2 saatlik kültür sonunda hücre yapışmasının modifiye edilmemiş yüzeylere oranla ~%97 daha fazla olduğu bulunmuştur. Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerde 2 saat sonunda hücrelerin önemli bir bölümünün yayılmaya başlayarak üroteliyal epitel karaktere uygun geçişgen morfolojilerini oluşturdukları saptanmıştır. Mikroskobik incelemelerde ise sadece sıcaklık-duyarlı kopolimer kaplanmış yüzeylere hücre yapışmasının ihmal edilecek kadar az olduğu görülmüştür.
- Modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeyler ile hücre yapışması açısından incelendiğinde yapışmanın standart TCPS yüzeylere göre daha hızlı gerçekleştiği görülmüştür. Kollajen'in hazır bir ECM olarak ortamda bulunmasıyla hücre transmembran integrinlerinin uyarılması ile aktif adhezyondan kaynaklandığı kanısına varılmıştır. ATP testlerinin sonuçları da bu sonuçları destekler niteliktedir.
- Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş sıcaklık-duyarlı yüzeylerde özgül hücre yapışma hızının modifiye edilmemiş yüzeylere oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Değerler P(NIPA-NtBA) yüzeyler 0.11 saat^{-1} için ve kollajen modifiye P(NIPA-NtBA) 0.87 saat^{-1} , standart TCPS için 0.69 saat^{-1} olarak bulunmuştur.
- Gerçekleştirilen MTT testlerinin sonucunda mitokondriyel aktivitenin en yüksek olduğu yüzeyin Kollajen Tip I ile modifiye edilmiş yüzey olduğu

anlaşılmıştır. Metabolik aktivite modifiye edilmemiş sıcaklık-duyarlı P(NIPA-NtBA) yüzeylerde minimum olarak gözlemlenmiştir.

- Alamar Blue testleri de MTT testlerinin sonuçları ile paralellik göstermektedir. Resazurin'in metabolize edilmesi ile ortaya çıkan resafurin kaynaklı floresans en yoğun biçimde modifiye edilmiş yüzeylerde görülürken, en düşük floresans yoğunluğu modifiye edilmemiş P(NIPA-NtBA) yüzeylerde ölçülmüştür.
- Hücresel ATP miktarının ölçümü Lusiferin'in ATP varlığında lusiferaz tarafından indirgenmesi ve biyoluminesans özellikte oksilusiferin oluşturması prensibine dayalı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonu bilinen ATP çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğine göre hücresel ATP miktarı nmol cinsinden belirlenmiştir.
- ATP testi sonuçlarında MTT ve Alamar blue analizi sonuçları ile tutarlılık göstermektedir.
- Sıcaklık etkisi ile yüzeyden hücre tabakası eldesi için g/G fare mesane üroteliyal hücreleri ortamdaki besiyerinin 4°C dereceye getirilmiş besiyeri ile değiştirilmesi sonucunda yüzeyden koparılmıştır.
- Koparıma makroskopik olarak 20 dakika boyunca takip edilerek görüntülenmiştir.
- Hücre-tabakası biçiminde ayrılma 5. dakikadan itibaren görüntülenmiştir. Ayrılma kültür kabının kenarlarından başlamış ve hücre tabakası ortaya doğru katlanmaya başlamıştır. 20 dakikanın sonunda elde edilen hücre tabakası tamamen kendi üstüne katlanmış bir forma gelmiştir.
- Hücre tabakasının farklılaşma derecesi hücre-hücre etkileşimlerinin anlaşılması amacıyla protein spesifik antikorlar kullanılarak western-blot

analizi yapılmıştır. Özellikle Uroplakin I grubu proteinlerin terminal düzeyde farklılaşmış üroteliyal epitel hücrelerine spesifik bir membran protein grubu olduğu bilinmektedir.

- Proteinlerin jelde yürütülmesi neticesinde Uroplakin Ia ve Uroplakin Ib bantları sırasıyla 27 kD ve 28 kD seviyesinde, Claudin 3 ve Claudin 4 bantları ise 20kD seviyesinde görüntülenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak protein ekspresyonu sonuçları değerlendirildiğinde elde edilen hücre tabakasının terminal düzeyde farklılaşma gösterdiği sonucuna varılmaktadır.

Sunulan tez çalışması kapsamında hazırlanan PNIPA bazlı sıcaklık-duyarlı yüzeylerde gerçekleştirilen üroteliyal hücre kültürü sonucu elde edilen hücre tabakasının doku grefti olarak kullanılabilirlik potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak hücre tabakasının intakt biçimde eldesi için membran kullanma zorunluluğu bir kez daha doğrulanmıştır. Daha ileri bir çalışma olarak, intakt biçimde elde edilecek üroteliyal hücre tabakasının hayvan sistemlerinde greft olarak denenmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Vacanti, J.P., Langer, R., 1999, Tissue engineering: the design and fabrication of Living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation, *Lancet*, 354, 32-36.

Putnam, A. J., Mooney, D. J., 1996, Tissue engineering using synthetic extracellular matrices, *Nature Med*, 2, 824-826.

Freed, L. E., G. Vunjak-Novakovic, R. J. Biron, D. B. Eagles, D. C. Lesnoy, S. K. Barlow, and R. Langer. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 12(7):689–693, 1994.

Akiyama, Y., A. Kikuchi, M. Yamato, and T. Okano. Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control. *Langmuir* 20(13):5506–5511, 2004.

Alarcon, C. H., T. Farhan, V. L. Osborne, W. T. S. Huck, and C. Alexander. Bioadhesion at micro-patterned stimuli-responsive polymer brushes. *J. Mater. Chem.* 15(21):2089–2094, 2005.

Aoyagi, T., M. Ebara, K. Sakai, Y. Sakurai, and T. Okano. Novel bifunctional polymer with reactivity and temperature sensitivity. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11:101–110, 2000.

Barrandon, Y., and H. Green. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor- α and epidermal growth factor. *Cell* 50(7):1131–1137, 1987.

Atala A (2000) Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol* 14: 49–57

Li ST (1995) Biologic Materials: tissue-derived biomaterials (collagen) In: J.D. Brozino (ed) *The biomedical engineering handbook*. Boca Raton, Florida, pp 627–647

Furthmayr H, Timpl R (1976) Immunochemistry of collagens and procollagens. *Int Rev Connect Tissue Res* 7: 61–99

Hendren WH, Reda EF (1986) Bladder mucosa graft for construction of male urethra. *J Pediatr Surg* 21: 189–192

Cayan S, Chermansky C, Schlote N et al. (2002) The bladder acellular matrix graft in a rat chemical cystitis model: functional and histologic evaluation. *J Urol* 168:798–804

Probst M, Piechota HJ, Dahiya R, Tanagho EA (2000) Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *BJU Int* 85: 362–371

- Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A (1998) Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology* 51: 221–225
- Lai JY, Yoo JJ, Atala A (2002) Bladder augmentation using small intestinal submucosa seeded with cells. *J Urol* 167 [Suppl 4]: 257
- Lai JY, Yoon CY, Yoo JJ, Wulf T, Atala A (2002) Phenotypic and functional characterization of in vivo tissue engineered smooth muscle from normal and pathological bladders. *J Urol* 168: 1853–1857
- Cilento BG, Retik AB, Atala A (1995) Urethral reconstruction using a polymer mesh. *J Urol* 153: 371
- De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A (2002) Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol* 168: 1789–1792
- Chen F, Yoo JJ, Atala A (1999) Acellular collagen matrix as a possible „off the shelf“ biomaterial for urethral repair. *Urology* 54: 407–410
- Amiel GE, Yoo JJ, Atala A (2000) Renal therapy using tissue-engineered constructs and gene delivery. *World J Urol* 18: 71–79
- Atala A, Schlusser RN, Retik AB (1995) Renal cell growth in vivo after attachment to biodegradable polymer scaffolds. *J Urol* 153 [suppl]: 4
- Canavan, H. E., X. Cheng, D. J. Graham, B. D. Ratner, and D. G. Castner. Cell sheet detachment affects the extracellular matrix: a surface science study comparing thermal liftoff, enzymatic, and mechanical methods. *J. Biomed. Mater. Res. A* 75A(1):1–13, 2005.
- Canavan, H. E., X. Cheng, D. J. Graham, B. D. Ratner, and D. G. Castner. Surface characterization of the extracellular matrix remaining after cell detachment from a thermoresponsive polymer. *Langmuir* 21(5):1949–1955, 2004.
- Canavan, H. E., D. J. Graham, X. Cheng, B. D. Ratner, and D. G. Castner. Comparison of native extracellular matrix with adsorbed protein films using secondary ion mass spectrometry. *Langmuir* 23(1):50–56, 2007.
- Cheng, X., H. E. Canavan, M. J. Stein, J. R. Hull, S. J. Kweskin, M. S. Wagner, G. A. Somorjai, D. G. Castner, and B. D. Ratner. Surface chemical and mechanical properties of plasma-polymerized N-isopropylacrylamide. *Langmuir* 21(17):7833–7841, 2005.
- Chung, S. Y. Bladder tissue-engineering: a new practical solution? *Lancet* 367(9518):1215–1216, 2006.
- da Silva, R. M. P., J. F. Mano, and R. L. Reis. Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: switching cell-material boundaries. *Trends Biotechnol.* 25(12):577–583, 2007.

Ebara, M., M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, and T. Okano. A novel approach to observing synergy effects of PHSRN on integrin-RGD binding using intelligent surfaces. *Adv. Mater.* 20(16):3034–3038, 2008.

Ebara, M., M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, and T. Okano. Immobilization of cell-adhesive peptides to temperature-responsive surfaces facilitates both serum-free cell adhesion and noninvasive cell harvest. *Tissue Eng.* 10(7–8):1125–1135, 2004.

Ebara, M., M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, and T. Okano. Temperature-responsive cell culture surfaces enable “on-off” affinity control between cell integrins and RGDS ligands. *Biomacromolecules* 5(2):505–510, 2004.

Ebara, M., M. Yamato, M. Hirose, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, and T. Okano. Copolymerization of 2-carboxyisopropylacrylamide with N-isopropylacrylamide accelerates cell detachment from grafted surfaces by reducing temperature. *Biomacromolecules* 4(2):344–349, 2003.

Fillinger, M. F., E. R. Reinitz, R. A. Schwartz, D. E. Resetarits, A. M. Paskanik, D. Bruch, and C. E. Bredenberg. Graft geometry and venous intimal-medial hyperplasia in arteriovenous loop grafts. *J. Vasc. Surg.* 11(4):556–566, 1990.

Fukumori, K., Y. Akiyama, M. Yamato, J. Kobayashi, K. Sakai, and T. Okano. Temperature-responsive glass coverslips with an ultrathin poly (N-isopropylacrylamide) layer. *Acta Biomater.* 5(1):470–476, 2009.

Guillaume-Gentil, O., Y. Akiyama, M. Schuler, C. Tang, M. Textor, M. Yamato, T. Okano, and J. Vörös. Polyelectrolyte coatings with a potential for electronic control and cell sheet engineering. *Adv. Mater.* 20(3):560–565, 2008.

Pan, Y.V., R.A. Wesley, R. Luginbuhl, D.D. Denton, and B.D. Ratner. 2001. Plasma polymerized N-isopropylacrylamide: Synthesis and characterization of a smart thermally responsive coating. *Biomacromolecules*. 2: 32-36.

Kikuchi, A. and T. Okano. 2005. Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *J. Contr. Rel.* 101: 69-84.

Lin, S., Chen, K., and L. Run-Chu. 1999. Thermal micro ATR/FT-IR spectroscopic system for quantitative study of the molecular structure of poly(N-isopropylacrylamide) in water. *Polymer*. 40: 2619-2624.

Kwon, O.H., Kikuchi, A., Yamato, M., Sakurai, Y., and T. Okano. 2000. Rapid cell sheet detachment from Poly(N-isopropylacrylamide)-grafted porous cell culture membranes. *J. Biomed. Mater. Res.* 50: 82-89.

Cheng, X., Canavan, H.E., Stein, M.J., Hull, J.R., Kweskin, S.J., Wagner, M.S., Somorjai, G.A., Castner, D.G., and B.D. Ratner. 2005. Surface chemical and mechanical properties of plasma-polymerized N-isopropylacrylamide. *Langmuir*. 21:7833-7841.

Yang, J., Yamato, M., Kohno, C., Nishimoto, A., Sekine, H., Fukai, F., and T. Okano. 2005. Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*. 26: 6415-6422.

Chu, L.Y., Park, S.H., Yamaguchi, T., and S.I. Nakao. 2001. Preparation of thermoresponsive core-shell microcapsules with a porous membrane and poly(Nisopropylacrylamide) gates. *J. Memb. Sci.* 102: 27-39.

Wei, H., Zhang, X.Z., Zhou, Y., Cheng, S.X., and R.X. Zhuo. 2006. Self-assembled thermoresponsive micelles of poly(N-isopropylacrylamide-b-methyl-methacrylate). *Biomaterials*. 27: 2028-2034.

Cheng, S.X., Zhang, J.T., and R.X. Zhuo. 2003. Macroporous poly(Nisopropylacrylamide) hydrogels with fast response rates and improved protein release properties. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 67: 96-103.

Kikuchi, A. and T. Okano. 2004. Temperature-responsive, polymer-modified surfaces for green chromatography. *Macromol. Symp.* 207: 217-227.

Characterization of mouse urothelial cell lines in different phases of transitional cell carcinogenesis W.I. DE Boer, J.M.J. Rebel, J.A. Foekens, J. Vermey and T.H. van der Kwast

Kanazawa, H., Sunamoto, T., Matsushima, Y., Kikuchi, A., and T. Okano. 2000. Temperature-responsive chromatographic separation of amino acid phenylthiohydantoins using aqueous media as the mobile phase. *Anal. Chem.* 72: 5961-5966.

Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y., and Y. Sakurai. 1990. Thermoresponsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 11: 570-576.

Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H., and Y. Sakurai. 1995. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*. 16: 297-303.

Yamato, M., Okuhara, M., Karikusa, F., Kikuchi, A., Sakurai, Y., and T. Okano. 1999. Signal transduction and cytoskeletal reorganization are required for cell detachment from cell culture surfaces grafted with a temperature-responsive polymer. *J. Biomed. Mater. Res.* 44: 44-52.

Canavan, H.E., Cheng, X., Graham, D.J., and B.D. Ratner. 2005. Cell sheet detachment affects the extracellular matrix: A surface science study comparing

thermal liftoff, enzymatic, and mechanical methods. *J. Biomed. Mater. Res.* 75A: 1-13.

Shiroyanagi, Y., Yamato, M., Yamazaki, Y., Toma, H., and T. Okano. 2003. Transplantable urothelial cell sheets harvested noninvasively from temperatureresponsive culture surfaces by reducing temperature. *Tissue Eng.* 9: 1005-1012.

Doorty, K.B., Golubeva, T.A., Gorelov, A.V., Rochev, Y.A., Allen, L.T., Dawson, K.A., Gallagher, W.M., and A.K. Keenan. 2003. Poly(N-isopropylacrylamide) copolymer films as potential vehicles for delivery of an antimitotic agent to vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Pathol.* 12: 105-110.

Von Recum, H.A., Kim, S.W., Kikuchi, A., Okuhara, M., Sakurai, Y., and T. Okano. 1998. Novel thermally reversible hydrogel as detachable cell culture substrate. *J. Biomed. Mater. Res.* 40: 631-639.

Nandkumar, M.A., Yamato, M., Kushida, A., Konno, C., Hirose, M., Kikuchi, A., and T. Okano. 2002. Two-dimensional cell sheet manipulation of heterotypically cocultured lung cells utilizing temperature-responsive culture dishes results in long-term maintenance of differentiated epithelial cell functions. *Biomaterials.* 23: 1121-1130.

Takei, Y.G., Aoki, T., Sanui, K., Ogata, N., Sakurai, Y., and T. Okano. 1994. Dynamic contact angle measurement of temperature-responsive surface properties for poly(Nisopropylacrylamide) grafted surfaces. *Macromolecules.* 27: 6163-6166.

Yakushiji, T., Sakai, K., Kikuchi, A., Aoyagi, T., Sakurai, Y., and T. Okano. 1998. Graft architectural effects on thermoresponsive wettability changes of poly(Nisopropylacrylamide)- modified surfaces. *Langmuir.* 14: 4657-4662.

Kanazawa, H., Yamamoto, K., Matsushima, Y., Takai, N., Kikuchi, A., Sakurai, Y., and T. Okano. 1996. Temperature-responsive chromatography using poly(Nisopropylacrylamide)- modified silica. *Anal. Chem.* 68: 100-105.

Akiyama, Y., Kikuchi, A., Yamato, M., and T. Okano. 2004. Ultrathin poly(Nisopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control. *Langmuir.* 20: 5506-5511.

Wang, Xiaoling. 2004. Responsive Biomaterial Surfaces. M.S. Thesis. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.

Matthews, S., McCord, M., and M. Bourham. 2005. Polyvinyl alcohol (PVA) desizing mechanism via atmospheric pressure plasma exposure. *J. Plasma Process. Polym.* 2: 702-708.

Hwang, Y.J., Matthews, S., McCord, M., and M. Bourham. 2004. Surface modification of organic polymer films treated in atmospheric plasma. *J. Electrochem. Soc.* 151: C495-C501.

Matzelle, T., Ivanov, D., Landwehr, D., Heinrich, L., Herkt-Bruns, Ch., Reichelt, R., and N. Kruse. 2002. Micromechanical properties of "smart" gels: Studies by scanning 81 force and scanning electron microscopy of PNIPAAm. *J. Phys. Chem. B.* 106: 2861- 2866.

Shenton, M. and G. Stevens. 2001. Surface modification of polymer surfaces: atmospheric plasma versus vacuum plasma treatments. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 34: 2761-2768.

Curtis, A. and C. Wilkinson. 1997. Topographical control of cells. *Biomaterials.* 18: 1573-1583.

Chan, C. 1994. *Polymer Surface Modification and Characterization.* New York: Hanser/Gardener Publications.

Loh, I. Plasma surface modification in biomedical applications. *AST Technical Journal.* P-2003. www.astp.com.

Egitto, F.D. and L.J. Matienzo. 1994. Plasma modification of polymer surfaces for adhesion improvement. *IBM J. Res. Develop.* 38: 423-439.

Chan, C.M. Ko, T.M., and H. Hiraoka. 1996. Polymer surface modification by plasmas and photons. *Surface Science Reports.* 24: 1-54.

Okano, T., Yamada, N., Sakai, H., and Y. Sakurai. 1993. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(Nisopropylacrylamide). *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 1243-1251.

Kushida, A., Masayuki, Y., Konno, C., Kikuchi, A., Sakurai, Y., and T. Okano. 1999. Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 45: 355-362.

Kikuchi, A., Okuhara, M., Karikusa, F., Sakurai, Y., and T. Okano. 1998. Twodimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9: 1331-1348.

Yamato, M., Konno, C., Kushida, A., Hirose, M., Utsumi, M., Kikuchi, A., and T. Okano. 2000. Release of adsorbed fibronectin from temperature-responsive culture surfaces requires cellular activity. *Biomaterials.* 21: 981-986.

Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., and T. Okano. 2001. Two-dimensional

manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng.* 7: 141-151.

Shimizu, T., Yamato, M., Akutsu, T., Shibata, T., Isoi, T., Kikuchi, A., Umezu, M., and T. Okano. 2002. Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J. Biomed. Mater. Res.* 60: 110-117.

Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., Kikuchi, A., Umezu, M., and T. Okano. 2002. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ. Res.* 90: e40.

Lee J., Kaibara M., Sasabe I., Suzuki Y., Kusakabe M., 1993, Selective adhesion and proliferation of cells on ion-implanted polymer domains, *Biomaterials*, 14, 71-93.

Li, R. K., Jia, Z. Q., Weisel, R. D., 1999, Survival and function of bioengineered cardiac grafts, *Circulation*, 100, 63-69.

Liu, W. F., Chen, C. S., 2005, Engineering biomaterials to control cell function, *Materials Today*, 8, 28-35.

Merten, O., 2000, Encyclopedia of cell technology, John Wiley and Sons, New York, 365p.

Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, Y., 1995, Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, *Biomaterials*, 16, 297-303.

Özdamar, K., 2002, Paket Programlar İle İstatistiksel Veri Analizi I, Kaan Yayıncılık, Ankara, 686p.

Park, T. H., Schuler, M. L., 2003, Integration of cell culture and microfabrication technology, *Biotechnol Prog*, 19, 243-253.

Quirk, R. A., Chan, W. C., Davies, M. C., Tendler, S. J. B., Shakesheff, K. M., 2001, Poly(l-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid). *Biomaterials*, 22, 865–872.

Shimizu, T., Masayuki, Y., Kikuchi, A., Okano, T., 2003, Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction, *Biomaterials*, 24, 2309-2316.

Shin, H., Jo, S., Mikos, A. G., 2003, Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials*, 24, 4353-4364.

Shingvi R., Kumar A., Lopez G.P., Stephanopoulos G.N., Wang D., Whitesides G.M., 1994, Engineering cell shape and function, *Science*, 264, 292-296.

Moran, M. T., Carroll, W. M., Selezneva, I., Gorelov, A. & Rochev, Y. Cell growth and detachment from protein-coated PNIPAAm-based copolymers *J. Biomed. Mater. Res.*

Van der Flier, A., 2001, Function and interactions of integrins, *Cell Tissue Res*, 305, 285-298.

Van Wachem, P. B., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers, J. P., van Aken, W. G., 1985, Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities, *Biomaterials*, 6, 403-408.

Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y., Sakurai, Y., 1990, Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cells, *Macromol. Chem. Rapid. Commun*, 11, 571-576.

Zheng, J., Ito, Y., Imanishi, Y., 1995, Growth enhancement of anchorage-dependent and anchorage-independent cells by co-immobilization of insulin with poly(allylamine) or gelatin, *Biotechnol Prog*, 11, 677-681.

Rochev Y, O'Halloran D, Gorelova T, Gilcreest V, Selezneva I, Gavriluk B, Gorelov A. Rationalising the design of polymeric thermoresponsive biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:513–517.

Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, and Apodaca G. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F305–F318, 2004.

Apodaca G, Kiss S, Ruiz W, Meyers S, Zeidel M, and Birder L. Disruption of bladder epithelium barrier function after spinal cord injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F966–F976, 2003.

Birder LA, Barrick S, Roppolo JR, Kanai A, De Groat WC, Kiss S, and Buffington CA. Feline interstitial cystitis results in mechanical hypersensitivity and altered ATP release from bladder urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F423–F429, 2003.

Burton TJ, Elneil S, Nelson CP, and Ferguson DR. Activation of epithelial Na⁺ channel activity in the rabbit urinary bladder by cAMP. *Eur J Pharmacol* 404: 273–280, 2000.

Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, and Ford AP. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X₃-deficient mice. *Nature* 407: 1011–1015, 2000.

Cross WR, Thomas DF, and Southgate J. Tissue engineering and stem cell research in urology. *Br J Urol Int* 92: 165–171, 2003.

Deng FM, Liang FX, Tu L, Resing KA, Hu P, Supino M, Hu CC, Zhou G, Ding M, Kreibich G, and Sun TT. Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly. *J Cell Biol* 159: 685–694, 2002.

Fellows GJ and Marshall DH. The permeability of human bladder epithelium to water and sodium. *Invest Urol* 9: 339–344, 1972.

Ferguson DR. Urothelial function. *Br J Urol Int* 84: 235–242, 1999.

Ferguson DR, Kennedy I, and Burton TJ. ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes—a possible sensory mechanism? *J Physiol* 505: 503–511, 1997.

Fromter E and Diamond J. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol* 235: 9–13, 1972.

Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, and Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81: 1–44, 2003.

G. Graziano : On the temperature-induced coil to globule transition of poly-N-isopropylacrylamide in dilute aqueous solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 27(1):89-97, Mar. 2000

A. Esteve, A. Bail, G. Landa, A. Dkhissi, M. Brut, M. Djafari Rouhani, J. Sudor et

A.M. Gue : A new insight into the understanding of the collapsed form of poly(N-isopropylacrylamide) molecules. *Chem. Phys.*, Volume 340(1-3):12-16, Nov. 2007,

G. Zhang : Study on conformation change of thermally sensitive linear grafted poly(N- isopropylacrylamide) chains by quartz crystal microbalance. *Macromol.*, 37(17):6553-6557, 2004.

G. Liu et G. Zhang : Collapse and swelling of thermally sensitive poly(N-isopropylacrylamide) brushes monitored with a quartz crystal microbalance. *J.Phys. Chem.B*, 109(2):743-747, 2005.

N. Ishida et S. Biggs : Direct observation of the phase transition for a poly(n-isopropylacrylamide) layer grafted onto a solid surface by afm and QCM-D. *Langmuir*, 23(22):11083{11088, Oct. 2007, doi:10.1021/la701461b.

M. Annaka, C. Yahiro, K. Nagase, A. Kikuchi et T. Okano : Real-time observation of coil-to-globule transition in thermosensitive poly(n-isopropylacrylamide) brushes by quartz crystal microbalance. *Polymer*, 48(19):5713-5720, Sept. 2007,

C. Ramkissoon-Ganorkar, A. Gutowska, F. Liu, M. Baudys et S. W. Kim : Polymer molecular weight alters properties of pH-/temperature-sensitive polymeric beads. *Pharm Res*, 16(6):819{827, Jun 1999

K.N. Plunkett, X. Zhu, J.S. Moore et D.E. Leckband : PNIPAM chain collapse depends on the molecular weight and grafting density. *Langmuir*, 22(9):4259-4266, Apr. 2006,

Y. Pei, J. Chen, L. Yang, L. Shi, Q. Tao, B. Hui et J. Li : The effect of pH on the LCST of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid). *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 15(5):585-594, 2004,

G. Zhang et C. Wu : Reentrant coil-to-globule-to-coil transition of a single linear homopolymer chain in a water/methanol mixture. *Phys Rev Lett*, 86(5):822-825, Jan 2001,

Howard G. Schild et David A. Tirrell : Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. *J. Phys. Chem.*, 94(10):4352-4356, 1990.

F. Eeckman, K. Amighi et A. J. Moñes : Effect of some physiological and non-physiological compounds on the phase transition temperature of thermoresponsive polymers intended for oral controlled-drug delivery. *Int J Pharm*, 222(2):259-270, Jul 2001.

T. G. Park et A. S. Hoffman : Estimation of temperature-dependent pore size in poly(n-isopropylacrylamide) hydrogel beads. *Biotechnol Prog*, 10(1):82-86, 1994,

G. Rollason, J. E. Davies et M. V. Sefton : Preliminary report on cell culture on a thermally reversible copolymer. *Biomaterials*, 14(2):153-155, 1993, 9612(93)90230-Y.

I.C. Barker, J.M.G. Cowie, T.N. Huckerby, D.A. Shaw, I. Soutar et L. Swanson: Studies of the "smart" thermoresponsive behavior of copolymers of N-isopropylacrylamide and N,N-dimethylacrylamide in dilute aqueous solution. *Macromol.*, 36(20):7765-7770, 2003,

G. Bokias et Y. Mylonas : Association of positively charged copolymers based on N-isopropylacrylamide with hydrophobically modified poly(sodium acrylate) in water. *Macromol.*, 34(4):885-889, 2001.

J. Moselhy, X. Y. Wu, R. Nicholov et K. Kodaria : In vitro studies of the interaction of poly(nipam/maa) nanoparticles with proteins and cells. *J Biomater Sci Polym Ed*, 11(2):123-147, 2000.

Wu, XR, Medina J.J, Sun TT, Selective Interactions of UP 1a and UP 1b of Transmembrane 4 superfamily with distinct single transmembrane domain proteins in differentiated urothelial cells. *J. Bio.Chem*, 50; 29752-29759, 1995

Atala A (2000) Tissue engineering of artificial organs. *J Endourol* 14: 49–57

Li ST (1995) Biologic Materials: tissue-derived biomaterials (collagen) In: J.D.Brozino (ed) The biomedical engineering handbook. Boca Raton, Florida, pp 627–647

Furthmayr H, Timpl R (1976) Immunochemistry of collagens and procollagens. *Int Rev Connect Tissue Res* 7: 61–99

Hendren WH, Reda EF (1986) Bladder mucosa graft for construction of male urethra. *J Pediatr Surg* 21: 189–192

EKLER

EK-1

Hücre Kültür Kaplarında g/G Fare Mesane Üroteliyal Epitel Hücrelerine Ait Özgül Üreme Hızı ve İkilene Süresinin Hesaplanması

Kültür sistemlerinden hergün alınan örneklerle ait hücre konsantrasyonlar (x) hemositometrik yöntemle belirlenmiş ve elde edilen değerlerle hücre konsantrasyonunun zamana göre değişiminin grafikleri çizilmiştir. Bu grafikten hücre konsantrasyonunun üstel olarak değiştiği zaman aralığı belirlenmiş ve bu aralıkta Eşitlik 2.7’de verilen ifade $\ln$ tabanında yazılarak elde edilmiştir.

$$\ln x = \ln X_0 + \mu t$$

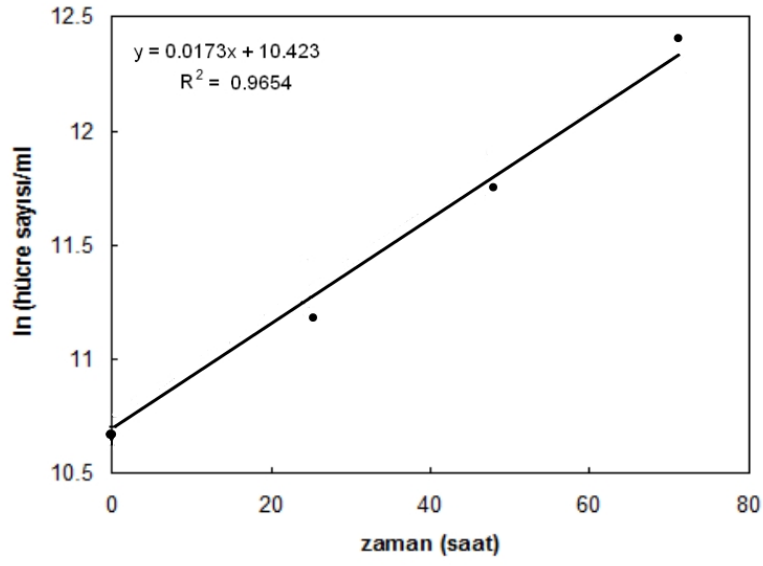
x : Canlı hücre konsantrasyonu (hücre/ml)

x_0 : Başlangıç hücre konsantrasyonu (hücre/ml)

μ : Özgül hücre üreme hızı (saat^{-1})

t : zaman (saat)

$\ln x$ – zaman grafiği çizildiğinde elde edilen doğrunun eğimi özgül hücre üreme hızını vermektedir (Şekil 6.1)



Hücrenin özgül üreme hızının hesaplanması

g/G fare mesane üroteliyal epitel hücresi özgül üreme hızı : 0.02 saat⁻¹

Hücre ikilenme süresi; t_d :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

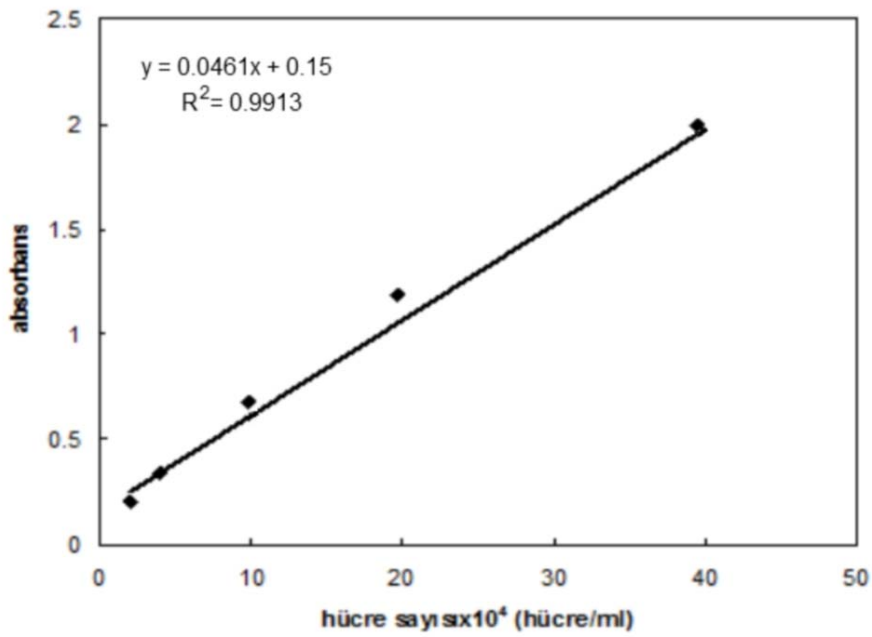
$$t_d = \frac{0.69}{0.017}$$

g/G fare mesane üroteliyal epitel hücre ikilenme süresi : 41 saat

EK-2

MTT Kalibrasyon Grafiği

Hücre konsantrasyonları (X) değęlerinin bulunmasında MTT deneylerinden elde edilen zamana karşı absorbans değęleri kullanılmıştır. Absorbans değęlerinden hücre konsantrasyonuna geçebilmek için, bilinen hücre konsantrasyonları ile yapılan MTT analizi sonunda hücre sayısına karşılık gelen absorbans değęleri grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

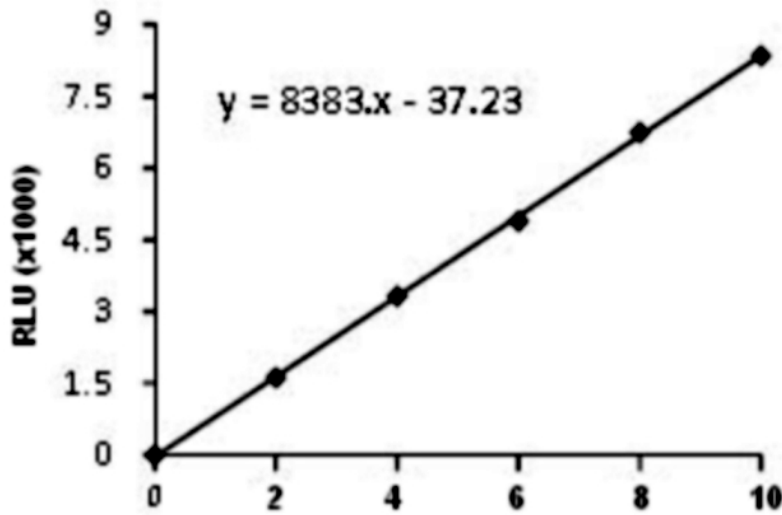


MTT Kalibrasyon Grafiği

EK-3

ATP (Lusiferin/Lusiferaz) Kalibrasyon Grafiği

g/G mesane ürotelial epitel hücrelerinin metabolik aktivitesi ve farklılaşma derecesi ATP (lusiferin-lusiferaz) yöntemi kullanılarak izlenmiştir. Metabolik olarak aktif olan viabil memeli hücrelerinde ATP oluşumu gerçekleşmektedir. Dolayısıyla ortamdaki ATP miktarı karşılığı lusiferin-oksifusiferin indirgenmesinden doğan RLU(Relative Luminescence Unit) canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır. Bilinen miktarda ATP içeren kalibrasyon çözeltisiyle hazırlana grafik aşağıda verilmiştir.



ATP Kalibrasyon grafiği (RLU:Relative Luminescence Unit/ATP miktarı)

EK-4

Hücre Farklılaşmasının Tayini Amacıyla Gerçekleştirilen Western Blot Analiz Protokolü

Elde edilen hücre tabakası PBS ile yıkandıktan sonra 10 mL besiyeri ile birlikte 1200 rpm santrifugasyona tabi tutulmuştur. Hücreler çöktükten sonra PBS eklenerek hücre çözeltisi buza aktarılmıştır. Lizis için için 62.5 mmol/L Tris-HCL, %10 gliserol ve %2 SDS (sodyum dodesil sülfat) içeren +4°C'de lizis tamponu kullanılmıştır. 30 dakikalık süre sonunda +4°C'de 45 dakika boyunca ultrasantrifugasyon yapılmıştır. Çözünmüş proteinleri içeren süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır. Protein ekstraktının kantifikasyonu BCA Protein Assay Kit (Pierce-Thermo) ile gerçekleştirilmiştir.

Lizis tamponunda 1/50 oranında seyreltilen protein ekstraktı 560 nm'de spektrofotometrik olarak incelenmiş ve yaklaşık 20µg'lık protein miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. [BCA analizinde kalibrasyon BSA (Bovine Serum Albumin) ile gerçekleştirilmiştir].

Elde edilen 20µg'lık protein çözeltisinin Invitrogen Tris-Glisin jelinde SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Elektroforez sonrası PVDF (polivinilidinden diflorid) membranlara aktarım yapılmıştır. Membran bloklanması %5 BSA çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir.

Primer antikor işaretlemesi AntiCLDN3, AntiCLDN4, AntiUpla ve Anti UPIb antikorları ile sırasıyla 1/200, 1/250 ve AntiUroplakinler için 1/150 seyreltme ile yapılmıştır.

Sekonder antikor işaretlemesi ve görüntüleme Invitrogen Western Dot 625 kiti ile Qdot625 sekonder antikor ile üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Görüntü eldesi için Fujifilm FLA-700 cihazı kullanılmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Alper Kemal DOĞAN

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Yılı : 1976

Medeni Hali : Evli

EĞİTİMİ VE AKADEMİK DURUMU

Lise : TED Ankara Koleji (1994).

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (1999)

Y. Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2003)

Yabancı Dil : İngilizce

İŞ DENEYİMİ

2007-2010 Kurucu Genel Müdür, Onkosele Biyoteknoloji Arge Ltd.Şti.
Ankara.

2005-2007 Araştırma görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü,
Ankara.

2001-2005 Proje Danışmanı, Fibro Madencilik Tic. A.Ş. Ankara.