

i. POLAT

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ

2019

**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENİZ-TÜREVİ MOLEKÜLLERİN NÖROVASKÜLER ETKİLERİNİN 3B
MİKRO ÇERÇEVE KO-KÜLTÜR MODELLERİNDE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İrem POLAT

NANOBİLİM VE NANOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

KASIM 2019

İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENİZ-TÜREVİ MOLEKÜLLERİN NÖROVASKÜLER ETKİLERİNİN 3B
MİKRO ÇERÇEVE KO-KÜLTÜR MODELLERİNDE İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İrem POLAT
(Y170220001)

Nanobilim ve Nanoteknoloji Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şadiye Emel SOKULLU

KASIM 2019

İKÇÜ, Fen Bilimleri Enstitüsünün Y170220001 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi İrem Polat, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “DENİZ-TÜREVİ MOLEKÜLLERİN NÖROVASKÜLER ETKİLERİNİN 3B MİKRO ÇERÇEVE KO-KÜLTÜR MODELLERİNDE İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı :

Dr. Öğretim Üyesi Şadiye Emel SOKULLU
Koç Üniversitesi

Jüri Üyeleri :

Dr. Öğretim Üyesi Sema DEMİRCİ UZUN
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Prof. Dr. Taner DAĞCI
Ege Üniversitesi

Teslim Tarihi : 08.11.19

Savunma Tarihi: 06.11.19

DENİZ-TÜREVİ MOLEKÜLLERİN NÖROVASKÜLER ETKİLERİNİN 3B MİKRO ÇERÇEVE KO-KÜLTÜR MODELLERİNDE İNCELENMESİ

ÖZET

Yapısal ve işlevsel olarak yeterlilik sağlayamayan dokuları olması gereken en mükemmel hale getirmek amacıyla modelleme yapmak son zamanlardaki gözde çalışmalardandır.

Bu çalışmada ise jelatin metakrilat (JelMA) sentezi yapılmıştır ve ekibimiz tarafından tasarlanmış cihaz ile fotomaske kullanılarak ultraviyole ışın (UV) yardımıyla JelMA polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Polimerize olmuş hidrojele insan göbek kordonu ven endotel (HUVEC) ve nöroblastom (SH-SY5Y) hücreleri enkapsüle edilmiştir. JelMA içine farklı oranlarda katkılandırılmış deniz-türevi 'Citreoahybridonol' molekülünün ko-kültür edilen hücrelere etkileri incelenmiştir.

Sentezi yapılan JelMA polimerinin karakterizasyonu amacıyla Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizleri yapılmıştır. Hücre canlılığı on-dört gün boyunca metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) testleri ile gözlemlenmiştir. Canlılık analizleri sonucu elde edilen sayısal verileri GraphPad Prism 8 iki yönlü ANOVA ve post hoc olarak Tukey testi ile analiz edilmiştir. HUVEC hücrelerinin canlılığındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Nöroblastom hücrelerinin canlılığındaki azalma ise istatistiksel olarak anlamlıdır. Molekül etkisini gözlemek amacıyla HUVEC hücre hattı için Angiopoietin 1 poliklonal antikoru; SH-SY5Y hücre hattı için ise Nestin antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyama gerçekleştirilmiştir ve elde edilen görüntülerin hücre canlılık analizlerini desteklediği görülmüştür.

Tüm analizler göz önüne alındığında, deniz kaynaklı "Citreoahybridonol" molekülünün HUVEC hücre hattı üzerinde olumsuz bir etkisi görülmemiştir. SH-SY5Y hücre hattında ise hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HUVEC, SH-SY5Y, insan göbek kordonu ven endotel, nöroblastom, citreoahybridonol, jelatinmetakrilat, hidrojel, fotopolimerizasyon, ultraviyole ışın

INVESTIGATION OF NEUROVASCULAR EFFECTS OF MARINE-DERIVED MOLECULES IN 3D MICRO FRAME CO-CULTURE MODEL

ABSTRACT

Tissue engineering is one of the most recent studies to make modeling in order to optimize the tissues that cannot be adequately structurally and functionally.

In this study, gelatin methacryloyl (GelMA) synthesis was performed. GelMA polymerization was performed with ultraviolet ray (UV) using photomask with the device designed by our team. Polymerized hydrogel human umbilical vein endothelial (HUVEC) and neuroblastoma (SH-SY5Y) cells were encapsulated. The effects of marine-derived 'Citreo hybridonol' molecule doped into GelMA in different ratios on the co-cultured cells were investigated.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) analyzes were performed to characterize the synthesized GelMA polymer. Cell viability was observed by methylthiazole diphenyl tetrazolium (MTT) and hydrogen peroxide (H₂O₂) for 14 days. Numerical data obtained from viability analysis were analyzed by GraphPad Prism 8 two-way ANOVA and Tukey test as post hoc. Immunohistochemical staining was performed by using Angiopoietin 1 polyclonal antibody for HUVEC cell line and Nestin antibody for SH-SY5Y cell line in order to observe the molecular effect. The obtained images were found to support cell viability analysis.

In all analyzes, the marine-induced "Citreo hybridonol" molecule did not have a negative effect on the HUVEC cell line. In SH-SY5Y cell line, it was found to have a negative effect on cell viability.

Keywords: HUVEC, SH-SY5Y, human umbilical vein endothelium, neuroblastoma, citreo hybridonol, gelatin methacrylate, hydrogel, photopolymerization, ultraviolet beam

ÖNSÖZ

Bu tez, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Bölümü (BAP) tarafından desteklenmiştir. Kendilerine bu araştırmayı finanse ettikleri için teşekkür ediyorum.

Öncelikle danışmanlarım Doç. Öğr. Üyesi Şadiye Emel SOKULLU'ya ve Prof. Dr. Gülgün ŞENGÜL'e her zaman yanımda oldukları ve beni bu şekilde cesaretlendirdikleri ve yol gösterdikleri için minnettarım. Prof. Dr. Taner DAĞCI'ya ve Doç. Dr. Çığır Biray AVCI'ya akademik süreç boyunca yapmış oldukları rehberlik, katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum.

İzmir Biyotıp ve Genom Merkezine ve Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na, araştırmamdaki destekleri ve ihtiyaç duyduğumuzda tüm kaynaklarını sağladıkları için teşekkür ediyorum.

Proje de çalışma sırasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen takım arkadaşlarım Zeynel Levent CÜCÜK ve Başak BÜYÜK'e, değerli deneyimlerini benimle her zaman paylaşan Fulya ERSOY'a ve Ferhat Can ÖZKAYA'ya teşekkür ediyorum.

Beni her zaman ahlaki ve bilimsel olarak destekleyen sevgili dostum Deniz Selin SOYALP'e minnettarım.

Tüm bunlar bütün yaşantımda beni her zaman destekleyen, en iyi dilek ve tavsiyeleri ile beni cesaretlendiren ailemin sevgisi, sabrı ve desteği olmadan mümkün olmazdı. Anneme ve babama ve her daim yanımda olduklarından dolayı bir ömür şükran borçluyum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Üç Boyutlu Doku Mühendisliği	2
1.2 Polimerler	2
1.2.1 Hidrojeller	3
1.2.2 Hidrojel hazırlamada kullanılan teknolojiler	4
1.2.3 Doku mühendisliğinde fotopolimerleştirilmiş hidrojeller	6
1.2.4 Kollajen.....	7
1.2.5 Jelatin	7
1.2.6 Jelatin metakrilat.....	8
1.2.7 Üç boyutlu JelMA üretimi	10
1.3 Ko-Kültür Sistemi	10
1.4 Endotel Hücreler.....	11
1.4.1 Tarihi.....	11
1.4.2 Tanımı	11
1.4.3 Fonksiyonu.....	11
1.4.4 İnsan göbek kordonu ven endotel hücresi (HUVEC)	12
1.5 Nöroblastoma Hücreleri	13
1.5.1 İnsan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y).....	13
1.6 Citreohybridonol	14
1.6.1 Citreohybridonol izolasyonu.....	15
1.7 Nanobilim ve Nanoteknoloji	16
1.7.1 Nanomalzemeler	16
1.7.2 Bir partikülün nanoparçacık/molekül olarak adlandırılması	17
1.7.3 Doku mühendisliğinde nanopartiküller	18
1.7.4 Nanopartiküllerin hücreye girişi	19
1.7.5 Nanoteknoloji Karakterizasyon yöntemleri	19
2. DENEYLER	21
2.1 Cihazlar	21
2.1.1 Omnicure S2000 Spot light Ultraviole (UV) curing device (Excelitas Technologies Corp., ABD)	21
2.1.2 Santrifüj (Thermo fisher, SL 16R, ABD)	22
2.1.3 Su banyosu (Nüve, NB5, Türkiye)	22

2.1.4 Finnpiquette™ (Fixed 20-100-1000) µL (Thermo fisher, ABD)	23
2.1.5 Hemositometre (Neubauer).....	24
2.1.6 Işık mikroskobu (Olympus CK2, ABD)	24
2.1.7 Mikroplaka fotometre (Thermo fisher, ABD)	25
2.1.8 Konfokal mikroskop (Zeiss, Almanya)	25
2.1.9 SEM (Zeiss GeminiSEM 500, Almanya)	26
2.1.10 AFM (Nanosurf Flex Axiom, İsviçre)	27
2.1.11 FTIR (Thermo Scientific Nicolet İS50, ABD)	27
2.2 Yöntemler	28
2.2.1 3B jel oluşumu için kullanılan cihazın üretimi	28
2.2.2 JelMA sentezi	29
2.2.3 Lamel yüzeylerinin işlenmesi	29
2.2.4 Polimer solüsyonunun hazırlanması	30
2.2.5 3B JelMA üretim	30
2.2.6 Hücre ekimi.....	32
2.2.7 3B ko-kültür oluşumu	32
2.2.8 Hücre canlılık testi	33
2.2.9 İmmünohistokimyasal boyama	34
3. BULGULAR	35
3.1 JelMA Yüzey Morfolojisi	35
3.2 JelMA Hidrojelinin Yüzey Topografisi	36
3.3 JelMA H ¹ NMR Sonuçları	36
3.4 JelMA Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	37
3.5 JelMA Oluşumu	38
3.6 Hücre Canlılığı İstatistiksel Analizleri	40
3.6.1 Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) hücre canlılık testi ve istatistiksel analizi 40	
3.6.2 Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) hücre canlılık testi ve istatistiksel analizi.....	42
3.7 İmmünohistokimyasal Görüntüleme	45
4. TARTIŞMALAR.....	52
4.1 JelMA Karakterizasyonu	52
4.2 Ko-kültür	52
4.3 Nörovasküler Etki.....	53
4.4 Hücre Canlılığı	53
5. SONUÇLAR	55
6. ÖNERİLER	56
REFERANSLAR.....	57

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Polimerlerin üretim yöntemleri.....	3
Tablo 1.2: Citreohybridonol molekülü kristal verileri.	16
Tablo 2.1: 3B JelMA üretim sürecinde kullanılan değerler.	32
Tablo 2.2: Gün başına hazırlanan örnekler.	33
Tablo 3.1: 0-1-4-7-14 günler için HUVEC hücre tipi görüntüleri.	46
Tablo 3.2: 0-1-4-7-14 günler için SH-SY5Y hücre tipi görüntüleri.	47
Tablo 3.3: 0-1-4-7-14 günler için HUVEC/SH-SY5Y ko-kültür görüntüleri.	48

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Irgacure kimyasal formülü.	6
Şekil 1.2: Foto çapraz bağlı JelMA hidrojel oluşumunun şematik gösterimi.	9
Şekil 1.3: 3B JelMA üretimin basite indirgenmiş şematik gösterimi.	10
Şekil 1.4: Endotel hücrelerin çoklu fonksiyonu.	12
Şekil 1.5: HUVEC hücre hattı.	13
Şekil 1.6: SH-SY5Y hücre hattı.	14
Şekil 1.7: Polar çözücülerdeki citreohybridonol keto-enol totomerlerinin yapıları [68].	15
Şekil 1.8: Citreohybridonol molekülünün elde edilme süreci.	15
Şekil 1.9: Nanomalzeme boyutları [80].	18
Şekil 2.1: Omnicure S2000 Spot lambası ultraviyole kütleme cihazı.	21
Şekil 2.2: Santrifüj.	22
Şekil 2.3: Su banyosu.	23
Şekil 2.4: Finnpiquette™.	23
Şekil 2.5: Hemositometre.	24
Şekil 2.6: Işık mikroskobu.	24
Şekil 2.7: Plate okuyucu.	25
Şekil 2.8: Konfokal mikroskop çalışma prensibi.	26
Şekil 2.9: SEM cihazı.	26
Şekil 2.10: AFM cihazı.	27
Şekil 2.11: FTIR cihazı.	27
Şekil 2.12: 3B hidrojel blokları üretim cihazı tasarımı.	28
Şekil 2.13: 3B hidrojel üretiminin gerçekleştirildiği sistem.	29
Şekil 2.14: a) Matriks fotomaske kullanılarak b) ‘Doughnut’ fotomaske kullanılarak 3B JelMA üretim süreci.	31
Şekil 3.1: JelMA'nın SEM görüntüleri a) 993X büyütme b) 413X büyütme c) por büyüklüğü.	35
Şekil 3.2: JelMA hidrojelinin iki ve üç boyutlu yüzey topografik görüntüsü.	36
Şekil 3.3: Jelatin H NMR grafiği [29].	36
Şekil 3.4: JelMA H NMR grafiği [29].	37
Şekil 3.5: JelMA FTIR analiz grafiği.	37
Şekil 3.6: HUVEC ve SH-SY5Y hücre hattı enkapsülasyonunda kullanılan fotomaske ve jel oluşumu.	38
Şekil 3.7: HUVEC ve SH-SY5Y ko-kültüründe kullanılan fotomaske ve jel oluşumu.	39
Şekil 3.8: HUVEC hücre hattı güne bağlı hücre canlılığı grafiği.	41

Şekil 3.9: SH-SY5Y hücre hattı güne bağlı hücre canlılığı grafiği.	41
Şekil 3.10: HUVEC/SH-SY5Y ko-kültürü güne bağlı hücre canlılığı grafiği.	42
Şekil 3.11: MTT hücre canlılık testi hata çubuğu grafiği; HUVEC (mavi), SH-SY5Y (kırmızı), Ko-kültür (yeşil).....	42
Şekil 3.12: 100 µM H ₂ O ₂ ye maruz bırakılmış HUVEC hücrelerinin zamana bağlı hücre canlılığı grafiği.	43
Şekil 3.13: 100 µM H ₂ O ₂ ye maruz bırakılmış SH-SY5Y hücrelerinin zamana bağlı hücre canlılığı grafiği.	44
Şekil 3.14: 100 µM H ₂ O ₂ ye maruz bırakılmış HUVEC. SH-SY5Y ko-kültürünün zamana bağlı hücre canlılığı grafiği.	44
Şekil 3.15: H ₂ O ₂ hücre canlılık testi hata çubuğu grafiği HUVEC (mavi), SH-SY5Y (kırmızı), Ko-kültür (yeşil).....	45
Şekil 3.16: A) 4. gün sonunda SH-SY5Y hücre tipinin büyümesi a) kontrol b) 20 µM c) 40 µM d) 80 µM B) 7. gün sonunda SH-SY5Y hücre tipinin büyümesi a) kontrol b) 20 µM c) 40 µM d) 80 µM.	49
Şekil 3.17: 7. gün sonunda ko-kültür hücrelerinin büyümesi a) kontrol b) 20 µM c) 40 µM d) 80 µM.....	50
Şekil 3.18: İki jel arasındaki geçiş a) Nestin b) DAPI c) aydınlık alan d) birleşme..	50
Şekil 3.19: 4-7 ve 14. gün sonunda immünohistokimyasal görüntülerden elde edilen hücre sayıları ve istatistiksel analizi.....	51

KISALTMALAR

- 3B:** Üç Boyutlu
AFM: Atomik Kuvvet Mikroskobu
ALS: Amiyotrofik Lateral Skleroz
BSA: Bovin Serum Albumin
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
DPBS: Dulbecco's Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
ECM: Ekstraselüler Matriks
FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
H2O2: Hidrojen Peroksit
HRP: Yabanturpu Peroksidaze
HUVEC: İnsan Göbek Kordonu Ven Endotel Hücresi
JelMA: Jelatin Metakrilat
MTT: Metiltiazol Difenil Tetrozolyum
MS: Multipl Skleroz
NB: Nöroblastom
NMR: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
NP: Nanopartikül
PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
RGD: Arjinin Glisin Aspartik Asit
SH-SY5Y: Nöroblastom Hücresi
SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu
STM: Taramalı Tünelleme Mikroskobu
TMSPMA: 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate
UV: Ultraviyole
XRD: X-ışını Difraktometresi

1. GİRİŞ

Doku mühendisliğinin en kısa tanımı çeşitli amaçlarla modelleme yapmak şeklinde ifade edilebilir. Modelleme yaparken, insan vücudunun üç boyutlu yapılara sahip ve çeşitli hücre türlerinden oluşan bir sistem olduğu düşünüldüğünde; en önemli faktörlerden birinin biyomalzemeler ile oluşturulan destek malzemesinin (iskele) oluşturulması olduğu bilinmektedir. Biyomalzeme, hücreler için fiziksel destek sağlamanın yanı sıra işlevsel dokuların oluşumu için gerekli olan kimyasal ve biyolojik özellikleri de taşımaktadır.

Doku mühendisliğinde iskele sistemini oluşturmak amacıyla metalik, seramik, polimerik ve kompozit biyomalzemeler üzerinde çalışılmıştır. Titanyum ve tantalum gibi metalik biyomalzemeler mekanik dayanımları sayesinde genellikle kemik rejenerasyonu çalışmalarında iskele olarak kullanılmıştır. [4; 62]. Karbonlar, alümina, zirkonya ve kalsiyum fosfat gibi seramik biyomalzemeler kalp kapakçıklarında, deri altı cihazlarında, diş protezlerinde; mukavemet ve gözeneklilik gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedirler. [18; 37]. Polimerik biyomalzemelerin ise gerilme dayanımı, elastik modülü ve bozunma hızı genel olarak öngörülebilir ve polimerik biyomalzemeler tekrar üretilebilir mekanik ve fiziksel özellikler gösterirler. Bununla birlikte gözenekli bir yapı elde etmek daha kolaydır. Bu çeşitli özellikleri sayesinde polilaktik asit (PLA) [6], poliglolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL), [91], kitosan, jelatin, jelatin metakrilat gibi polimerik biyomalzemeler, üç boyutlu hücre kültürü çalışmalarında iskele sistemini oluşturmak için tercih edilmektedir [17].

Doku mühendisliğinde, bir veya daha fazla farklı hücre tipleri arasındaki etkileşimler önemlidir. Bu etkileşimlerin rolünü incelemek amacıyla ko-kültür adı verilen bir sistem tanımlanmıştır. Böylece iki ve daha fazla hücre birlikte kültür edilerek çeşitli modeller de yapılabilmektedir.

1.1 Üç Boyutlu Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği hasarlı bir dokunun işlevini yerine getirmek için yeniden modelleme yapmayı amaçlamakta olan interdisipliner bir alandır [51].

Doku mühendisliğinde, iskele yapısına kapsüle edilmek amacıyla kullanılan hedef doku hücrelerine veya farklılaştırma yapılarak elde edilen kök hücrelere onarımı hedeflenen dokuya özgü özellikler kazandırılmaya çalışılmaktadır.

Doku mühendisliğinde;

- İskele yapısına ekilmek amacıyla kullanılacak hücreler
- Büyüme faktörleri
- Biyouyumlu bir malzeme ile üç boyutlu (3B) kültür ortamını sağlama gibi temel olarak üç ana faktör üzerinde durulmaktadır [52].

İki boyutlu hücre kültürü çalışmalarının ardından önemli bir adım olan üç boyutlu hücre kültürü çalışmalarında (üç boyutlu biyomalzeme kullanılması) fizyolojik şartlara uygun olarak hücreler kültür edilmektedir.

Bu faktörler arasında en çok kültür ortamını sağlayacak malzemeler üzerinde durulmuştur. Çünkü doku mühendisliğinde hedefe yönelik olarak kullanılan biyomalzemenin amacı; hücreler arasını dolduran, çeşitli protein ve polisakkaritlerden oluşmuş hücrelerin bulunduğu ortam olan ekstraselüler matriksi (EMC) taklit eden iskele yapısı oluşturmaktır [87]. Bu iskele sistemini taklit ederken göz önünde bulundurulması gereken çeşitli parametreler bulunmaktadır [5]. Bu parametreler;

- Biyobozunurluk
- Biyouyumluluk
- Gözeneklilik
- Hedeflenen doku veya organın mekanik özelliklerine uygunluk
- Nontoksik, nonmutajenik, nonimmunojenik özellikler şeklindedir [91].

1.2 Polimerler

Doku mühendisliği çalışmalarında ekstraselüler matriksi taklit etmek için çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. Bu malzeme gruplarından birisi de polimerlerdir.

Polimerler monomer adı verilen görece küçük moleküllerin tekrar etmesiyle oluşan zincirli yapılardır. Doğal ve sentetik olmak üzere iki ana grupta incelenmektedirler.

Sentetik polimerler monomerlerin polimerize edilmesiyle elde edilmektedirler. Polilaktik asit, poliglikolik asit, polietilen ve polipropilen sentetik polimerlere örnek verilebilir. Doğal polimerler ise bitkilerden mikroorganizmalardan ve hayvanlardan elde edilmektedirler. Kollajen, kitin, jelatin, kitosan ise doğal polimerlere örnektir [73]. Çeşitli polimer yapıları beraberinde üretim farklılıkları getirmiştir. Gözenekli yapıda, biyobozunur, toksik etki oluşturmayan, hücre çalışmalarında yapı iskelesi olarak kullanılacak polimerin üretim yöntemleri Tablo 1.1’de verilmiştir [5].

Tablo 1.1: Polimerlerin üretim yöntemleri.

Üretim Yöntemi	İşleyiş
Dondurarak Kurutma	Gözenekli yapıda polimerlerin elde edilmesini sağlayan yöntemdir. Polimer belirli bir konsantrasyonda çözücü içerisinde çözünür. Oluşan çözelti dondurulur ve ardından yüksek basınç yardımıyla liyofilize edilir.
Elektroegirme	Belirli bir voltaj uygulanarak polimerin fiber şeklinde toplayıcıda birikmesi sağlanmaktadır.
Gaz Köpüklendirme	Yüksek basınç yardımıyla CO ₂ gazı kullanılarak polimer doygun hale getirilir. Ardından çözelti içerisinde gaz uzaklaştırılır.

1.2.1 Hidrojeller

Son 50 yıldır hidrojeller, geniş uygulama alanlarındaki avantajları sayesinde dikkat çekmektedirler [1].

Araştırmacılar, yıllar geçtikçe hidrojelleri farklı şekillerde tanımlamışlardır. Bunlardan en yaygın olanı, hidrojel, bir veya daha fazla monomerin basit reaksiyonuyla üretilen suda şişen ve çapraz bağlanmış polimerik ağ olmasıdır. Başka bir tanım, suyun önemli bir kısmını kendi yapısında şişirme ve muhafaza etme yeteneği sergilemekle birlikte suda çözülmeyen bir polimerik malzeme olmasıdır [1].

Hidrojeller, büyük miktarlarda su veya biyolojik sıvıları emebilen üç boyutlu, hidrofilik, polimerik ağlardır. Yüksek su muhtevası, gözenekliliği ve yumuşak kıvamı nedeniyle, doğal canlı dokuyu diğer sentetik materyallerden daha fazla taklit ederler.

Hidrojeller kimyasal olarak kararlı olabilir veya bozulabilir ve sonunda parçalanabilir ve çözülebilir [12].

Hidrojeller bu özelliklerinin yanı sıra hücre özellikleri bakımından, mekanik özellikleri doğal dokulara benzerken, oksijen, besin maddeleri ve diğer suda çözünebilir metabolitlere karşı yüksek geçirgenlik sergilediklerinden, hücre enkapsülasyonu için kullanılmıştır [95].

Hidrojellerin su emme kabiliyeti, polimer omurgasına bağlı hidrofilik işlevsel gruplardan kaynaklanırken, çözünme direnci ağ zincirleri arasındaki çapraz bağlardan kaynaklanmaktadır [1].

Hidrojel hazırlamada kullanılan teknolojiler

Hidrojeller genellikle hidrofilik monomerler temelinde hazırlanırken, hidrofobik monomerler bazı uygulamalar ile özelliklerinin düzenlenmesi sonucu hidrojel hazırlamada kullanılabilir [1].

1.2.2 Hidrojel hazırlamada kullanılan teknolojiler

Hidrojeller sentetik polimerlerden veya doğal polimerlerden hazırlanabilir. Doğal ve sentetik kökenli suda çözünür doğrusal polimerler, çeşitli şekillerde hidrojel oluşturmak üzere çapraz bağlanır [1].

Jelleşme işlemini gerçekleştirmek için;

- Kütle Polimerizasyon
- Çözelti Polimerizasyonu/Çapraz Bağlama gibi iki temel yöntem bulunmaktadır [1].

Kütle polimerizasyonu monomerlerin doğrudan doğruya uygun bir başlatıcı varlığında sıcaklık ve basınç ile polimerizasyonuna dayanmaktadır. Bununla birlikte polimerizasyonun sonuna doğru viskozitedeki artış ve ısı aktarımındaki dağılım sorunları yöntemin dezavantajlarından [80].

Çözelti polimerizasyonu ise monomer, çözücü ve başlatıcının varlığında monomerin reaksiyona katılmayan bir çözücü içinde dış bir kaynak ile etkinleştirilmesi ile polimerleştirilmesidir. Çözelti kullanılması ortamın seyrelmesini sağladığından viskozitenin düşmesini ve ısı aktarımının kolaylaşmasını sağlamaktadır [80]. Çözelti polimerizasyonu ile çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilirken kullanılan başlatıcılar

belirli bir dalga boyunda yüksek emilime sahip olabilir. Bu durumda fotopolimerizasyondan söz edilebilmektedir.

Fotopolimerizasyon tekniği, kontrol edilebilir parametreleri, nispeten daha az toksisite ve hafif jelleşme koşulları sayesinde, hücrelerin foto çapraz bağlı hidrojeller içinde kapsüllenmesine ve canlı kalmasına izin vermektedir [81]. Bu nedenle **fotopolimerizasyon** yöntemi hücre enkapsülasyonunda en çok tercih edilen yöntemdir. Bu çalışmada da jelleştirme işlemi sırasında fotopolimerizasyon tekniği kullanılmıştır.

1.2.2.1 Fotopolimerizasyon ve tekniği

Fotopolimerizasyon, polimerlerin ışığa maruz kalmadan önce akrilatlar veya metakrilatlar ile reaksiyona sokulduğu bir tekniktir. Daha sonra, bir foto-başlatıcı madde varlığında ve dış bir uyarı olarak ışık ile foto çapraz bağlanma meydana getirilmektedir [68].

Işınımın uygun ışık dalga boyu ile birleşmesi ve ışığı emen farklı maddelerin varlığı, fotopolimerizasyonu başlatır.

En yaygın olarak kullanılan reaktif monomerlik malzemeler, radikal bir foto-başlatıcının kullanımı ile çapraz bağlanacak şekilde yapılabilen düşük moleküler ağırlıklı doymamış akrilat veya metakrilat monomerlerdir [74].

Foto-başlatıcı, hidrojel öncü çözeltisinde (monomer ya da makromer) çözündürülür ve uygun bir ışık kaynağına maruz kaldığında, öncü çözelti hidrojel haline dönüştürülür [21].

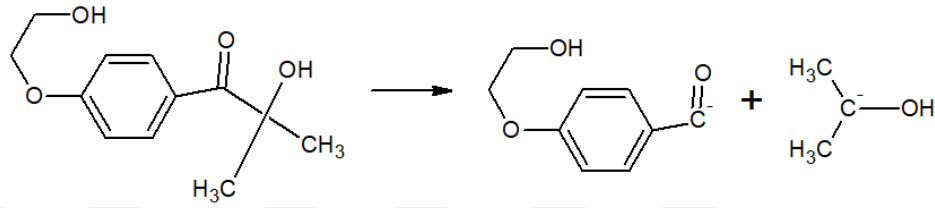
Şu zamana kadar fotopolimerizasyon için yüksek enerjili radyasyon, ultraviyole (UV) radyasyonu ve görünür ışık radyasyonu üzerinde durulmuştur. Doku mühendisliğinde hücre canlılığı göz önünde bulundurulduğunda UV radyasyonunun daha iyi sonuç verdiği görülmüştür [49].

1.2.2.2 Fotobaşlatıcı

Fotopolimerizasyonda kullanılan belirli bir ışık dalga boyunda yüksek emilime sahip olan foto-başlatıcılar biyoyumluluk, suda çözünürlük, stabilite ve sitotoksite özelliklerine dikkat edilerek seçilmektedir [68].

Son on yılda, daha iyi foto polimerizasyon sağlamak için çeşitli foto-başlatıcılar araştırılmıştır.

Hücre kapsülleme için en çok kullanılan UV foto-başlatıcı, Şekil 1.1'de kimyasal formülü verilen 1-[4-(2-hidroksietoksi)-fenil]-2-hidroksi-2-metil-1-propanon'dur (AKA Irgacure 2959). Diğer birinci sınıf foto-başlatıcılar arasında en yüksek su çözünürlüğüne sahip olmasına rağmen, optimum koşullarda su çözünürlüğü % 2'den de daha azdır [66].



Şekil 1.1: Irgacure kimyasal formülü.

1.2.3 Doku mühendisliğinde fotopolimerleştirilmiş hidrojeller

Doku mühendisliğinde fotopolimerleştirilmiş hidrojellerin üç ana uygulama alanı bulunmaktadır. Bunlar ilaç taşıma sistemi [57], yaralanmaların sonrasındaki iyileşme sürecinde bariyer olarak hidrojeller [38] ve hücre enkapsüllemidir [14].

İlaç Taşıma Sistemi; Hidrojellerin benzersiz fiziksel özellikleri, ilaç dağıtım uygulamalarında kullanımlarında özel bir ilgi uyandırmaktadır. Gözenekli yapıları ve jel matrisindeki çapraz bağlarının yoğunluğu ve şişirildikleri sulu ortam içindeki afinitelerinin kontrol edilmesiyle kolaylıkla ayarlanabilir. Gözeneklilikleri aynı zamanda ilaçların jel matrisine yüklenmesine ve sonradan ilaç salımının, jel molekülü vasıtasıyla küçük molekülün veya makromolekülün difüzyon katsayısına bağlı bir hızda olmasına izin verir [35].

Hidrojel bariyerleri hasarlı doku yüzeyleri üzerinde bir kaplama makromerleri olarak biyo-bozunabilir poli(etilen-glikol-ko-laktik asit) diakrilatlardan yapılmıştır [44].

Hidrojel malzemesinin oksijenin, besin maddelerinin ve metabolik ürünlerin kolay bir şekilde difüzyonuna olanak sağladığı sonucuna varıldığından hücre enkapsülasyonu için foto-polimerize hidrojellerin kullanımı araştırılmıştır [68]. Biyolojik olarak türetilmiş hidrojellerden örneğin kollajen [75], jelatin metakrilat [20], hiyalüronik asit

(HA) [11], agaroz [42] ve sentetik hidrojellerden örneğin Poli(etilen glikol) (PEG) [32] hücreleri kapsüllemek için kullanılmıştır.

1.2.4 Kollajen

Doku mühendisliğinde temel amacın hücrelerin bulunduğu ekstraselüler matriksi (ECM) taklit eden ideal bir iskelenin oluşturulması olduğundan bahsetmiştik. Bu amaçla da mekanik bütünlük ile fonksiyonel doku oluşturmak üzere hücreleri uyarmak için doğal hücre dışı matrikse ideal olarak benzeyen hidrojeller kullanılır [47].

ECM, hiyalüronik asit, kondroitin sülfat gibi glikozaminoglikanlar [40] ile kollajen, fibronektin, elastin ve laminin gibi lifli proteinler olan iki ana makromolekülden oluşmaktadır [3].

Kollajen, en yaygın kullanılan doku kaynaklı doğal polimerdir ve deri, kemik, kıkırdak, tendon ve ligament dâhil olmak üzere memeli dokularının hücre dışı matrislerinin ana bileşenidir [55].

Bununla birlikte kollajenler hücreler tarafından tanınan ve hücrelerden salgılanan enzimler (kollajenaz) tarafından ayrıştırılan aminoasit dizilerinin belirli dizilimlerinden meydana geldiğinden, biyolojik tasarım parametrelerinin birçok kısmını karşılamaktadırlar [84].

Ancak fiziksel olarak oluşturulmuş kollajen jeller termal olarak tersinirdir ve sınırlı bir mekanik özellik aralığı sunmaktadırlar [55].

1.2.5 Jelatin

Jelatin ise ilaç endüstrisinde ve biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılan ve kıkırdak, kemik, deri ve bağ dokusunun başlıca protein bileşeni olan ve hayvanlarda ECM'lerin büyük bölümünü oluşturan hidroliz yoluyla elde edilen bir kollajen türevidir [59] ve bileşimi kollajen ile hemen hemen aynıdır [8]. Temel olarak biyoyumluluk, düşük maliyet ve jelasyon kolaylığı nedeniyle tercih edilmektedir [27; 45].

İki tip jelatin vardır; jelatin A ve jelatin B. Jelatin A, termal denatürasyon öncesi asidik işleme hazırlanırken, jelatin B, yüksek bir karboksilik içeriğe yol açan alkali muameleyle işlenir [36]

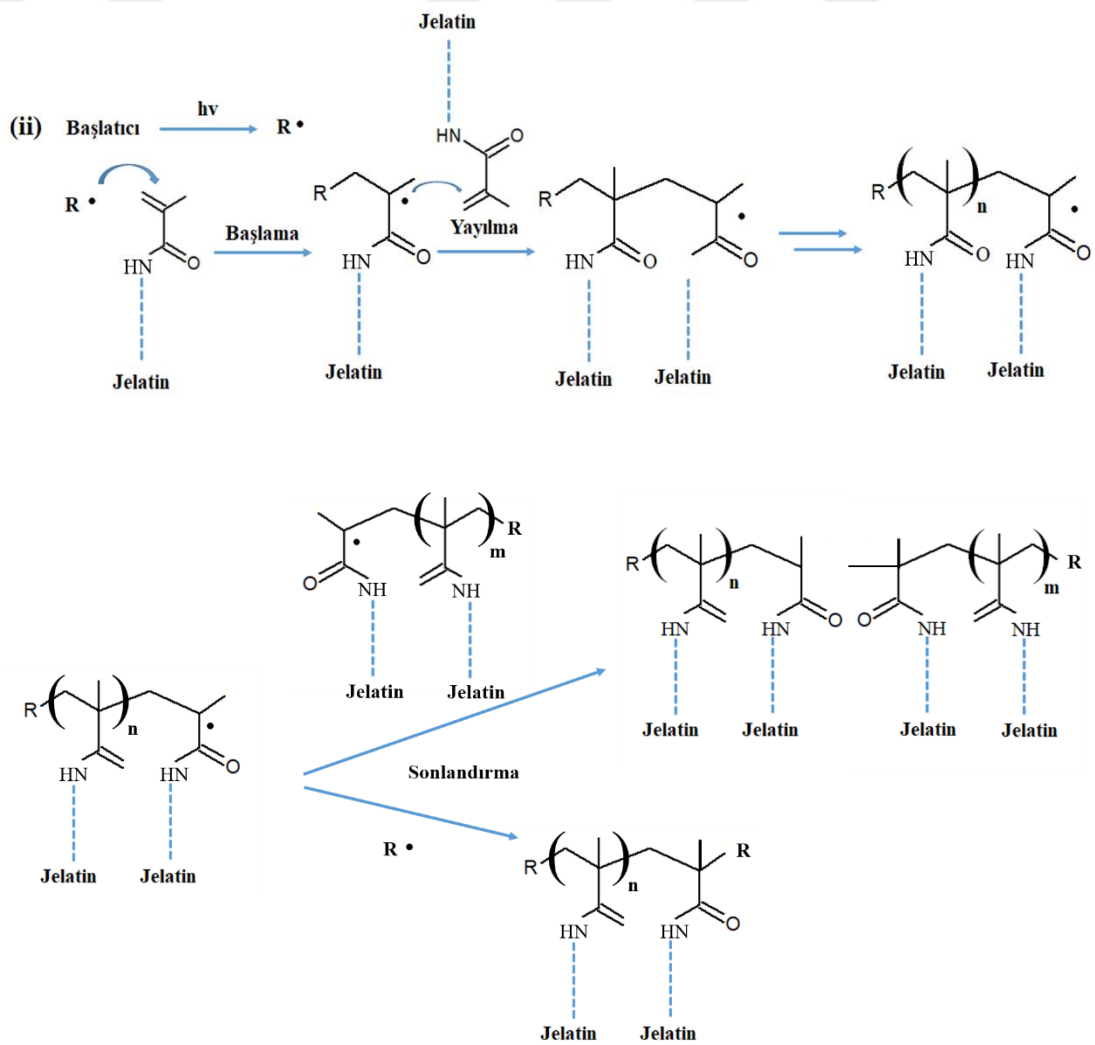
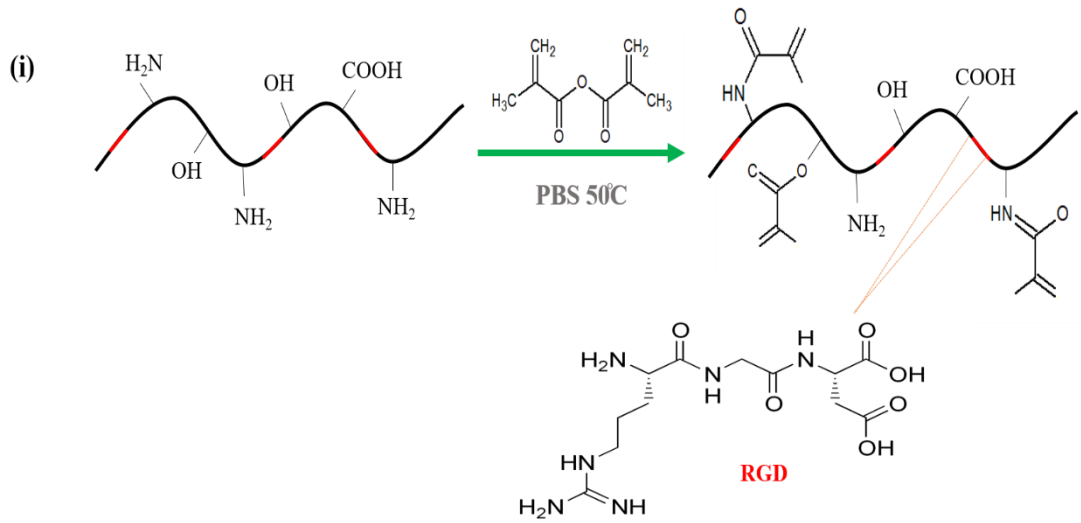
Ancak jelatini bir biyomateryal olarak kullanmak için, vücut ısısındaki kararsızlığının kovalent çapraz bağlama yöntemleri ile giderilmesi gerekmektedir [78].

1.2.6 Jelatin metakrilat

Jelatin metakrilat (JelMA), ekstraselüler matriks bileşenlerinden oluşan ve hali hazırda yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu için üç boyutlu (3B) iskeleler dahil olmak üzere birçok uygulamada kullanılan fotopolimerize edilebilir bir hidrojeldir [77].

Foto-çapraz bağlama işleminin foto-başlatıcı molekülleri ile ışığa maruz kaldığında yeni bağlar oluşturan metakrilat ya da akrilat moleküllerinin varlığını gerektirdiğini söylemiştik. JelMA da, metakrilamid ve metakrilat gruplarından oluşan bir jelatin türevidir [50]; jelatin molekülü üzerindeki çoklu metakrilat gruplarından oluşur ve bir foto başlatıcı ilave edildiğinde ve bu radikal vasıtasıyla hafif polimerize edilebilir hale gelmektedir [13].

JelMA sentezi için farklı protokoller rapor edilmiştir. Bunlardan esas olarak Van Den Bulcke ve arkadaşları tarafından bildirilen genel bir yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemde göre JelMA, jelatinin, 50°C'de fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içindeki bir metakrilik anhidrid ile doğrudan reaksiyonu şeklindedir [89]. Şekil 1.2'de JelMA sentezini anlatan bir görsel bulunmaktadır [93].



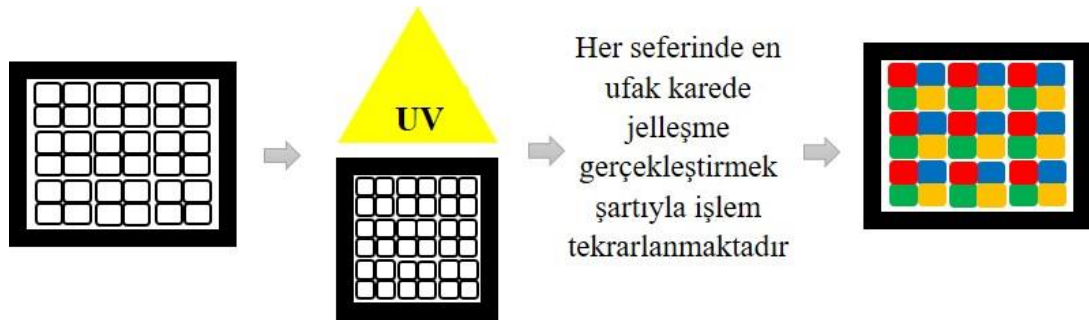
Şekil 1.2: Foto çapraz bağlı JelMA hidrojel oluşumunun şematik gösterimi.

(i) Metakriloil sübstitüsyon gruplarının aşılması için jelatin ve metakrilik anhidrit reaksiyonu meydana gelmektedir. Bu aşamada modifikasyon, birincil amin ve hidroksil gruplarında gerçekleşmektedir. Arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) alanları, JelMA zincirleri boyunca kırmızı bölümler olarak kimyasal yapıları ile birlikte de verilmektedir. (ii) Hidrojel ağları oluşturmak için JelMA'nın foto çapraz bağlanması sırasında temsili tepkimeler verilmiştir. Burada serbest radikaller, metakriloil ikamelerinin zincir polimerizasyonunu başlatan fotobaşlatıcılardan üretilmektedir. Yayılma, aynı zincir üzerinde ve farklı zincirlerde bulunan metakriloil grupları arasında gerçekleşmektedir. Sonlandırma ise iki yayılan zincir arasında veya bir propagasyon zinciri ve bir ikinci radikal arasında oluşmaktadır.

1.2.7 Üç boyutlu JelMA üretimi

Bir doku veya organı modellemeye çalışırken, vücuttaki doku ve organların çevresindeki üç boyutlu (3B) ortam düşünülerek sistem tasarlanmalıdır.

3B ortamı destekleyici yapı olarak daha önce özellikleri anlatılan JelMA kullanılabilir ve 3B üretim için UV ışın kaynağı kullanılarak foto-çapraz bağlama gerçekleştirilmektedir. Bu işlem gerçekleştirilirken kullanılan ışığın belirli bir bölgeden geçmesine izin veren fotomaske yapıları kullanılmaktadır. Bu yapıların kullanılması çeşitli geometrilerin oluşturulmasına sağlamakta ve farklı hücre tipleri üzerinde çalışılmasına olanak tanımaktadır (Şekil 1.3) [31].



Şekil 1.3: 3B JelMA üretimin basite indirgenmiş şematik gösterimi.

1.3 Ko-Kültür Sistemi

Hücre-hücre etkileşimleri doku ve organ gelişiminde önemlidir ve hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve fizyolojisini etkiler [7]. Doku mühendisliğinde, hücre-hücre iletişimi ve farklı hücre tipleri arasındaki etkileşimlerin rolünü incelemek için ko-

kültür sistemi tanıtılmıştır [24]. Temel düzeyde, bir ko-kültür, iki ya da daha fazla farklı hücre popülasyonunun, aralarında bir derecelik temas ile büyütüldüğü bir hücre yetiştirme düzeneği olarak tanımlanmaktadır [28].

İlk ko-kültür çalışmasında sıçan yumurtalık granulosa hücreleri ile fare miyokart hücreleri üzerinde çalışılmıştır [54].

Ko-kültür işlemini gerçekleştirirken göz önünde bulundurulması gereken bazı parametreler vardır. Bunlar;

- Kültür ortamının ve hücrelerin seçimi
- Hücrelerin ekim prosedürü
- Hücre tipi karakterizasyonu şeklinde ifade edilebilmektedir [46].

Bu konuda, Homilton ve arkadaşları hücre-hücre teması olan ve olmayan ko-kültürün etkilerinin araştırılmasında yeni bir 3B hidrojel bazlı ortak kültür modeli geliştirirler. Bu sistem ile farklı hücre popülasyonlarının mekânsal düzenini ve zamansal dağılımını kontrol etmek mümkün kılınmıştır [33].

1.4 Endotel Hücreler

1.4.1 Tarihi

1628 yılında William Harvey ilk defa kan dolaşımı kelimesini tanımladı. Ardından Malphighi, damar ağının varlığını ileri sürdü. Reckingausen 1800'lü yılların ortasında damarların içi boş tünellerden var olmadığını, hücrelerin damar iç kısımlarını sardığını keşfetti. 1900'lü yıllarda ise Gowan'ın fizyolojik çalışmaları ve Palade'nin elektron mikroskopisi alanlarındaki çalışmaları sonrasında, endotel hücreleriyle kan damarlarının çeşitli işlevleri keşfedilmeye başlandı [25].

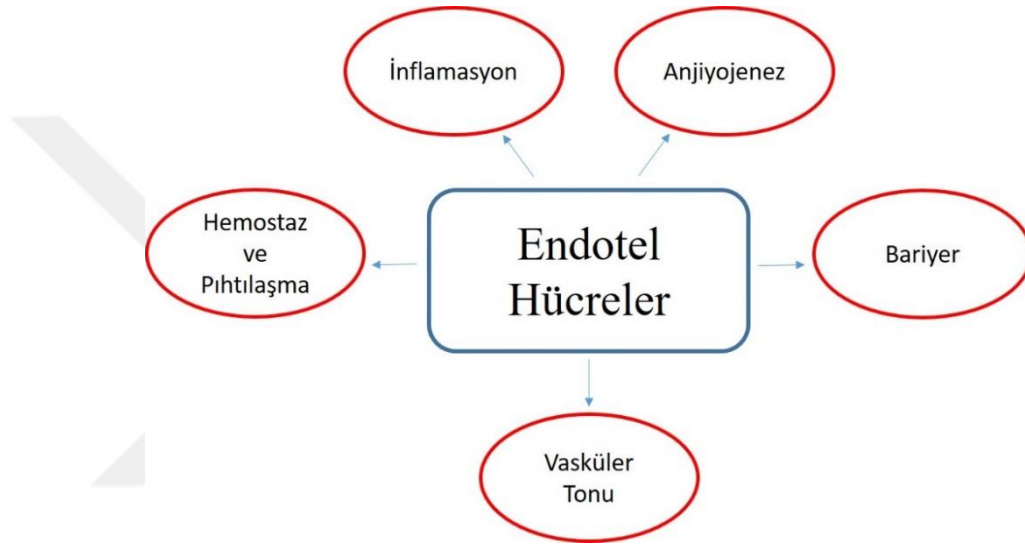
1.4.2 Tanımı

Kan damarlarının ve lenfatik damarların iç yüzeyini kaplayan ve lümen içinde dolaşımdaki kan veya lenf ile damar duvarının geri kalan kısmı arasında bir arayüz oluşturan hücreleri belirtir [22].

1.4.3 Fonksiyonu

Uzun süre boyunca endotel hücreleri, vasküler boşluğu interstisyumdan ayırmak için sadece etkisiz bir bariyer oluşturan ve homojen olmayan bir hücre popülasyonu olarak

kabul edildi. 1966 da ise Florey bu inançlara meydan okudu ve endotelin bir çekirdeklenmiş selofan tabakasından daha fazlası olduğunu ileri sürdü [26]. Yaklaşık 25 yıl önce, endotelin vasküler düz kas tonusunu ve pıhtılaşmasını düzenlemeye katıldığı yönündeki çığır açan araştırmalar endotelyumun sadece pasif bir bariyer olduğu kanısını ortadan kaldırmaktadır [76]. Kan ve dokular arasındaki arayüzde yer alan endotel hücreler, Şekil 1.4’de verildiği üzere vasküler tonu, bariyer, hemostaz ve pıhtılaşma, enflamatuar tepkiler ve anjiyogenez dâhil, birçok kritik fonksiyonlar için merkezi bir rol oynamaktadırlar [64].



Şekil 1.4: Endotel hücrelerin çoklu fonksiyonu.

1.4.4 İnsan göbek kordonu ven endotel hücresi (HUVEC)

HUVEC (Şekil 1.5), doğumdan sonra atılan bir dokudan da temin edilebildiği için kolay ve ucuz bir şekilde bulunabilir. Ayrıca endotel hücrelerinin temel özelliklerini barındırdığından in vivo endotel tabakasına oldukça iyi bir modeldir. Bununla birlikte geniş yüzeye sahip ve dallanma yapmayan damar olması özelliğiyle de çalışılması kolay bir hücre hattıdır [92].



Şekil 1.5: HUVEC hücre hattı.

1.5 Nöroblastoma Hücreleri

Nöroblastom (NB) hücre hatları, temel ve uygulamalı nörobiyolojinin çeşitli yönlerini incelemek için in vitro modelde yaygın olarak kullanılan bir hücredir [83].

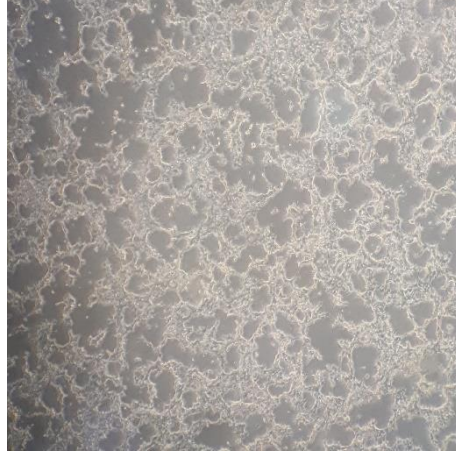
Nöroblastom en sık görülen ikinci çocukluk çağı solid tümörüdür ve pediatrik tümörlerin % 10-15'ini oluşturmaktadır. [10].

NB, periferik sinir sisteminin bileşenlerini taşıyan ve göç eden sinir kretinden türetilen progenitör hücrelerden kaynaklanmaktadır [83].

NB tümörleri yüksek derecede metastatiktir ve radyasyon veya kimyasal tedavi gibi geleneksel tedavilere dirençlidir. Farklılaşmanın indüksiyonu ve daha yakın zamanda apoptoz NB'nin klinik yönetiminde iyileşme için araştırılan stratejilerdir [83].

1.5.1 İnsan nöroblastoma hücre hattı (SH-SY5Y)

SH-SY5Y (Şekil 1.6), SK-N-SH nöroblastom hücre hattından türetilen üç alt-klonlanmış bir hücre çizgisidir. Nörodejeneratif bozukluklar için bir model görevi görür, çünkü hücreler belirli bileşiklerin eklenmesiyle çeşitli fonksiyonel nöronlara dönüştürülebilir. Ek olarak, SH-SY5Y hücre çizgisi, nöronal farklılaşma, metabolizma ve nörodejeneratif işlemlerle ilgili fonksiyon, nörotoksisite ve nöroproteksiyonun analizi dâhil olmak üzere deneysel nörolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmıştır [48].



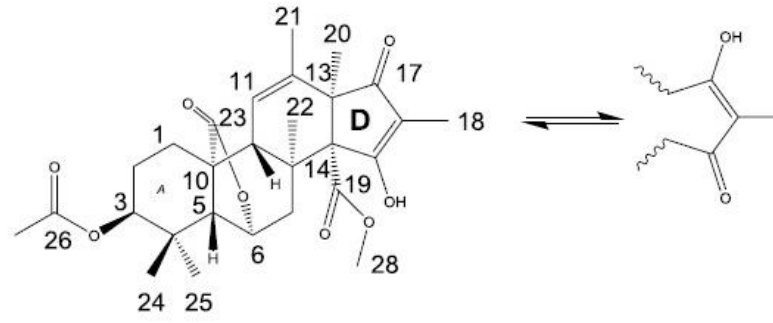
Şekil 1.6: SH-SY5Y hücre hattı.

1.6 Citreohybridonol

Nöroinflamasyon; mikrogliya, astrositler ve kan beyin bariyerine katılan endotel hücrelerinin aktivasyonunu, plazma proteinlerinin ve immün sistem hücrelerinin beyin dokusuna infiltrasyonunu ve inflamasyon ilişkili mediatörlerin beyin dokusuyla etkileşimini içeren karmaşık bir olaydır [2].

Nöroinflamasyon, beyin içinde nöronal hasara yol açan ve Alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS), HIV ile ilişkili demans, inme ve multipl skleroz, epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklarda önemli bir mekanizmadır [16].

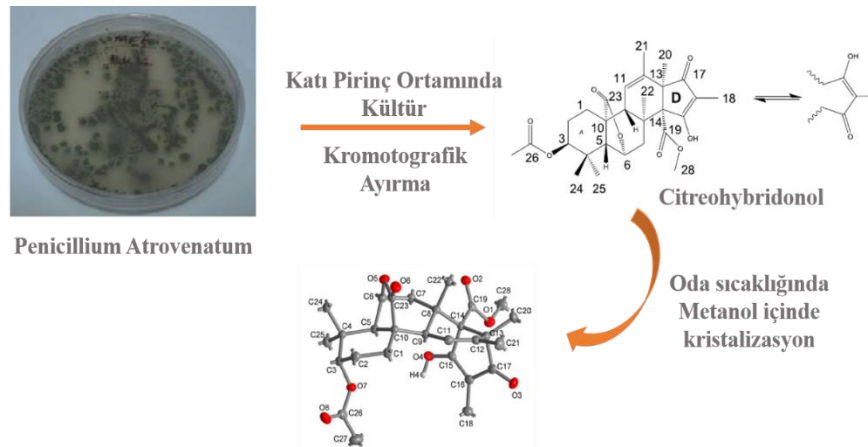
İlk kez Cho ve arkadaşları tarafından 2016 yılında sünger türevi *Penicillium Atrovenetum*'un katı pirinç kültürlerinden izole edilen ve Şekil 1.7'de yapısı verilen Citreohybridonol'ün aktif BV-2 hücreleri üzerindeki anti-nöroinflamatuvar aktivitesi gözlemlenmiştir. Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD) ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nöroinflamasyon ile bağlantılı hastalıkların tedavisi için ajanların geliştirilmesine katkıda bulunabileceğine varılmıştır [15].



Şekil 1.7: Polar çözücülerdeki citreohybridonol keto-enol totomerlerinin yapıları [70].

1.6.1 Citreohybridonol izolasyonu

Tez kapsamında kullanılan citreohybridonol molekülünün izolasyon süreci Şekil 1.8’de verilmiştir. Buna göre ilk olarak Çanakkale’nin Kömür Limanı kıyılarından 10 m derinlikten scuba dalışı ile çıkarılan *Spirastrella cunctatrix* süngerinden *Penicillium atrovenetum* suşu izole edilmiştir. Suş, katı pirinç ortamında inkübe edilmiştir. Kültivasyon işlemi sonrasında özütleme ve kurutma işlemleri yapılmıştır. Bu şekilde elde edilen özütten bileşenlerin, biri hareketli diğeri sabit iki faz arasında ayrılması ve saflaştırılması işlemi olan kromatografik ayırma işlemi yapılmıştır. Bu şekilde elde edilen citreohybridonol molekülü metanolde çözdürülmüş ve oda sıcaklığında kristallenmesi için kurutulmuştur [70].



Şekil 1.8: Citreohybridonol molekülünün elde edilme süreci.

Citreohybridonol molekülüne ait tek kristal X-ışını sonuçları ise Tablo 1.2’de verilmektedir.

Tablo 1.2: Citreohybridonol molekülü kristal verileri.

Molekül formülü; C ₂₈ H ₃₆ O ₈	$a = 1,07496(5) \text{ nm}$, $b = 1,43286(7) \text{ nm}$, $c = 1,74909(8) \text{ nm}$
Moleküler ağırlığı; 506,9 g/mol	$\beta = 103,235(2)^\circ$; $V = 2,6225(2) \text{ nm}^3$
Kristal yapısı; monoklinik	Topolojik polar yüzey alanı; $1,16 \text{ nm}^2$
Uzay grubu; P2 ₁	$Z = 2$; $D_{\text{calcd}} = 1,280 \text{ g/cm}^3$

Polar yüzey alanı, bir ilacın hücrelere nüfuz etme yeteneğinin optimizasyonu için yaygın olarak kullanılan bir tıbbi kimya ölçümüdür. 140 \AA^2 ($1,4 \text{ nm}^2$) daha büyük polar yüzey alanına sahip olan moleküler hücre zarlarından nüfuz ederken zayıf olma eğilimindedirler [71]. Bununla birlikte moleküllerin kan-beyin bariyerini aşması (ve böylece merkezi sinir sistemindeki reseptörlere etki etmesi) için genellikle 90 \AA^2 den ($0,9 \text{ nm}^2$) daha küçük olması gerekmektedir [34].

1.7 Nanobilim ve Nanoteknoloji

Richard P. Feynman'ın Aralık 1959'da Pasadena'daki Amerikan Fizik Derneği'ne sunduğu konuşma metninde, ilk defa maddenin atomik katmanda işlenebilmesi olasılığından bahsetmiştir. Bu durum nanoteknolojinin temellerini atmıştır [23].

Literatürde “nanoteknoloji” nin çok sayıda tanımı bulunmaktadır. Ancak ilk nanoteknoloji kelimesini 1974 yılında Japonya Tokyo Bilim Üniversitesinden Profesör Taniguchi söylemiştir ve nanoteknolojiyi, “1 nanometre (nm) yani 10^{-9} metre uzunluğunda hassaslık ve incelikte ekstra yüksek doğruluk ve ultra ince boyutlar elde etmek için üretim teknolojisidir” şeklinde tanımlanmıştır [85]. Bir diğer tanım ise nanometre ölçeğinde şekil ve büyüklüğü kontrol ederek yapıların, cihazların ve sistemlerin tasarımı, karakterizasyonu, üretimi ve uygulamasıdır. Nanobilimin tanımı da, atomik, moleküler ve makromoleküler ölçeklerde malzemelerin fenomenlerin incelenmesi şeklindedir [82].

1.7.1 Nanomalzemeler

Bir nanoteknoloji konusu olarak nanoyapılı malzemeler, en az bir yönde bir mikron altı veya nano ölçekli yapı birimlerinden oluşan ve boyut etkilerini sergileyen düşük

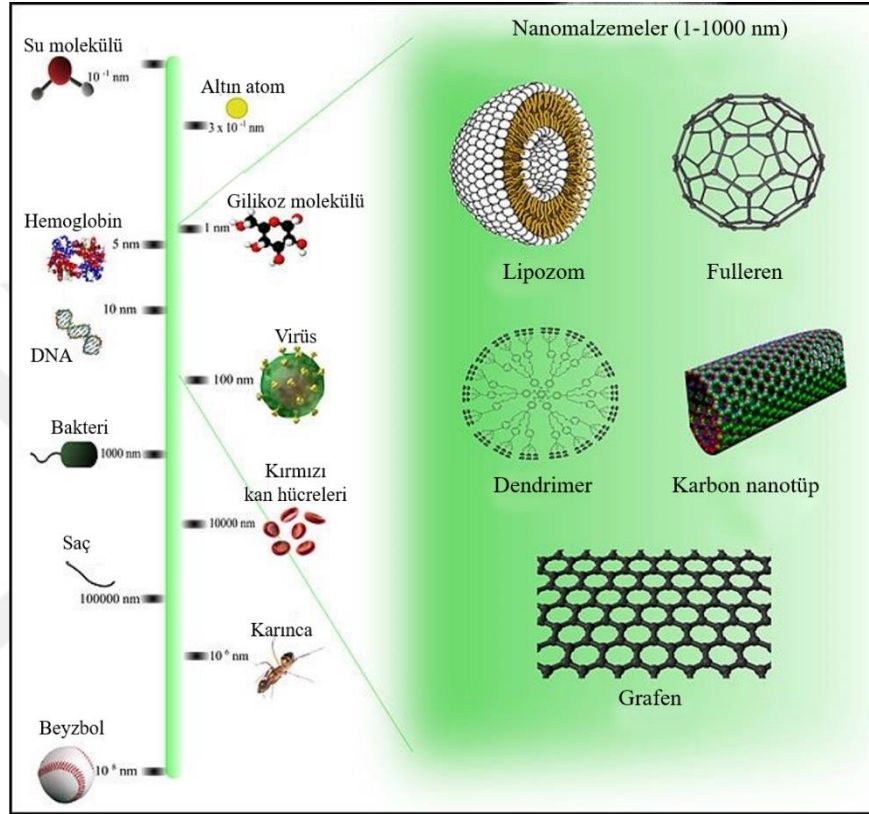
boyutlu malzemelerdir. Nanoyapılı malzemeler şekillerine bağlı olarak, sıfır-boyutlu, bir-boyutlu, iki-boyutlu ve üç-boyutlu olarak sınıflandırılmaktadır. Nanopartiküller, sıfır-boyutlu; tabakalı yapılar, bir-boyutlu; tel veya tüp yapılar, iki boyutlu ve kütleli yapılar ise üç-boyutlu nanoyapılardır [88].

Nanopartiküller (NP) genellikle 100 nm'den daha az olan en az bir boyuta sahip parçacıklı madde olarak tanımlanmaktadır [53]. Ve bu nanopartiküller, nano boyutlu malzemelerin ve nano teknolojinin temelini oluşturmaktadırlar [65]. NP'ler, morfolojilerine, boyutlarına ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak geniş ölçüde çeşitli kategorilere ayrılmaktadır [53]. Örneğin, karbon bazlı, metalik, seramik, yarıiletken, polimerik ve lipit bazlı nanopartiküller [43]. Yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları nanoparçacıklara üstün özellikler sağlamaktadır. Bu özelliklere yüksek yayılım, mukavemet, düşük yoğunluk, yüksek elektrik direnci, özgül ısı gibi özellikler örnek verilebilmektedir [61].

1.7.2 Bir partikülün nanoparçacık/molekül olarak adlandırılması

Bir partikülün nanopartikül veya molekül olarak adlandırılmasıyla ilgili farklı yaklaşımlar vardır. Bu yaklaşımlardan biri adlandırmanın boyuta bağlı olmasıdır. Bu yaklaşımda genellikle bir molekülün pikometre aralığında olduğu üzerinde durulmaktadır. Örneğin bir karbon-karbon bağı 154 pikometredir, bu nedenle çoğu molekülün 100-1000 pikometre (0,1 ila 1 nanometre) aralığında olması beklenmektedir. Ayrıca bir ribozom veya deoksiribo nükleik asit (DNA) gibi büyük bir molekül 10-1000 nanometre aralığındadır. Dolayısı ile bu aralığa düşen her şey, doğası gereği "nano" boyuttadır. Diğer bir yaklaşım ise adlandırmanın boyuttan bağımsız olmasıdır. Yani genellikle, nanopartiküller birkaç nm ila 100 nm'dir ve çoğu molekül daha küçüktür. Bununla birlikte yüksek moleküler ağırlıklı bir polimerin tek zinciri veya bir DNA molekülü 100 nm'den çok daha büyük olabilmekte ve bu da konvansiyonel "nano" aralığının dışına çıkmaktadır. Bu durum da adlandırmadaki ayrımı biraz bulanıklaştırmaktadır ve beraberinde bir fullerenin bir molekül mü yoksa nanopartikül mü olduğu veya neden polistrenin "molekül" ve bir karbon nanotüpün "nanoparçacık" olarak adlandırıldığı şeklindeki soruları sordurmaktadır. Bu soruların cevabı olarak ise partikülün "gri alanda", nasıl davrandığı ve nasıl kullanıldığı ile ilgili olduğu öngörülmektedir. Bir başka ifadeyle daha büyük parçacıklar gibi (nitel olarak)

aynı şekilde davranırsa ve benzer şekilde kullanılabilirse, genellikle nanoparçacık olarak adlandırılmaktadır. Bir şey katı veya sıvı bir malzeme oluşturmak için birbirine yapışır ise de genellikle bir molekül olarak adlandırılmaktadır [90]. Nanomalzemelerin boyutlarının diğer ortak malzemelerle karşılaştırıldığı görsel Şekil 1.9'da verilmektedir.



Şekil 1.9: Nanomalzeme boyutları [72].

1.7.3 Doku mühendisliğinde nanopartiküller

Nanopartiküller üstün özelliklerinden dolayı doku mühendisliğinde en çok kullanılan nanoyapıların başında gelmektedirler. Nanopartiküller tanımında da bahsedildiği gibi 100 nm'den daha küçük olma özelliklerinden dolayı hücre içine alınabilmektedir ve bu sayede de hücre görüntülemesini mümkün kılmaktadırlar. Bunun yanı sıra yine boyut özelliklerinden dolayı çökelti oluşturmadan kan dolaşımında hareket edebilmektedirler. Bu hareketleri sayesinde de taşıma ve salınım işleminde kullanılabilirler [29].

Nanopartiküller çeşitli alanlarda kullanılabilmek için amaca yönelik olarak kaplama işlemine de tabi tutulabilmektedir. Örneğin kaplama sayesinde çeşitli peptid yapılarının ya da antikoların nanopartikül yüzeyine bağlanması sağlanabilmektedir [29].

1.7.4 Nanopartiküllerin hücreye girişi

Nanopartiküller hücrelere fagositoz ve pinositoz olmak üzere iki ana mekanizmaya bölünmüş endositozla girer. Fagositoz, daha büyük parçacıklar (> 500 nm) için tercih edilen alımdır, pinositoz ise daha küçük nanopartiküllerin hücreye alımından sorumlu mekanizmadır. Endositoza üç ana mekanizmanın hakim olduğu söylenebilmektedir. Bunlar, fagositoz, pinositoz (makropinositoz, mikropinositoz) ve klatrin bağımlı endositoz (reseptör aracılı endositoz) şeklinde ifade edilmektedir [94].

Fagozitoz: Hücre zarında oluşan yalancı ayaklar taşınacak maddeyi tamamen sarmaktadır. Bu şekilde oluşan yapı zardan koparak ayrılmaktadır. Ayrılan kısım besin kofulu olarak stoplazma vasıtasıyla lizozomla birleşmekte ve burada sindirim gerçekleşmektedir [79].

Makropinositoz: Diğer endositoz yolları ile mümkün olmayan büyük NP'lerin alımını sağlayan başka bir süreçtir. Aktin-düzenlenmiş bu işlem sırasında, plazma zarı, farklı şekillerde çukurlar oluşturmakta ve zar çukurları kapatarak ve büyük veziküller (makropinosomlar) meydana getirerek çok sayıda hücre dışı sıvıyı çekmektedir. Hücre dışı akışkanlardaki bütün NP'ler veya moleküller, spesifik olmayan hücre dışı bir sıvı alımı yoluyla makropinosomların içinde kapsülendirir [94].

Klatrin bağımlı endositoz: İçeri alınacak moleküllere özgü reseptör bölgelere sahip proteinleri içeren hücre zarı veziküllerinin, içe doğru kıvrılma yaparak, molekülleri içine aldığı bir işlem olarak ifade edilmektedir [63].

1.7.5 Nanoteknoloji Karakterizasyon yöntemleri

Temel nanoteknoloji, ebatları nanometre aralığına düşürüldüğünde malzemenin özelliklerinin çarpıcı biçimde değişmesi gerçeğine dayanmaktadır. Her ne kadar nanoyapılı ve nanomateryallerin sentezlenmesi konusunda araştırmalar yapılsa da, bu nanolaşmış materyalleri karakterize etmek aynı zamanda bilim adamları ve teknoloji uzmanları için birçok zorluklar ortaya çıkaran bir alandır [9]. Bu nedenle nanoteknolojide, nano aralıktaki malzemelerin morfolojilerinin ve boyutlarının daha

iyi kontrol edilmesini sağlamak için nano karakterizasyon tekniklerinin araştırılması ve uygulanması önemli bir konu olmaktadır. Bu amaçla çeşitli karakterizasyon teknikleri bulunmaktadır [9]. Bu tekniklere malzemenin morfolojisini ve bileşimini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM), yüzey pürüzlülüğünün niceliksel olarak ölçülmesi için atomik kuvvet mikroskobu (AFM), atomik ölçekli yanal çözünürlüğe sahip yüzey görüntüleri üretmek için taramalı tünelleme mikroskobu (STM), kristal yapı ve kompozisyon bilgisi için X-ışını difraktometresi (XRD), yüzey bileşimi için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), atomik kompozisyonu için nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), örnek olarak verilebilir [67].

1.7.5.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu, numune yüzeyini yüksek enerjili elektron demeti ile tarayarak görüntüleyen bir elektron mikroskobudur. Geleneksel ışık mikroskopları, ışık dalgalarını bükme ve büyütülmüş bir görüntü oluşturmak için bir dizi cam mercekle kullanırken, taramalı elektron mikroskobu ışık dalgaları yerine elektronlar kullanarak büyütülmüş görüntüler oluşturmaktadır. Elektron demeti numunenin yüzeyine çarptığında ve numunenin atomları ile etkileşime girdiğinde, ikincil elektronlar oluşur ve numunenin topografik görüntüsü elde edilir. [41].

1.7.5.2 Atomik kuvvet mikroskobu

Atomik kuvvet mikroskopisinde, bir konsol kirişinin ucuna yakın bir keskin uçtan (nominal uç yarıçapı 10 nm civarındadır) oluşan bir prob, piezoelektrik tarayıcılar kullanılarak bir numunenin yüzeyinde taranır ve nanometre ölçekli yüzey pürüzlülüğünün niceliksel olarak ölçülmesini sağlamaktadır [41].

1.7.5.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR spektroskopisi bir titreşim spektroskopisi şeklindedir ve FTIR spektrumu hem moleküler yapıyı hem de moleküler ortamı yansıtır. Bu teknikte, örnek bir kızılötesi kaynaktan kızılötesi radyasyon ile ışınlanır ve bu radyasyonun emilmesi, enerjinin kantitatif titreşim modlarına bırakarak titreşim hareketlerini uyarır. Bu nedenle, bir molekül sıcak kaynağın termal emisyonunun ürettiği radyasyona maruz kaldığında, görünür (kırmızı) ve kısa dalgalar arasındaki elektromanyetik spektrum bölgesinde, moleküler titreşim modlarına karşılık gelen frekansları absorbe eder [19].

2. DENEYLER

2.1 Cihazlar

2.1.1 Omnicure S2000 Spot light Ultraviole (UV) curing device (Excelitas Technologies Corp., ABD)

Şekil 2.1’de verilen Omnicure S2000, 30 W/cm²’ye kadar çıkış sağlayan güçlü 200 Watt UV lamba ile birlikte gelir. 4000 saate kadar tipik ömürleriyle 2000 saatlik garantili bir lamba ömrüne sahiptir. S2000, patentli Intelli-Lamp® teknolojisi ile yüksek çıkış gücünü geniş spektral yapıştırıcı uyumluluğu ve otomatik kullanım saati takibi ile birleştirdiğinde, türünün en değerli ve akıllı UV kür lambası sistemidir. Tez sırasında hücre enkapsülasyonu yapılırken jeli kürleştirmek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 2.1: Omnicure S2000 Spot lambası ultraviyole kürleme cihazı.

2.1.2 Santrifüj (Thermo fisher, SL 16R, ABD)

Merkezkaç kuvveti prensibi sayesinde elektrikli bir motor yardımıyla çalışmaktadır. Cihaz -10°C ila $+40^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında ve 15-2000 rpm hız ile çalışabilmektedir. Bu çalışmada santrifüj, hücre ayrıştırmak amacıyla kullanıldı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Santrifüj.

2.1.3 Su banyosu (Nüve, NB5, Türkiye)

Programlanabilir N-Prime™ mikroişlemcili kontrol sistemleri ile sıcaklık hassasiyeti ve dağılımı sunmaktadır. Hazne içerisinde herhangi bir pompa ya da ısıtıcı bulunmadığından kullanılabilir hacim kaybı olmamaktadır. Tank içindeki su, kullanımı kolay bir tahliye hortumu ile kolayca boşaltılabilmektedir. Gösterge panelinden çalışma koşulları izlenebilmektedir. Çalışma sırasında farklı sıcaklıklardaki solüsyonların oda sıcaklığına veya 37°C sıcaklığa ulaşması için kullanılmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Su banyosu.

2.1.4 Finnpiptette™ (Fixed 20-100-1000) µL (Thermo fisher, ABD)

Şekil 2.4’de verilen Finnpiptette™ mikro hacimlerin etkili bir şekilde iletilmesi için üfleme özelliği sayesinde çeşitli örneklerin kullanımını için ideal bir sistemdir. Farklı hacim aralıklarında kullanılabilen çeşitleri mevcuttur. Üst kısımda bulunan döndürülebilir başlık sayesinde hacim ayarlaması yapılabilmekte ve üst yüzeyde bulunan gösterge kısmından ayarlamalar görülebilmektedir. Çalışmada mikro hacimdeki solüsyonların karıştırılmasında, hücre açma ve pasajlama aşamalarındaki hücrenin süspanse edilmesi amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 2.4: Finnpiptette™.

2.1.5 Hemositometre (Neubauer)

Hücre sayımında kullanılan, iki adet sulandırma kanalından ve 9 bölgeye ayrılmış kısımların bulunduğu sayım kamarasından oluşan alettir. Hücre sayımı sırasında kullanılmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Hemositometre.

2.1.6 Işık mikroskobu (Olympus CK2, ABD)

İncelenecek örnek içerisinde bir kaynaktan sağlanan görünür ışığın geçerek objektif merceğine ulaşması ve burada ışığın kırılarak oküler aracılığı ile göze ulaşması prensibi ile çalışır. Çalışmada hücre ekili flaskları gözlemlemek ve hücre sayımını gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Işık mikroskobu.

2.1.7 Mikroplaka fotometre (Thermo fisher, ABD)

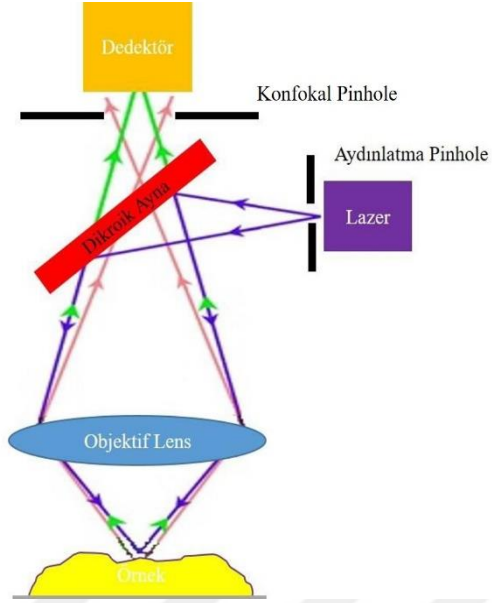
Mikroplaka okuyucuları icat eden ve Multiskan'ı tasarlayan LabSystems, Thermo Fisher Scientific'in bir parçasıdır. İlk Multiskan'ın 40 yıldan daha uzun bir süre önce icat edildiğinden bu yana yapılan hassas mühendislikten sonra rutin absorbans analizleriniz için güvenilir bir mikroplaka fotometredir (Şekil 2.7). Geniş dalga boyu aralığında (340 ila 850 nm) hem 96 hem de 384 kuyucuklu plakaların hızlı okunması sağlanmaktadır. Sıcaklık açısından kritik deneyler için 50°C'ye kadar çalkalama ve inkübasyon özelliği sunmaktadır. Geniş renkli ekran ve çeşitli dil sürümlerinde kullanım kolaylığı sayesinde üstün kullanılabilirlik ve mantıksal Thermo Scientific™ SkanIt™ yazılımı da cihazın sunduğu avantajlardandır.



Şekil 2.7: Plate okuyucu.

2.1.8 Konfokal mikroskop (Zeiss, Almanya)

Şekil 2.8'de çalışma prensibi verilen konfokal mikroskop, mikroskopik bir görüntünün noktasal ışıklandırma ve 'pinhole' denilen küçük bir düzlemsel delikçiğın kullanıldığı ve bu şekilde optik çözünürlüğünün ve görünürlüğünün artırıldığı görüntüleme tekniğidir [39]. Deneysel çalışma sırasında, immünohistokimyasal boyama yapılan hücrelerin görüntülenmesinde kullanılmıştır.



Şekil 2.8: Konfokal mikroskop çalışma prensibi.

2.1.9 SEM (Zeiss GeminiSEM 500, Almanya)

Şekil 2.9’da verilen GeminiSEM 500, özellikle çok düşük voltajlarda daha fazla sinyal ve daha fazla ayrıntı sunmaktadır. Önemli ölçüde artırılmış algılama sinyali sayesinde hızlı ve minimum örnek hasarı ile net görüntüler elde edilmektedir. Düşük gerilimlerde yüksek çözünürlük ve kontrast ile nano ölçekli ayrıntılar için oldukça idealdir. Polimerin yüzey morfolojisini görüntülemek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 2.9: SEM cihazı.

2.1.10 AFM (Nanosurf Flex Axiom, İsviçre)

Şekil 2.10'da verilen AFM cihazı X-Y-Z eksenlerinde tarama yaparak malzemelerin yüzey özelliklerini 2 ve 3 boyutlu olarak görüntüleyebilmektedir. Z ekseninde 100 µm ile 5 mm arasında farklı yüksekliklerde görüntü alabilmektedir. Büyük ya da birden fazla numuneler üzerinde ölçüm yerleri 32x32 mm² numune alanını kapsayan geniş bir görüş alanı taranarak görüntü alınabilmektedir. Cihaz hem atmosfer ortamında hem de sıvıda güvenilir topografik ve meteorolojik görüntüleme elde edebilmektedir. Çalışmada kullanılan hidrojel yüzey pürüzlülüğünü belirlemek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 2.10: AFM cihazı.

2.1.11 FTIR (Thermo Scientific Nicolet İS50, ABD)

Şekil 2.11'deki FTIR cihazı ikili ışın kaynağı ve üçlü detektör optik içermekte olup, sisteme monteli çoklu dijitalleştirici sayesinde spektrometrede veriye ve sinyal kontrolüne kolay erişim sağlamaktadır. Polimerin yüzey bileşenlerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 2.11: FTIR cihazı.

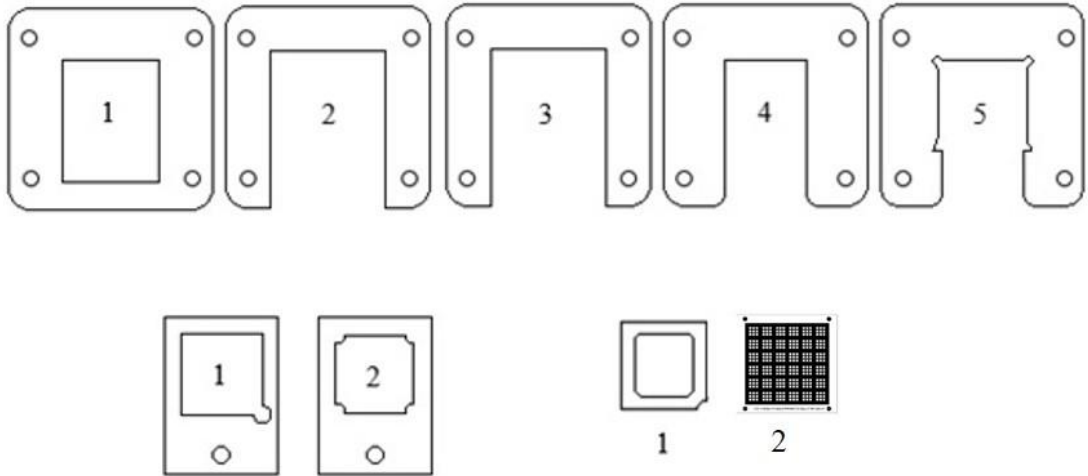
2.2 Yöntemler

Çalışmanın deneysel kısmında izlenen işlemler aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

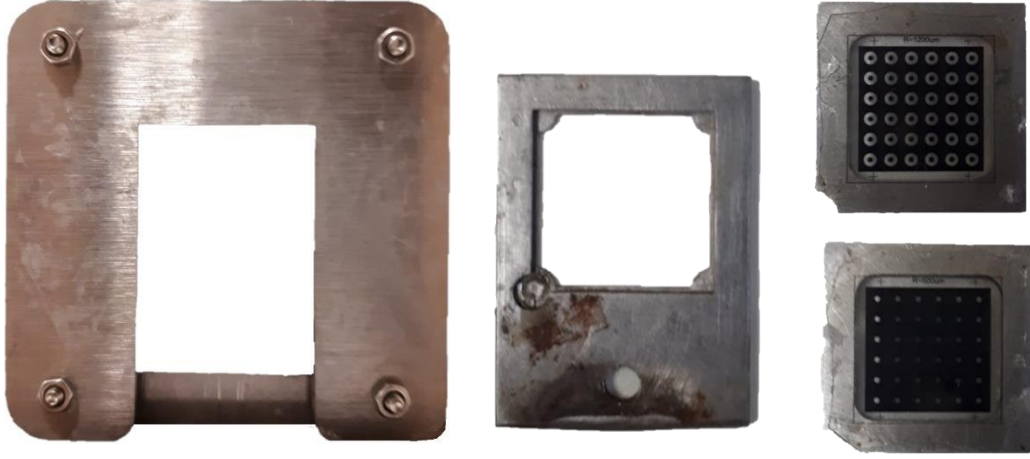
- 3B jel oluşturmak için kullanılan cihazın üretimi
- JelMA Sentezleme
- Lamel yüzeylerinin işlenmesi
- Polimer solüyonun hazırlanması
- 3B JelMA üretimi
- Hücrelerin ekimi ve büyümesi
- 3B ko-kültür oluşumu
- Ko-kültür yapılan hücrelerin karakterizasyonu ve görüntülenmesi

2.2.1 3B jel oluşumu için kullanılan cihazın üretimi

Fotomaskelerin kullanımını mümkün kılacak şekilde hassas hidrojel bloklarının üretilmesi için ekibimiz tarafında SolidWorks 9.9.14 uygulaması kullanılarak cihaz tasarımı yapılmıştır. Yapılan tasarım İzmir’de bulunan YÖNSİS lazer tarafından üretilmiştir. Üretim sırasında 304 paslanmaz çeliği kullanılmıştır. Üretilen parçalar Şekil 2.12’de görüldüğü sırayla vida yardımıyla tutturulmuştur ve Şekil 2.13’de verilen sistem elde edilmiştir.



Şekil 2.12: 3B hidrojel blokları üretim cihazı tasarımı.



Şekil 2.13: 3B hidrojel üretiminin gerçekleştirildiği sistem.

2.2.2 JelMA sentezi

Bir beher içerisindeki 100 ml Dulbecco's fosfat tamponlu tuz çözeltisine (DPBS) (Bioshop, Kanada) ağırlıkça %10 yoğunluğa sahip çözelti oluşturulacak şekilde jelatin (Fluka Analitik, Almanya) eklendi. Manyetik karıştırıcı sayesinde 60°C'de karıştırma işlemi yapılarak jelatin çözündürüldü. Çözeltinin rengi berraklaştığında jelatin gram başına 0,8 ml metakrilik anhidrit (Sigma Aldrich, Almanya) dakikada 1 ml olacak şekilde çözelti içerisine eklendi. Çözelti, reaksiyonun tam gerçekleşmesi için 3 saat boyunca karıştırma işlemi devam edecek şekilde 50°C'de tutuldu. Ardından çözelti DPBS eklenerek 5 kat daha seyreltildi. Bu işlem reaksiyonu durdurmak için yapılmıştır. Reaksiyon sonrası oluşan tuzları ve reaksiyona katılmamış olan bileşiklerin uzaklaştırılması için 1 hafta boyunca diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz işleminden sonra ise çözelti, gözenekli köpük benzeri bir yapıda JelMA elde etmek için liyofilize edilmiştir. Ardından elde edilen JelMA -80°C'de ışığa maruz kalmayacak şekilde saklandı.

2.2.3 Lamel yüzeylerinin işlenmesi

Yüzey işleme, lamellerin adhesiv özelliğini arttırmak amacıyla yapılmıştır. Bu işlemde ilk olarak lameller %10'luk sodyum hidroksit (Merck, Almanya) çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Ardından tek tek saf su dolu bir beher içerisine daldırılıp çıkartıldılar. Filtre kâğıdı üzerine dizilip kurumaları için etüvde bekletildiler. Belirli bir süre sonra kuruyan lameller bir petri kabına alındı ve üzerlerini geçecek kadar 3-(trimetoksilsilil) propil metakrilat (TMSPMA) (Sigma-Aldrich, Çin) eklendi. Ardından lameller 80°C'de gece boyunca TMSPMA içinde bekletildi. Bir günün

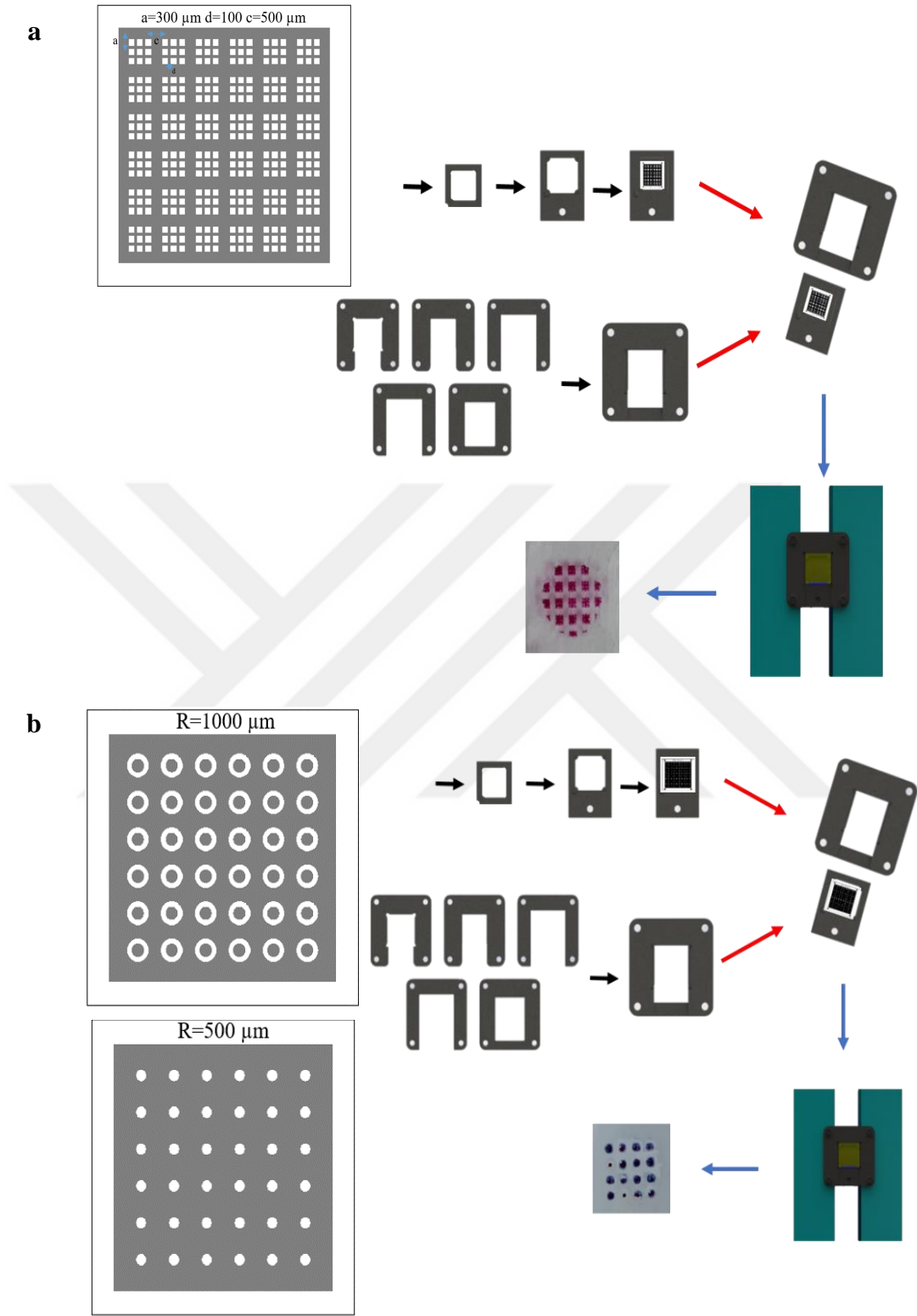
sonunda TMSPMA uzaklaştırıldı. Lameller dakikada 50 ile 80 devir arasında dönen bir karıştırıcı üzerinde 5'er dakika ara ile üç defa etanol kullanılarak (her seferinde etanol uzaklaştırılarak) yıkandı. Bu yıkama işleminden sonra da lameller tek tek filtre kâğıdı üzerine dizildi ve etüvde kurutuldu. Tüm kurutma işlemleri de 80°C'de yapılmıştır. TMSPMA kaplanmış tüm lameller en geç 7 gün sonunda kullanılmıştır.

2.2.4 Polimer solüsyonunun hazırlanması

Ön polimer solüsyonunun hazırlanması polimer UV ışığına maruz bırakılmadan hemen önce gerçekleştirildi. Foto-çapraz bağlanmayı sağlamak için foto-başlatıcı kimyasal 1-[4-(2-hidroksietoksi)-fenil]-2-hidroksi-2-metil-1-propanon (Irgacure 2959) (Boyasan Boya Sanayi Ticaret, Türkiye) %1 (w/v) olacak şekilde tartıldı ve üzerine 1000 µl DPBS eklenerek 80°C'de çözündürüldü. Ardından hazırlanan bu çözeltinin tamamı, son çözelti yoğunluğu %10 (w/v) olacak şekilde tartılan JelMA üzerine eklendi. JelMA ve çözeltiden oluşan karışım vortekslendi ve JelMA'nın iyice çözünmesi için 80°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.

2.2.5 3B JelMA üretim

Bu aşamada ilk olarak "frame" olarak adlandırılan parçaların üzerine boyutları 12-12 mm olan fotomaskeler yapıştırıldı. Bu aşamada hizalamanın iyi yapılması önemlidir. Ters bir durumda oluşturulacak 3B jelin kayması söz konusu olabilir. Fotomaskelerin yapışmış olduğu frame, cihazın "çekmece" olarak adlandırılan yapısına oturtuldu ve çekmece sistemi aparata takıldı. Aparatın üst kısmına daha önce TMSPMA kaplanarak adhesiv özelliği arttırmış boyutları 22-22 mm olan lamellerden yerleştirildi. Lamel üzerine hazırlanmış polimer solüsyonundan eklendi ve solüsyon "spacer" adı verilen aparat sayesinde lamel ile arasında tutuldu. Ardından solüsyon UV ışığına maruz bırakıldı. Tüm bu sürecin anlatımı Şekil 2.14'de kullanılan iki farklı fotomaske türüne göre verilmiştir. Matriks fotomaskesinde en küçük karenin bir köşesinin uzunluğu 300, en küçük iki kare arası mesafe 100 µm ve 9 ufak kareden oluşan kareler arası mesafe de 500 µm'dir. Doughnut maskelerde ise sırasıyla 1 ve 2 numaralı maskelerin çapları ise R=1000 µm ve R=500 µm'dir. Üretim sürecinde kullanılan UV, polimer solüsyonu ve ekilen hücre değerleri ise Tablo 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.14: a) Matriks fotomaske kullanılarak b) 'Doughnut' fotomaske kullanılarak 3B JelMA üretim süreci.

Tablo 2.1: 3B JelMA üretim sürecinde kullanılan değerler.

UV Maruz Süresi	50 sn
UV Probu Aparat Arası Mesafe	55 mm
UV Gücü	6,25 W/cm ²
Foto-başlatıcı Çözelti Konsantrasyonu	% 1
JelMA Konsantrasyonu (2x)	% 10
Ekilen Hücre Miktarı	1x10 ⁶ hücre/ml

2.2.6 Hücre ekimi

Hücre deneyleri için iki farklı hücre hattı kullanıldı. Sıvı azot içinde depolanan sırasıyla 13 ve 14 pasajlarında İnsan göbek kordonu ven endotel hücresi (HUVEC), nöroblastom (SH-SY5Y) hücreleri %80 oranında su banyosunda çözündürüldü. Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Waltham, MA) %10 fetal bovin serum (Gibco, Waltham, MA), %1 penisilin/streptomisin (Gibco, Waltham, MA, ABD), %1 sodyum piruvat (Gibco, Waltham, MA) ve %1 L-glutamin (Gibco, Waltham, MA) içeren besi ortamı hazırlandı ve hücreler 75'lik flasklara ekildi. Hücrelerin ekildiği flasklar, %95 izafi nem, %5 CO₂ ve 37°C'de sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edildi. Hücreler canlılık testleri ve görüntülenme öncesi iki kez alt kültürlendi.

2.2.7 3B ko-kültür oluşumu

HUVEC ve SH-SY5Y hücreleri %0,25 tripsin-EDTA (Gibco, Waltham, MA, ABD) ile tripsinize edildi ve hücreler ayrı ayrı 1x10⁶ hücre/ml konsantrasyonunda, hazırlanan polimer solüsyonuna eklendi. Hazırlanan hücre-polimer karışımın 50 µl'si fotomaskenin yer aldığı 3B jel oluşturma aparatına yerleştirilen TMSPPMA ile kaplanmış lamel yüzeylerine eklendi ve 55 mm'lik bir mesafeden 6,25 W/cm² güç ile 50 saniye boyunca UV ışığı ile kürlendi. Ardından fotomaske değiştirilerek aynı işlem hücrelerden diğerinin bulunduğu solüsyon ile aynı lamel yüzeyinde tekrar gerçekleştirildi. Polimerize olmayan ön polimer solüsyonunun uzaklaştırılması için lamel yüzeyi DPBS ile yıkandı. İstenilen geometri elde edildikten sonra lamel 6 oyuklu plakaya aktarıldı ve üzerlerine besi ortamı eklendi ve plakalar inkübatöre yerleştirildi.

Ayrıca hücre-polimer karışımına citreohybridonol molekülü katkılandırılarak da hücrelerin gelişimi gözlemlenmiştir. Bu aşamada ilk olarak 1 mg citreohybridonol molekülü 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, Almanya) çözeltisi içerisinde çözündürüldü ve hücre-polimer karışımına 20-40-80 µl oranlarında eklendi. Tüm ko-kültür oluşum süreci izlenerek citreohybridonol molekülü katkılandırılmış hücre-polimer karışımı içinde uygulandı. Sonuçta molekülsüz ve 20-40-80 µl oranlarında citreohybridonol molekülü katkılandırılmış HUVEC, SH-SY5Y ve HUVEC/SH-SY5Y hücrelerinin enkapsülasyonu ile gün başına toplamda 24 (12x2) jel üzerinde çalışıldı. Tüm deney süreci 0-1-4-7 ve 14 günlerde izlendi. Deney sürecinde gün başına hazırlanan örnek listesi Tablo 2.2’de görülmektedir.

Tablo 2.2: Gün başına hazırlanan örnekler.

Günler (0-1-4-7-14)	HUVEC (molekülsüz)	HUVEC (20 µM)	HUVEC (40 µM)	HUVEC (80 µM)
	SH-SY5Y (molekülsüz)	SH-SY5Y (20 µM)	SH-SY5Y (40 µM)	SH-SY5Y (80 µM)
	HUVEC SH-SY5Y (molekülsüz)	HUVEC SH-SY5Y (20 µM)	HUVEC SH-SY5Y (40 µM)	HUVEC SH-SY5Y (80 µM)

2.2.8 Hücre canlılık testi

Hücre canlılık testleri sırasında MTT (metiltiazol difenil tetrazolyum) Hücre Canlılığı Test Kiti (Sigma Aldrich, Almanya) kullanıldı. ‘3B ko-kültür oluşumu’ başlığı altında anlatılan deney süreciyle elde edilen 6-well plate de bulunan enkapsüle edilmiş hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı. 1:9 oranında MTT-DMEM solüsyonu hazırlandı ve gün bazında enkapsüle edilmiş hücreler üzerine 2’şer ml ilave edildi. 4 saat süre boyunca %95 izafi nem, %5 CO₂ ve 37°C’de ki inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda 2’şer ml DMSO ile 15 dakika boyunca plaka karıştırıcıda da 37°C’de karıştırıldı. Ardından plaka okuyucu cihazı kullanılarak 570 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.

Hücre canlılığı ile ilgili bir diğer test ise hidrojen peroksit (H₂O₂) analiz kiti (BioVision, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde yer alan 0.88 M’lık H₂O₂’den 10 µl alınarak 870 µl distile su ile çözülmüştür. Elde edilen 10mM’lık H₂O₂ çözeltisinden de tekrardan 10 µl H₂O₂ alınarak üzerine 990 µl distile su ilave edilmiş ve böylece 0.1 mM’lık H₂O₂ çalışma solüsyonu elde edilmiş oldu. Elde edilen çalışma

solüsyonundan Tablo 2.2’de belirtildiği gibi H₂O₂ analizi için 96-well plate de hazırlanan örneklere 10 µl eklendi. Ardından her bir kuyucuk üzerine kit içerisinde yer alan tampon çözeltisinden 46 µl, OxiRed™ Probe çözeltisinden 2 µl, yabancu turpu peroksidaze (HRP) çözeltisinden ise 2 µl eklendi. Böylece reaksiyon karışımı hazırlanmış oldu. Ardından enkapsüle edilen hücreler oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edildi ve 595 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.

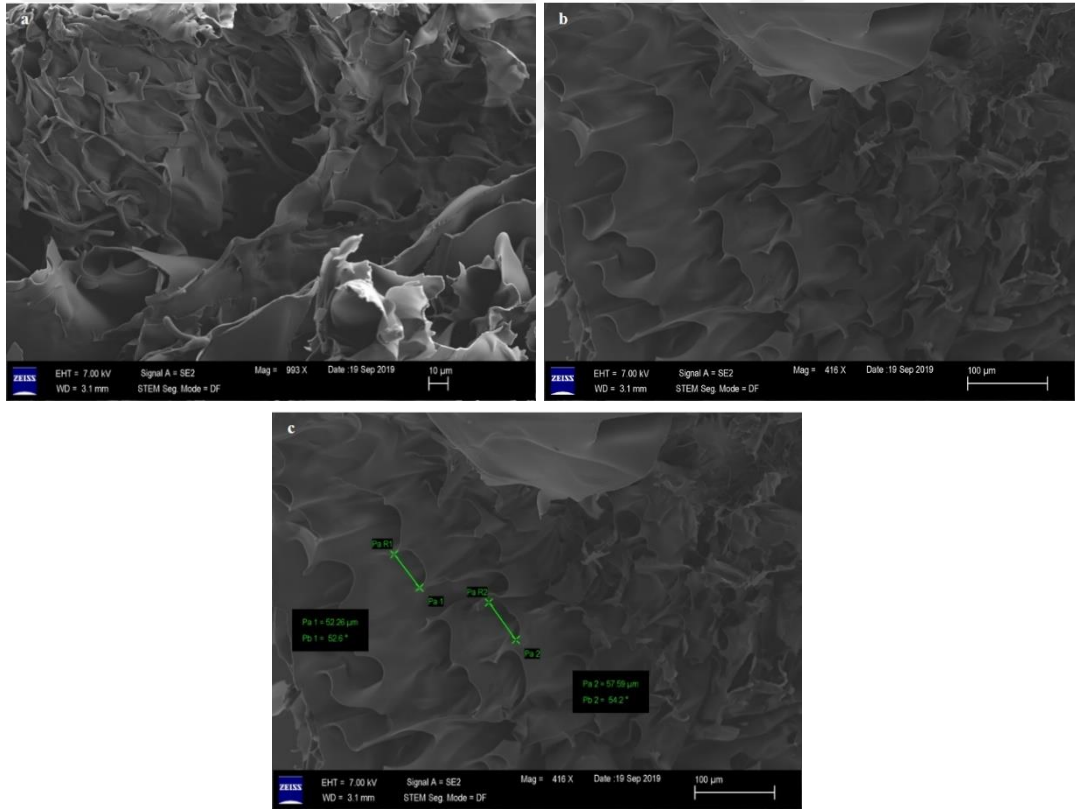
2.2.9 İmmünohistokimyasal boyama

Gün başına 24 adet olarak hazırlanmış olan hücre enkapsüle edilmiş jellerin bulunduğu 6 well-plate içerisinde kültür ortamları çekildi ve hücreler DPBS ile yıkandı. Ardından DPBS uzaklaştırıldı ve hücreler %4 paraformaldehit-DPBS (Santacruz, ABD) oda sıcaklığında 10 dakika boyunca fiksleildi. Süre sonunda %4 paraformaldehit-DPBS uzaklaştırıldı ve %0,5 Triton X100-DPBS (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılarak hücreler oda sıcaklığında 5 dakika boyunca geçirginleştirilir. %1 Bovine Serum Albumin (BSA)-DPBS (Sigma Aldrich, Almanya) ile hücreler oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sürecinden sonra DPBS kullanılarak yıkama yapıldı. 5 dakika sonra DPBS uzaklaştırıldı. HUVEC hücresini görüntülemek amacıyla Angiopoietin 1 poliklonal antikoru (bs-0800R) (Bioss, ABD); SH-SY5Y hücresini görüntülemek için ise Nestin antikoru (sc-23927) (Santacruz, ABD) 1:800 oranlarında %1 BSA-DPBS ile seyreltilerek kullanıldı. Antikorlar eklendikten sonra enkapsüle edilmiş hücreler 4°C’de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün antikorlar uzaklaştırıldı ve 5 dakika aralıklar ile 3 defa DPBS kullanılarak yıkama işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra sekonder antikor işlemi gerçekleştirildi. HUVEC için Goat anti-mouse IgG H+L sekonder antikor, FITC (62-6511) (Invitrogen, ABD), ; SH-SY5Y için Alexa Fluor™ 680 phalloidin (A22286) sekonder antikorları kullanılmıştır. Bu işlemden sonra hücreler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 5 dakika aralıklar ile 3 defa yıkama işlemi yapıldı ve çekirdeğin görüntülenmesi için DAPI antikoru (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma Aldrich, Almanya) 1:20 oranında %1 BSA-DPBS ile seyreltilerek eklendi. 45 dakika oda sıcaklığında hücreler inkübe edildi. Süre sonunda 5 dakika boyunca DPBS ile yıkama yapıldı. Yıkama işlemi sonrasında örnekler üzerine gömme ortamı olarak adlandırılan Entellan (Sigma Aldrich, Almanya) damlatıldı. Ardından örnekler lamel üzerinde sabitlendi ve örnekler konfokal mikroskopta (Zeiss, Almanya) görüntülenmek üzere hazırlandı.

3. BULGULAR

3.1 JelMA Yüzey Morfolojisi

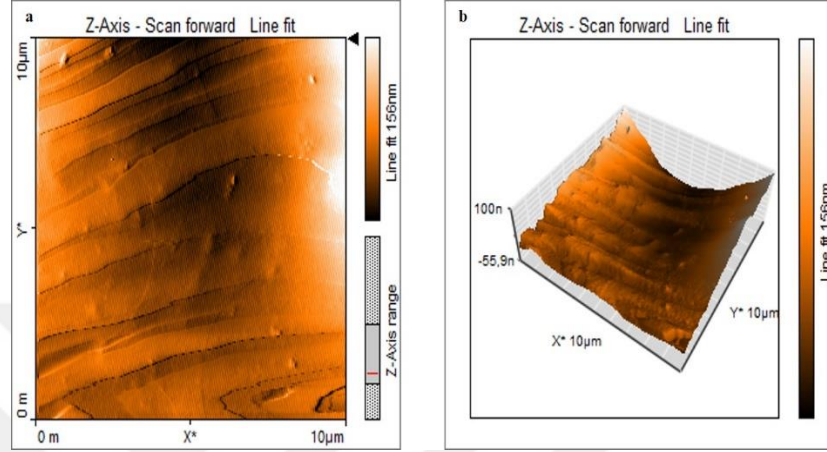
JelMA'nın morfolojik özellikleri SEM ile incelenmiştir. Şekil 3.1'de verildiği üzere farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmış ve por büyüklüğü belirlenmiştir. Görüntüler JelMA'nın gözenekli yapısını göstermektedir. Por büyüklüğü ise ortalama 54.92 μm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.1: JelMA'nın SEM görüntüleri a) 993X büyütme b) 413X büyütme c) por büyüklüğü.

3.2 JelMA Hidrojelinin YüzeY Topografisi

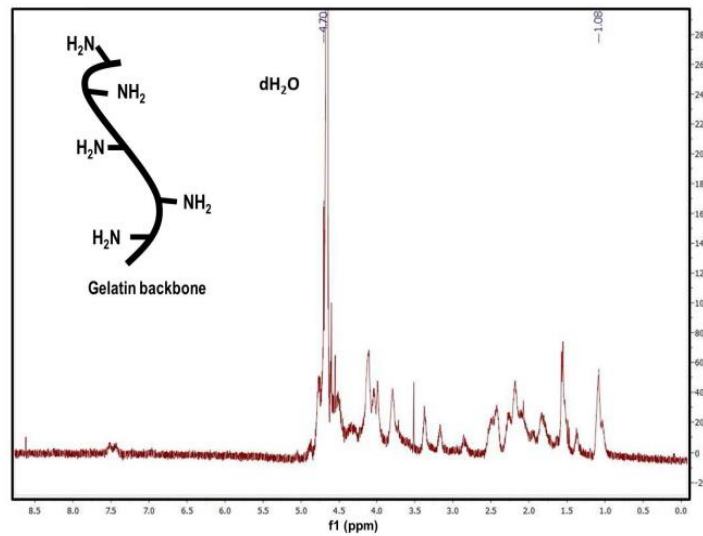
JelMA hidrojelinin yüzeY pürüzlülüğü, temassız modu ile AFM kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen iki ve üç boyutlu AFM görüntüleri, Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Pürüzlülük değeri ise 26-30 nm olarak ölçülmüştür.



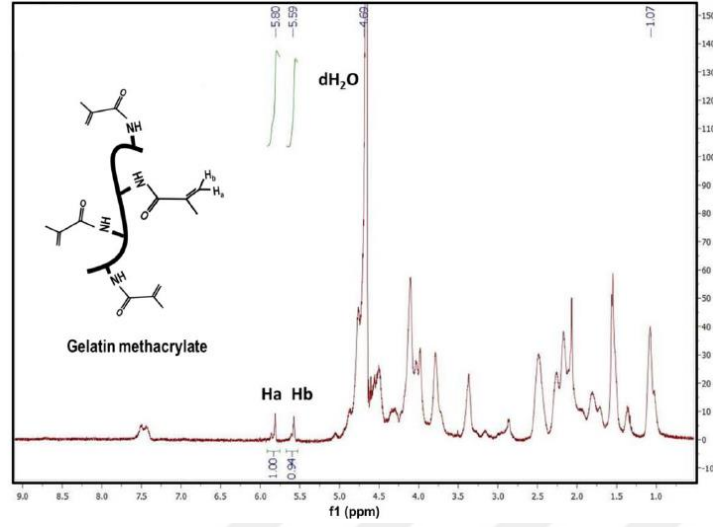
Şekil 3.2: JelMA hidrojelinin iki ve üç boyutlu yüzeY topografik görüntüsü.

3.3 JelMA H¹ NMR Sonuçları

Çalışma sürecinde kullanılan JelMA'nın metakirilasyonu karakterize edildiğinde jelatin aromatik kalıntılara (7.4 ppm) (Şekil 3.3) ve metakrilamid gruplarına (5.59 ppm ve 5.80 ppm) rastlandı (Şekil 3.4). Bu sonuçlar JelMA'nın kullanıma hazır olduğunu göstermektedir [20].



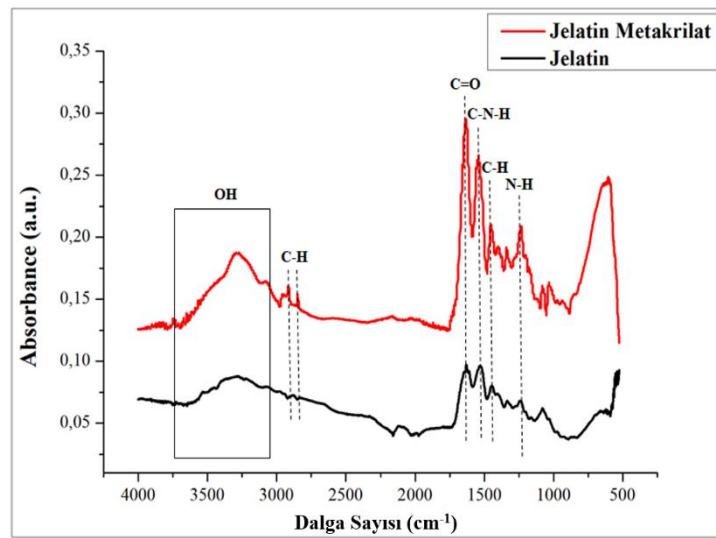
Şekil 3.3: Jelatin H NMR grafiğı [20].



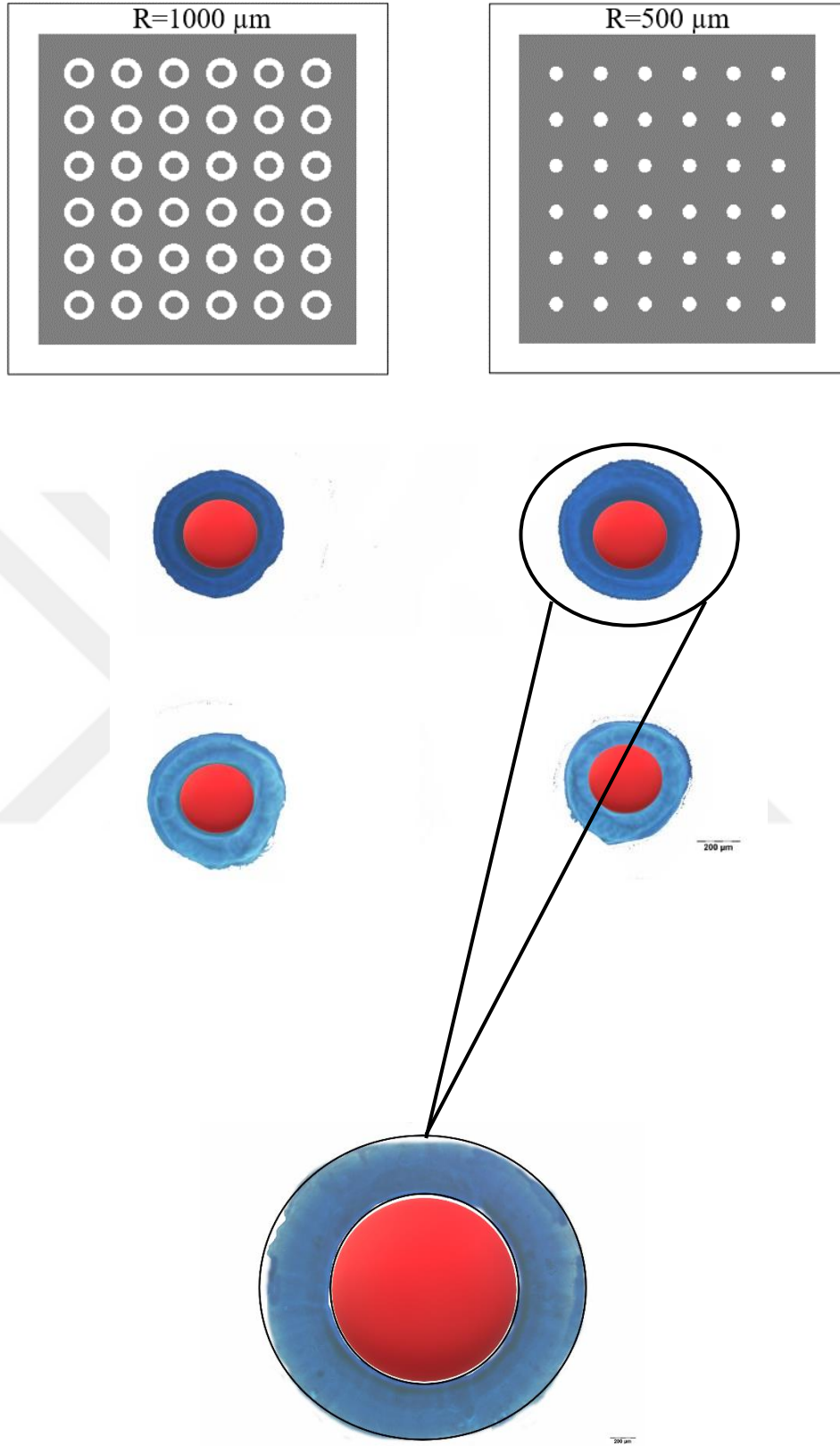
Şekil 3.4: JelMA H NMR grafiği [20].

3.4 JelMA Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Şekil 3.5’de verilen FTIR analizi grafiğinde 3750 ila 3050 cm^{-1} arasındaki geniş bant OH bandını temsil eder. 1645 cm^{-1} ’deki pik, JelMA’daki jelatin ve metakrilat anhidrit arasındaki etkileşimi sunan karbon çift bağına karşılık gelir. 1500–1570 cm^{-1} ’deki bant, C-N-H bükülmesine karşılık gelirken, 3200–3400 cm^{-1} ’deki bant, peptit bağlarının varlığını gösterir. 1240 cm^{-1} ’deki pik ise, N-H (amid III) grubuna denk gelmektedir. Bu veriler JelMA sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 3.5: JelMA FTIR analiz grafiği.



Şekil 3.7: HUVEC ve SH-SY5Y ko-kültüründe kullanılan fotomaske ve jel oluşumu.

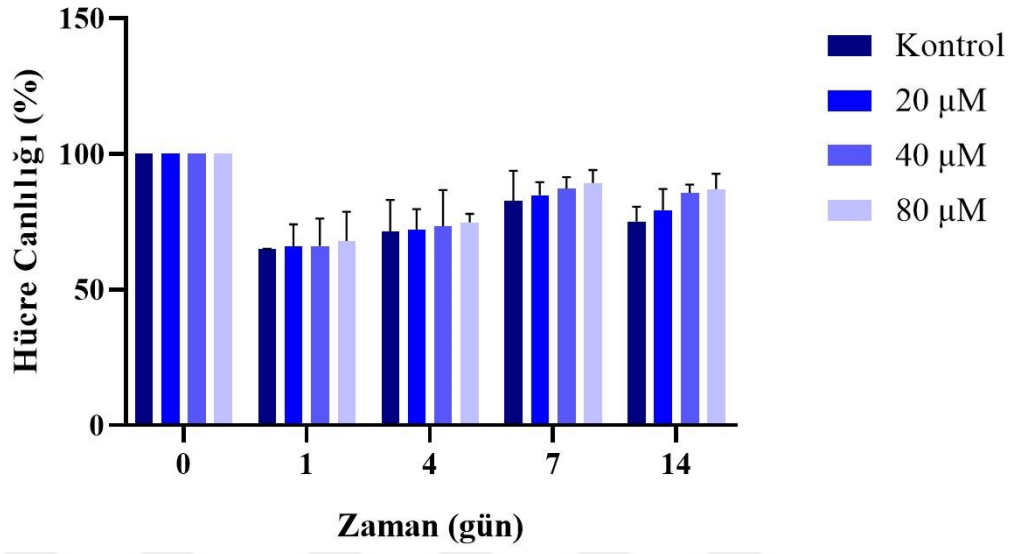
3.6 Hücre Canlılığı İstatistiksel Analizleri

Tüm absorbans sonuçları, GraphPad Prism 8 yazılım programında ‘ortalama \pm S.E (Standart hata)’ olarak hesaplanmıştır. MTT ve H₂O₂ değerleri iki yönlü ANOVA ve post hoc olarak Tukey testi ile analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p>0,05$ anlamsız, $p<0,05$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

3.6.1 Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) hücre canlılık testi ve istatistiksel analizi

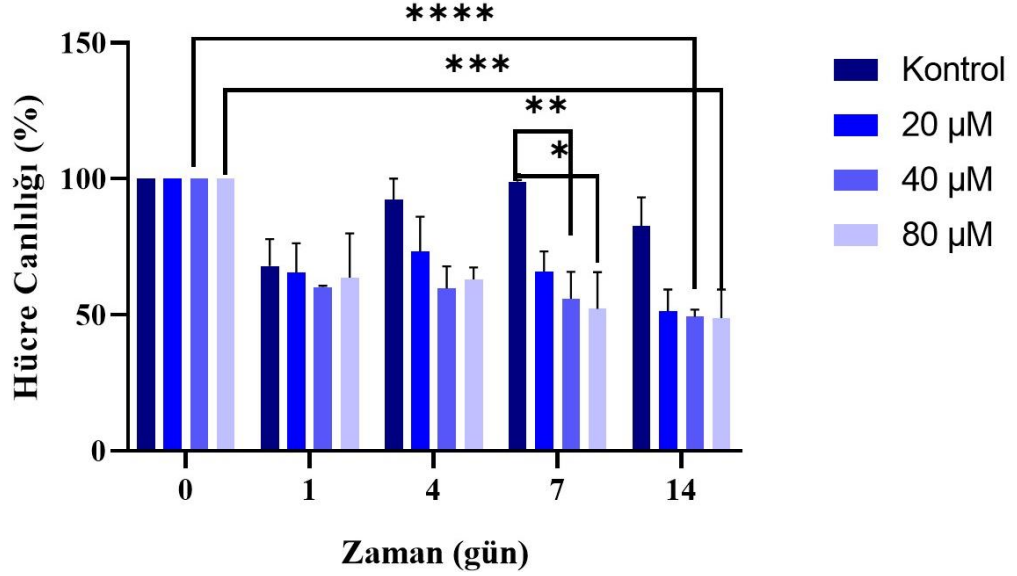
HUVEC ve SH-SY5Y hücre hatlarına ve HUVEC: SH-SY5Y ko-kültürüne yapılan hücre canlılığı testleri sonucunda zamana (gün) bağlı hücre canlılığı (%), farklı oranlarda citreohybridonol molekülü katkılandırılmış JelMA enkapsülasyonu göz önünde bulundurularak incelenmiştir. Şekil 3.8’de verilen HUVEC hücre canlılığı (%)-zaman (gün) grafiğine bakıldığında hücre canlılığı 14 güne kadar doğru orantılı olacak şekilde artmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak $p>0,05$ olduğundan anlamlı değildir. Şekil 3.9’da ise SH-SY5Y hücre hattına ait hücre canlılığı (%)-zaman (gün) grafiği verilmiştir. Grafik incelendiğinde 4. günden sonra hücre canlılığında molekül molaritesindeki artış miktarıyla doğru orantılı olacak şekilde bir azalma meydana gelmiştir. İstatistiksel olarak bakıldığında 7. günde kontrol grubuna kıyasla 40 μ M ve 80 μ M molekül yoğunluğundaki JelMA içerisine enkapsüle edilmiş hücrelerin canlılığındaki azalma sırasıyla $p=0,032$ ve $p=0,0016$ değerleri ile anlamlıdır. Gün bazında bakıldığında ise 14 günlük sürede ise yine 40 μ M ve 80 μ M molekül yoğunluğundaki JelMA içerisine enkapsüle edilmiş hücrelerin canlılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0011$; $p=0,0009$). HUVEC ve SH-SY5Y hücre hatlarının ko-kültür edildiği sistemin hücre canlılığı (%)-zaman (gün) grafiği ise Şekil 3.10’da verilmiş olup grafik incelendiğinde gün bazında artan molekül konsantrasyonuyla hücre canlılığında artış meydana gelmiştir. Ancak kontrol grubuna göre tüm günlerde azalma görülmektedir. Ko-kültür edilen hücrelerin analizindeki bu artış ve azalmalarda $p>0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlılık görülmemektedir. Şekil 3.11’de ise yapılan ölçümün ne kadar hassas olduğu hakkında genel bir fikir vermek için MTT hücre canlılık testi sonucunda elde edilen tüm veriler için tahmini hatayı gösteren hata çubuğu grafiği verilmiştir. Ortalama minimum ± 2 maksimum ise ± 10 hata payı ile çalışıldığı belirlenmiştir.

HUVEC



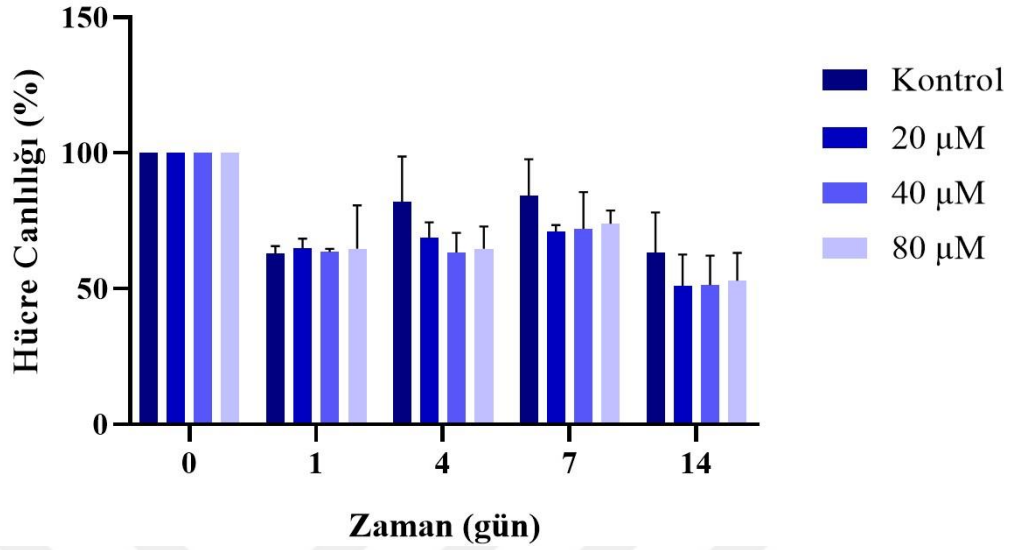
Şekil 3.8: HUVEC hücre hattı güne bağlı hücre canlılığı grafiği.

SHSY5Y

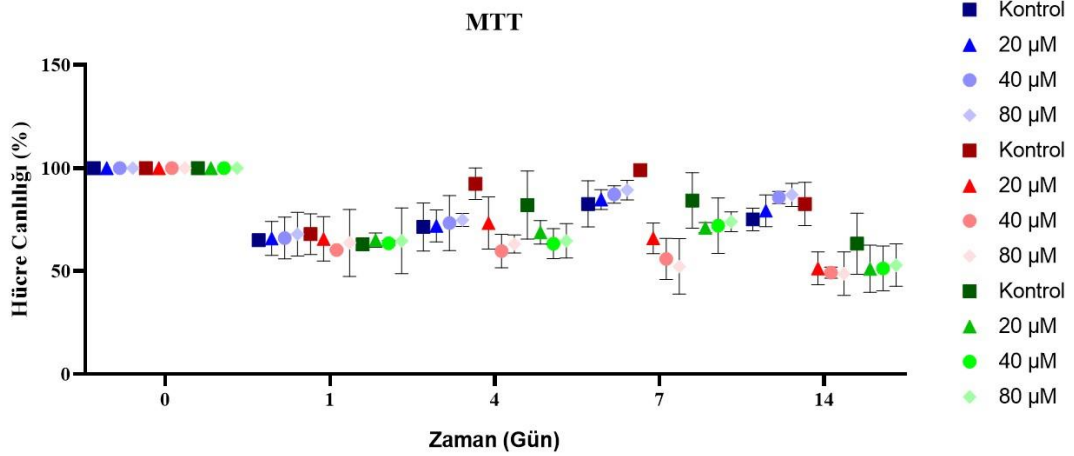


Şekil 3.9: SH-SY5Y hücre hattı güne bağlı hücre canlılığı grafiği.

KO-KÜLTÜR



Şekil 3.10: HUVEC/SH-SY5Y ko-kültürü güne bağlı hücre canlılığı grafiği.



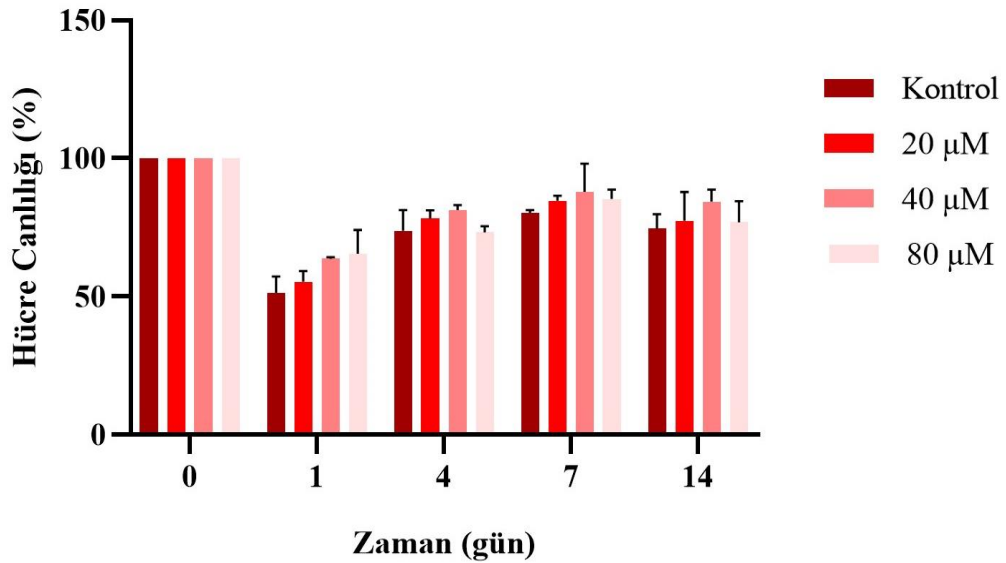
Şekil 3.11: MTT hücre canlılık testi hata çubuğu grafiği; HUVEC (mavi), SH-SY5Y (kırmızı), Ko-kültür (yeşil)

3.6.2 Hidrojen peroksit (H₂O₂) hücre canlılık testi ve istatistiksel analizi

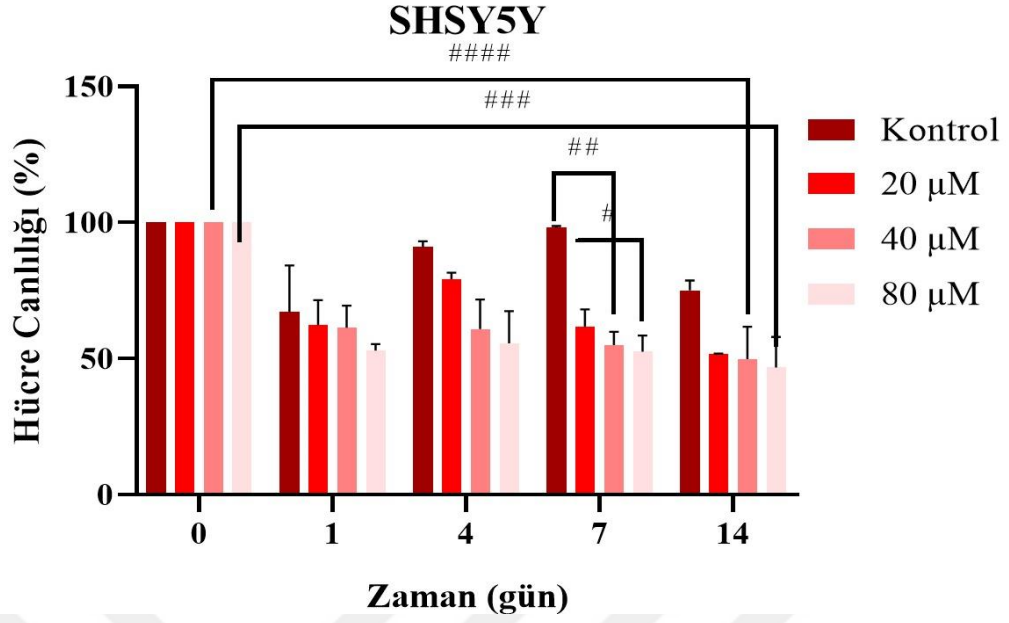
Hidrojen peroksit testi sonucunda elde edilen hücre canlılığı (%)-zaman (gün) grafikleri aşağıda verilmiştir. Şekil 3.12'deki HUVEC hücre hattına ait grafiğe bakıldığında molekülün tüm katkı oranlarında hücre canlılığındaki artış devam etmektedir. Ancak bu artışlar her grupta $p > 0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Şekil 3.13'de ise SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinin zamana bağlı hücre canlılığı grafiği verilmiştir. Normal şartlar altında hücrelerin canlılığı 7. güne kadar ciddi bir oranda artmaktadır. Ancak 20-40-80 µM oranlarında citreohibridonol

molekölü katkılanırılmış JelMA içerisine enkapsüle edilen nöroblastom hücrelerinin canlılık oranlarında ise 4. günden sonra önemli oranda azalma meydana gelmektedir. Bu azalmalar 7. günde kontrol grubuna göre 40 ve 80 μM oranlarda $p < 0,0001$ olduğundan anlamlılık göstermektedir. Gün bazında ise 0. gün ile 14. günün yine 40 ve 80 μM oranlarda $p < 0,0001$ olduğundan azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Endotel ve nöroblastom hücrelerinin ko-kültürüne ait canlılık grafiği ise Şekil 3.14’de verilmiş olup tahmin edildiği üzere kontrol grubuna göre hücre canlılığında azalma görölürken gün bazında da bir artış meydana gelmiştir. İstatistiksel olarak artış ve azalmalar $p > 0,05$ olduğundan anlamlı bulunmamıştır. Tüm veriler MTT analizi sonucundaki hücre canlılığı verileri ile uyuşmaktadır. Şekil 3.15’de H_2O_2 hücre canlılık testi sonucunda elde edilen tüm veriler için tahmini hatayı gösteren hata çubuğu grafiği verilmiştir. Ortalama minimum ± 1 maksimum ise ± 10 hata payı ile çalışıldığı belirlenmiştir.

HUVEC

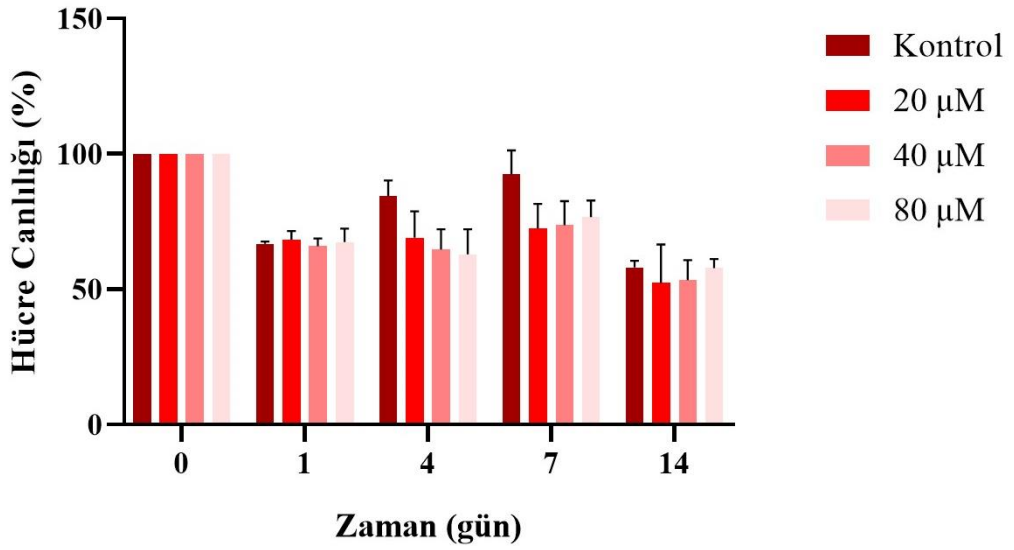


Şekil 3.12: 100 μM H_2O_2 ye maruz bırakılmış HUVEC hücrelerinin zamana bağlı hücre canlılığı grafiği.

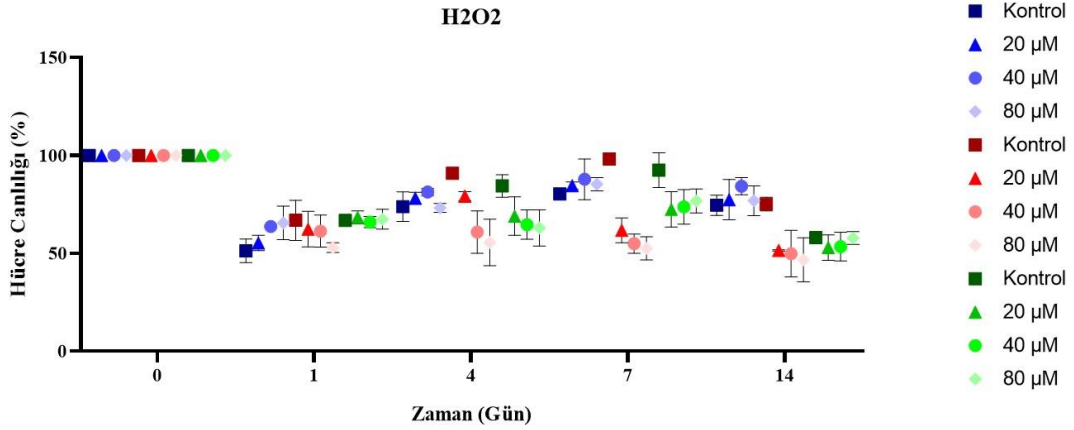


Şekil 3.13: 100 µM H₂O₂ ye maruz bırakılmış SH-SY5Y hücrelerinin zamana bağlı hücre canlılığı grafiği.

KO-KÜLTÜR



Şekil 3.14: 100 µM H₂O₂ ye maruz bırakılmış HUVEC. SH-SY5Y ko-kültürünün zamana bağlı hücre canlılığı grafiği.



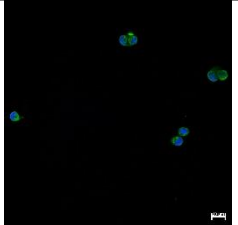
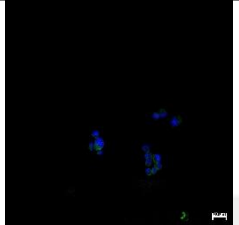
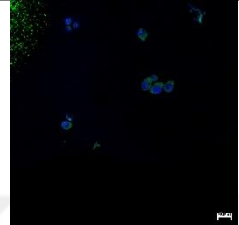
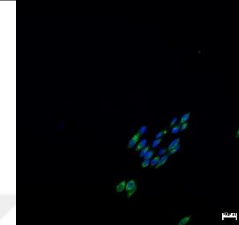
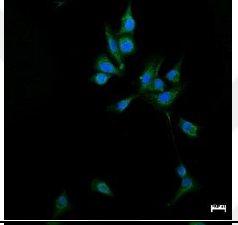
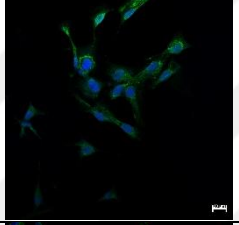
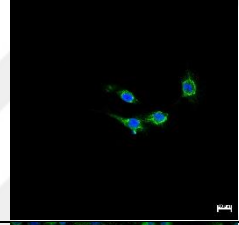
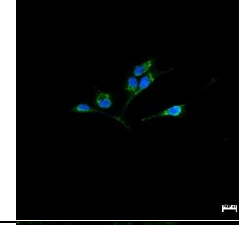
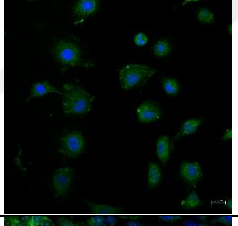
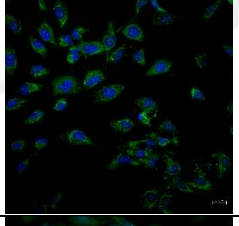
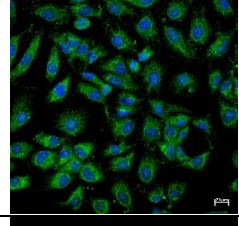
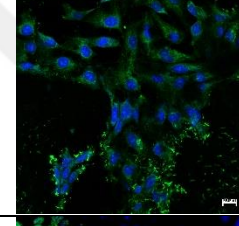
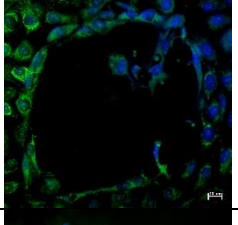
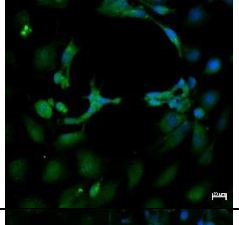
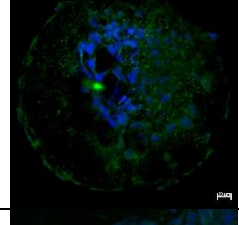
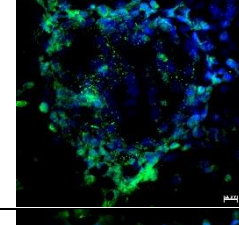
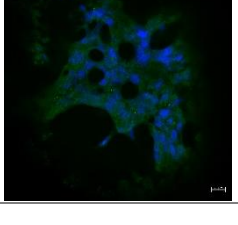
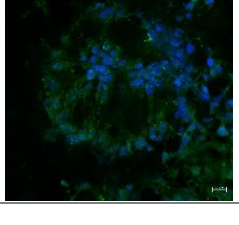
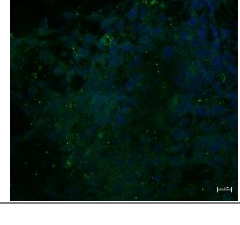
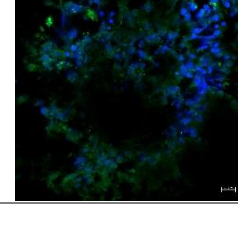
Şekil 3.15: H₂O₂ hücre canlılık testi hata çubuğu grafiği HUVEC (mavi), SH-SY5Y (kırmızı), Ko-kültür (yeşil)

3.7 İmmünohistokimyasal Görüntüleme

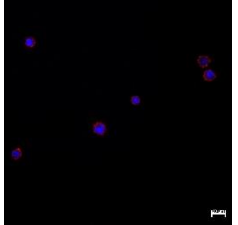

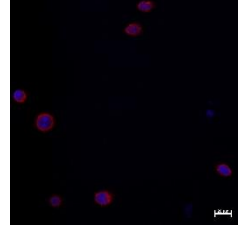
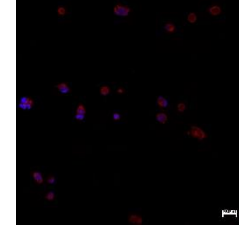
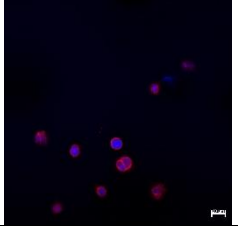
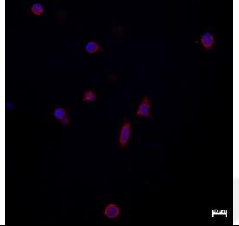
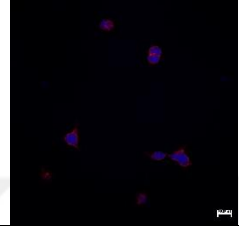
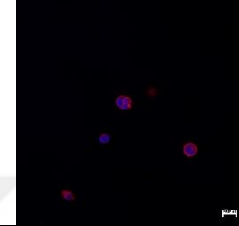
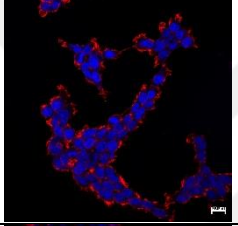
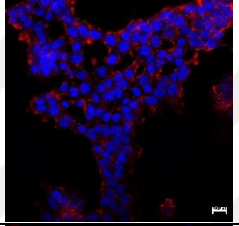
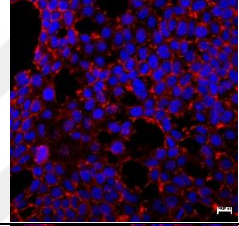
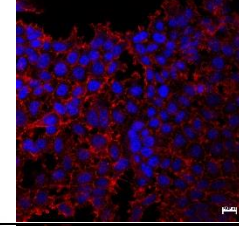
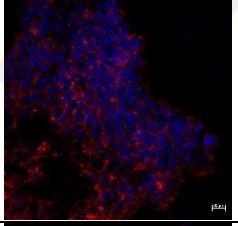
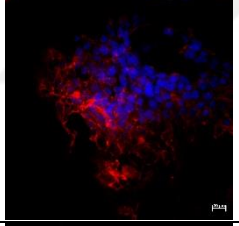
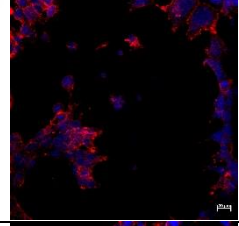
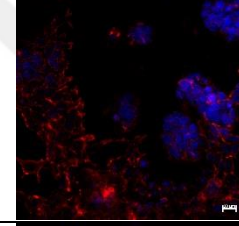
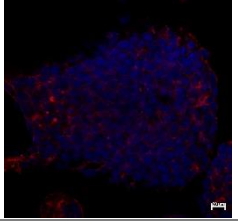
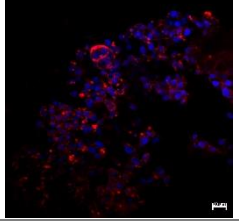
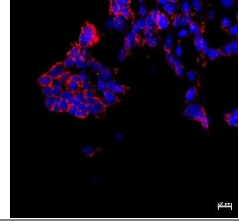
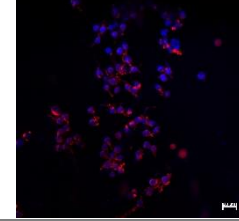
Tablo 3.1’de verilen HUVEC hücre hattına ait görüntülere bakıldığında, Angiopoietin 1 poliklonal antikorunun (bs-0800R) (yeşil) , HUVEC hücrelerinin vasküler yapı oluşumunu desteklediği görülmüştür. DAPI (mavi) selektif olarak çift sarmallı DNA’ya bağlanır ve hem canlı hem de sabit hücrelerdeki DNA’ yı görselleştirir. Böylece 14 günlük süre içinde canlı hücrelerin varlığı görülmüştür. Endotel hücrelerin canlılık artışı 14. güne kadar belirgin bir şekilde görülmektedir. Elde edilen endotel hücrelerin görüntüsünde mavi bölgelerin daha fazla olması da MTT testinde HUVEC hücre hattına ait hücre canlılık oranındaki artışı doğrulamaktadır. Tablo 3.2’de ise SH-SY5Y hücre hattına ait görüntüler verilmiştir. Nestin antikorunun (sc-23927) (kırmızı) nöroblastom hücre iskele yapısına tutunduğu gözlemlenmiştir. DNA’ yı görselleştiren DAPI (mavi) sayesinde 4. Günden sonra canlılıktaki azalma da görülebilmektedir. Tablo 3.3’de ise HUVEC ve SH-SY5Y ko-kültür hücrelerine ait görüntüler vardır. Hem damarlaşma yapısı (yeşil) hem de nöroblastom hücre iskele yapısı görülmektedir. Şekil 3.16’da ise 4. ve 7. günler arasındaki SH-SY5Y hücrelerinin görüntüleri hücre canlılığının azaldığını belirtmek için karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Şekil 3.17’de ise ko-kültür hücrelerinin nörovasküler oluşumlarına ait yüksek büyütmelelerdeki görüntülere yer verilmiştir. Şekil 3.18’de jel içerisine enkapsüle edilen hücrelerin büyüme sonrası diğer jellerdeki hücreler ile etkileşimi gösterilmektedir. Bununla birlikte immünohistokimyasal görüntülerden Imagej programı kullanılarak hücrelerin çekirdek sayısı belirlenmiştir. Şekil 3.19’da ise grafiksel olarak bu veriler

gösterilmektedir. Verilere uygulanan iki-yönlü ANOVA ve post hoc olarak da Tukey testi analizleri sonucu istatistiksel anlamlılık belirlenmiştir. Elde edilen tüm veriler birbirini desteklemektedir.

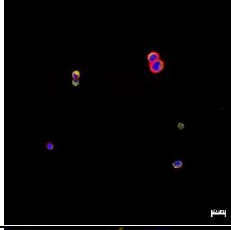


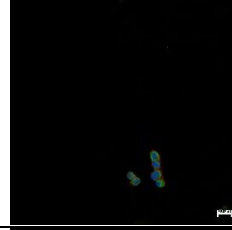
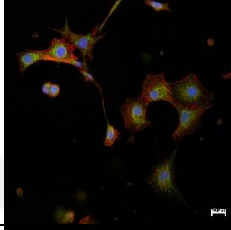
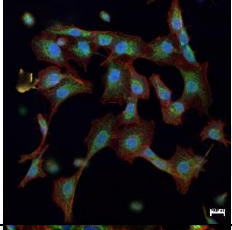
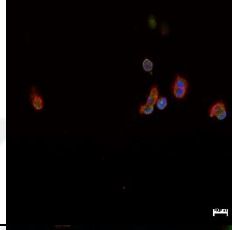
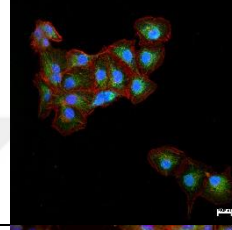
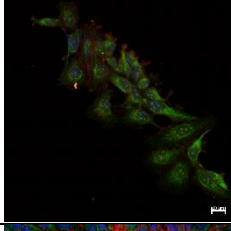
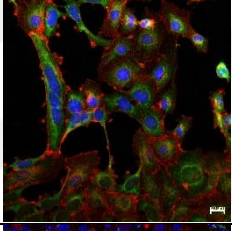
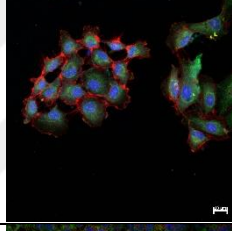
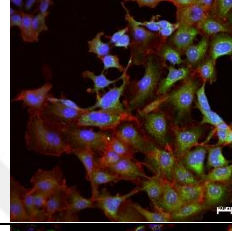
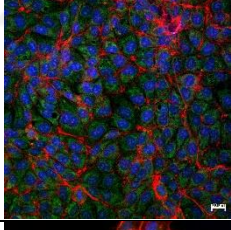
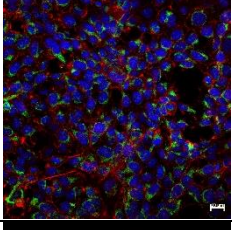
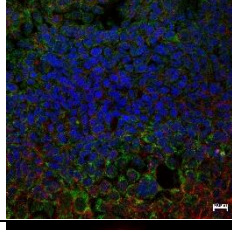
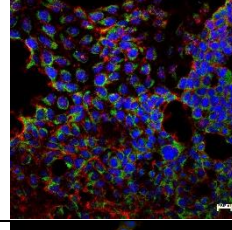
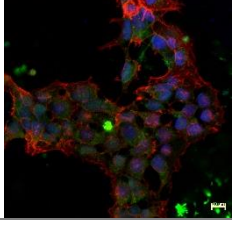
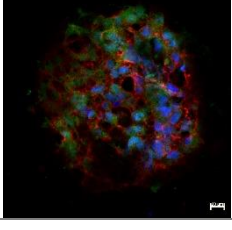
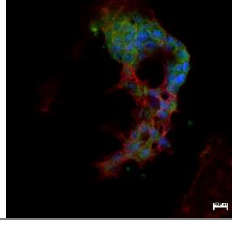
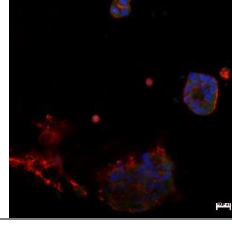
Tablo 3.1: 0-1-4-7-14 günler için HUVEC hücre tipi görüntüleri.

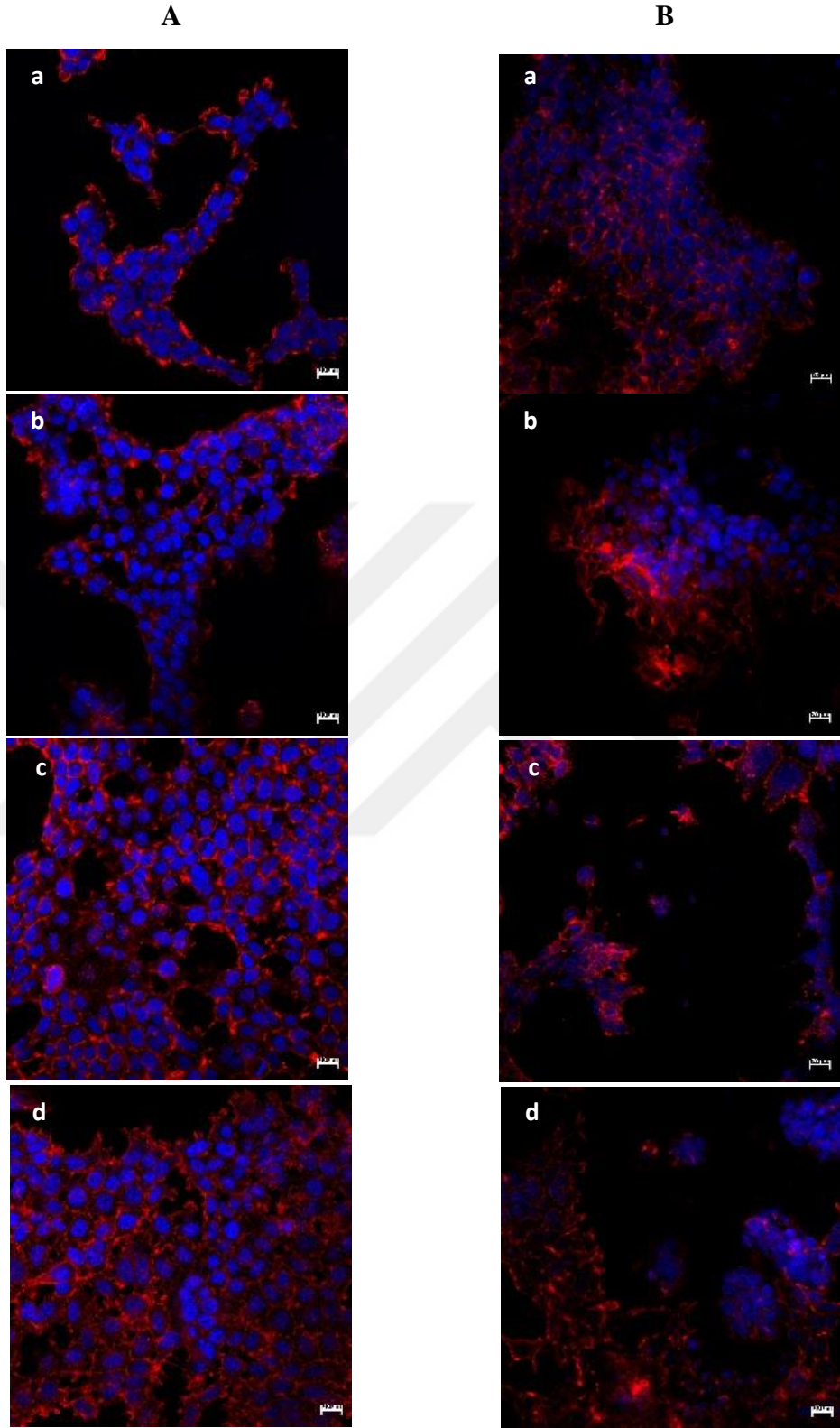
	HUVEC	HUVEC 20 μ M Citreo hybridonol	HUVEC 40 μ M Citreo hybridonol	HUVEC 80 μ M Citreo hybridonol
0				
1				
4				
7				
14				

Tablo 3.2: 0-1-4-7-14 günler için SH-SY5Y hücre tipi görüntüleri.

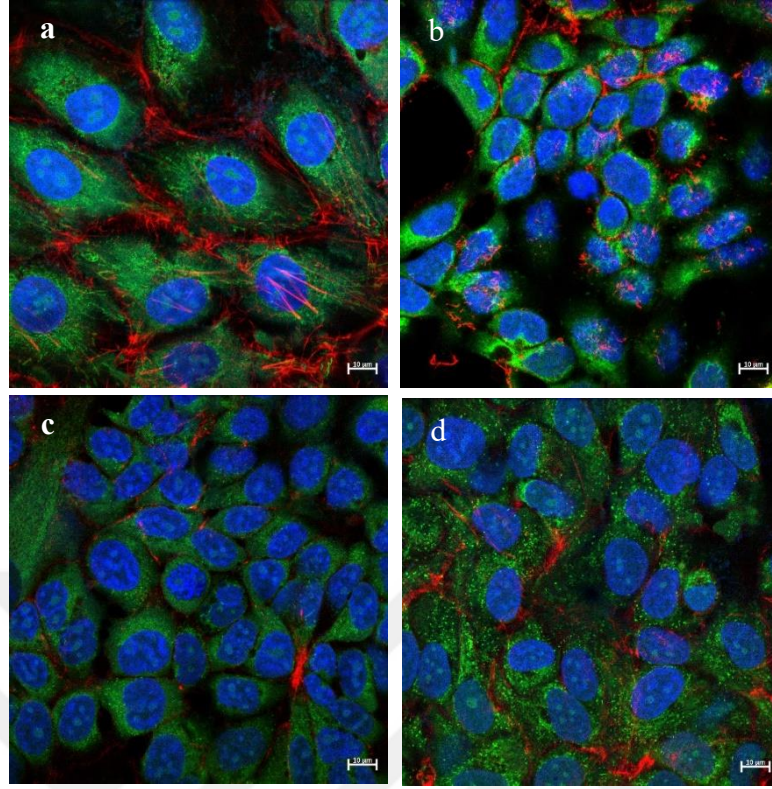
	SH-SY5Y	SH-SY5Y 20µM Citreohybridonol	SH-SY5Y 40 µM Citreohybridonol	SH-SY5Y 80 µM Citreohybridonol
0				
1				
4				
7				
14				

Tablo 3.3: 0-1-4-7-14 günler için HUVEC/SH-SY5Y ko-kültür görüntüleri.

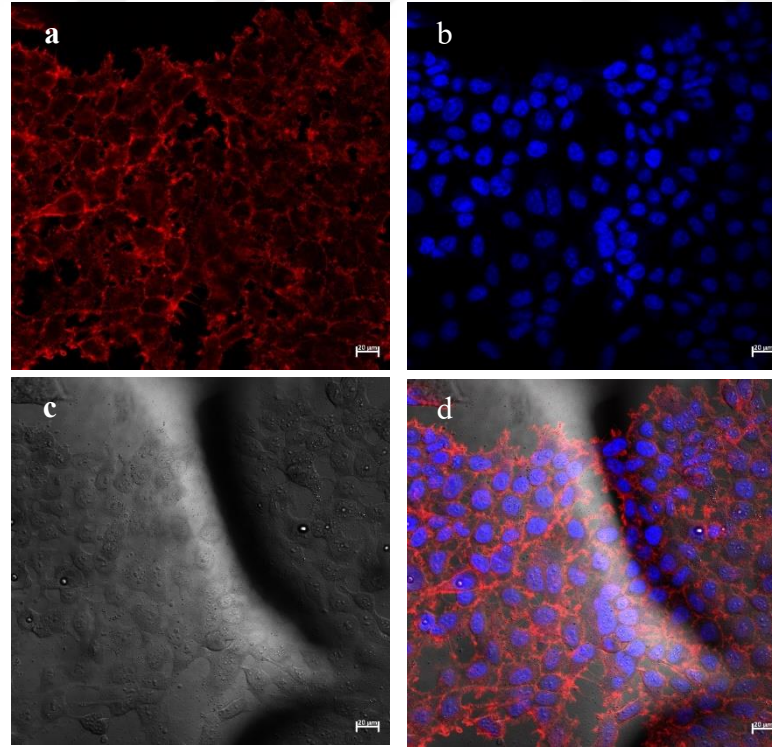
	HUVEC SH-SY5Y	HUVEC SH-SY5Y 20µM Citreohtonol	HUVEC SH-SY5Y 40 µM Citreohtonol	HUVEC SH-SY5Y 80 µM Citreohtonol
0				
1				
4				
7				
14				



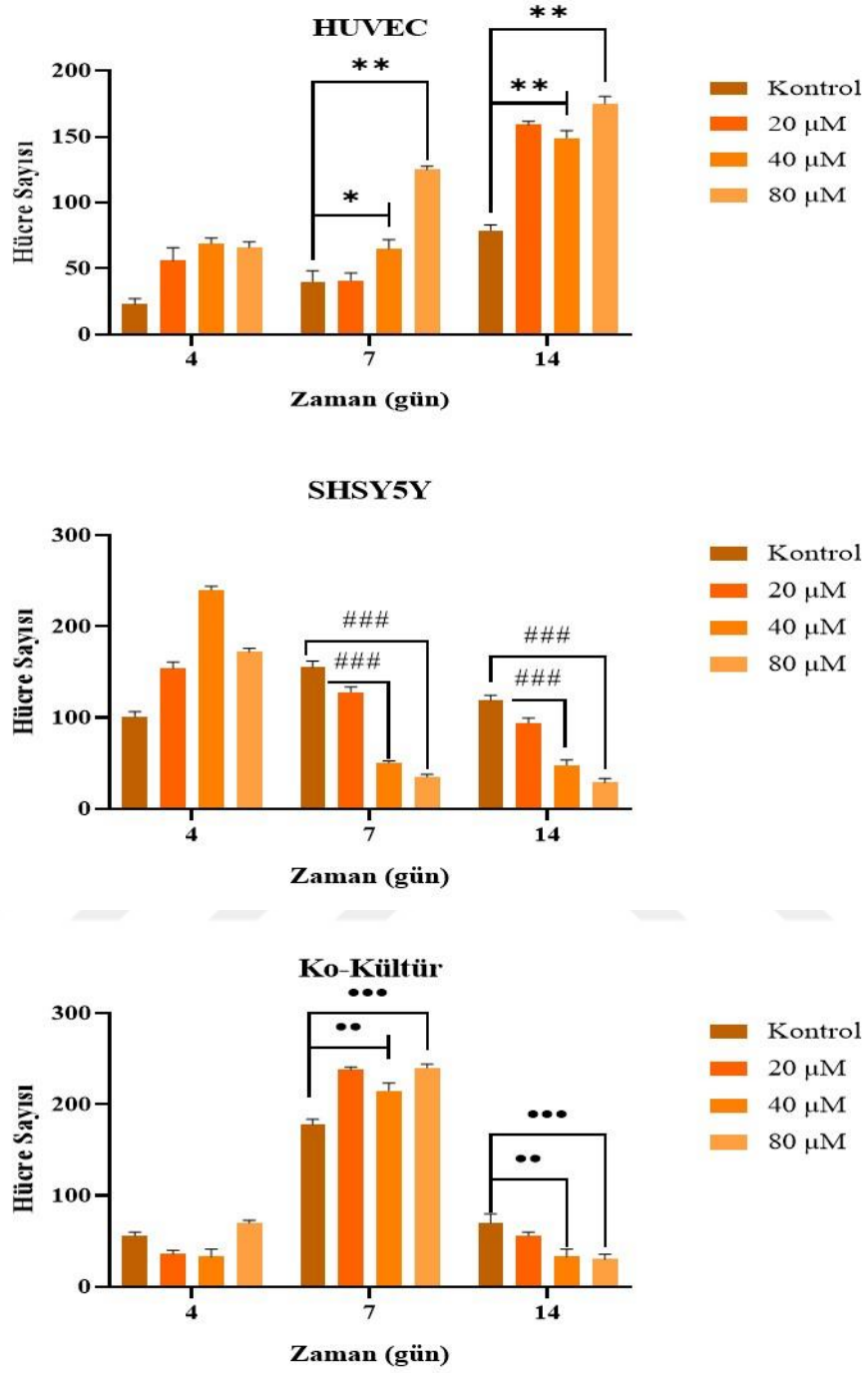
Şekil 3.16: A) 4. gün sonunda SH-SY5Y hücre tipinin büyümesi a) kontrol b) 20 μM c) 40 μM d) 80 μM B) 7. gün sonunda SH-SY5Y hücre tipinin büyümesi a) kontrol b) 20 μM c) 40 μM d) 80 μM .



Şekil 3.17: 7. gün sonunda ko-kültür hücrelerinin büyümesi a) kontrol b) 20 μ M c) 40 μ M d) 80 μ M.



Şekil 3.18: İki jel arasındaki geçiş a) Nestin b) DAPI c) aydınlık alan d) birleşme.



Sembol	P değeri
*	0,0049
**	0,0001
###	0,0001
..	0,0003
...	0,0001

Şekil 3.19: 4-7 ve 14. gün sonunda immünohistokimyasal görüntülerden elde edilen hücre sayıları ve istatistiksel analizi.

4. TARTIŞMALAR

4.1 JelMA Karakterizasyonu

Hücrenin hayatta kalması ve iskele malzemelerine bağlanma kabiliyeti, mühendislik dokularında çalışılabilmesi için gereklidir. Çalışmada hücreler için üç boyutlu kültür ortamını sağlamak amacıyla JelMA kullanılmıştır ve JelMA'nın mikro yapıların yüzeyinde hızlı hücre yapışmasına, çoğalmasına ve göçüne izin verdiği gözlemlenmiştir. Nichol ve arkadaşları çeşitli yoğunlukta JelMA kullanarak hücrelerin enkapsülasyonunu sağladıklarında hücre yoğunluğundaki benzer önemli farklılıkların yalnızca hücrelerin yayılımının artmasından kaynaklı olmadığını göstermişlerdir [69]. Aynı zamanda Lee ve arkadaşları da JelMA yoğunluğu arttıkça gözenek büyüklüğünün azaldığını belirlemişlerdir [56]. Fotopolimerize edilebilir jelatin metakrilat hidrojelinin, insan mezenkimal kök hücrelerinin endotel farklılaşmasını etkileri üzerine çalışan Lin ve arkadaşları %10 JelMA hidrojelinin, insan kemik iliği mezenkimal kök hücre tüp oluşumunu gerçekleştirmek için uygun koşulları sunduğunu belirtmişlerdir [60]. Bunun gibi nedenlerden dolayı daha yüksek yoğunlukta JelMA ile çalışmak tercih edilmemiştir.

4.2 Ko-kültür

3B hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin birlikte kültür edilebilmesi için Ersoy ve arkadaşları tarafından tasarlanan çekmece sistemi kullanılmıştır [20]. Ancak tasarlanan sistemin tek bir yönden kaynakla birleştirilmesi kullanım sırasında diğer yönlerden açılmaya neden olması veya her yönden kaynakla birleştirilmesi durumunda ise çekmece parçasının sisteme oturtulmasında sorun oluşturması gibi sebeplerden dolayı parçalar birbirine vidalama yöntemiyle tutturulmuştur.

4.3 Nörovasküler Etki

HUVEC ve SH-SY5Y hücrelerinin ko-kültür halinde ise kontrol grubuna göre hücre canlılığında azalma meydana gelse bile gün bazında canlılıkta artış gözlemlenmektedir. Kontrol grubuna göre canlılıktaki azalmanın nedeni olarak molekülün SH-SY5Y hücrelerinin canlılığında azalmaya neden olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Hücre canlılığının HUVEC hücrelerinde 14 gün boyunca kontrol grubuna kıyasla artması gözlemlenmiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Organize bir vasküler ağı bir mühendislik dokusuna dâhil etmek için, vasküler oluşum ve yeniden şekillenme sürecini anlamak önemlidir. Çünkü vücudumuzdaki damar hücreleri vaskülogenez ve anjiyogenez yolları ile oluşmaktadır.

Embriyonel dönemde öncü hücrelerin endotel hücrelere dönüşmesi sonucu yeni damarların oluşması vaskülogenez olarak adlandırılırken, var olan endotel hücre damarlarından yeni kılcal damarların oluşması da anjiyogenez olarak ifade edilmektedir [86].

Fonksiyonel vasküler ağların oluşturulması, doku greftlerinin hayatta kalması ve iskemik dokulara kan akışının düzenlenmesi açısından rejeneratif tıp için çok önemlidir.

Li ve arkadaşları tarafından yayınlanan doku onarımı ve yenilenmesinde anjiyogenezin rolü ile ilgili makalesinde de belirtildiği üzere de anjiyogenez, sinir büyümesi ve rejenerasyon ile yakından bağlantılıdır. Son zamanlardaki artan preklinik araştırmalar da da anjiyogenezin, periferik ve merkezi sinir sistemlerinde sinir yaralanmasından sonra hem onarımı hem de yenilenmeyi destekleyebileceğini göstermektedir [58].

4.4 Hücre Canlılığı

HUVEC ve SH-SY5Y hücrelerinin canlılık analizleri citreohyridonol molekülünün varlığında 0-1-4-7 ve 14 gün inkübasyon sürelerinde MTT ve H₂O₂ testleriyle incelenmiştir. Molekülün daha önce aktif BV2 hücreleri anti-nöroinflamatuvar etkisiyle ilgili çalışma yapılmıştır [15]. Ancak bu çalışma citreohyridonol molekülünün sinir

doku modelinde, endotel ve nöroblastom hücreleri üzerindeki etkisinin MTT ve H₂O₂ hücre canlılık testleri ile değerlendirilmesiyle ilgili ilk çalışmadır.

Çalışmada farklı molaritelerdeki citreohyridonol molekülü katkılanmış JelMA içerisinde enkapsüle edilen hücrelerin 14 gün süre ile bakılan canlılık analizlerinde endotel hücrelerinin vasküler oluşumu artmaktadır. Nöroblastom hücrelerinde ise 4. günden itibaren molekül molar miktarının artışıyla doğru orantılı olacak şekilde hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir. Bu çalışmada ki sonuçlar, citreohyridonol molekülünün vasküler oluşumu destekler iken SH-SY5Y hücrelerine karşı antikanser etkisinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Gür ve arkadaşları, yapmış olduğu bir çalışmada, bitkinin tohum, kök, yaprak ve meyve kısımlarından elde edilen ve birçok biyoaktif maddelere sahip olan Momordica charantia ekstresinin nöroblastom hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini incelemiştir. Bitkinin farklı bölgelerinden elde edilen ekstresinin farklı sitotoksik etkilere yol açtığını görmüşlerdir [30]. Bu nedenle, citreohyridonol molekülünün izolasyonu ve çeşitli kombinasyonlarının apoptotik etkilerinin araştırılması, yeni antikanser ajanların keşfedilmesini sağlayabilir.

5. SONUÇLAR

Ekibimiz tarafından bir önceki çalışma için tasarlanan üç boyutlu hidrojel ortak kültür sistemi üzerinde ufak değişiklikler yapılmıştır ve sistemde sinir dokunun basit bir modellenmesi yapılarak nöronal çalışmalardaki kolaylık sağlanmıştır.

Hücreler için üç boyutlu kültür ortamını sağlamak amacıyla JelMA sentezlenmiştir. Sentezlenen JelMA'nın yüzey morfoloji, por büyüklüğü, yüzey bileşimi analizleri gerçekleştirilmiş ve hidrojel formunun topografik görüntüsü incelenmiştir. Böylece JelMA'nın 3B hücre kültürü için uygunluğu belirlenmiştir. Sinir doku modellenmesi, insan göbek kordonu ven endotel hücresi ve insan nöroblastom hücrelerinin molekülsüz ve 20-40-80 oranlarında citreohybridonol molekülü katkılandırılmış jelatin metakrilat hidrojeline enkapsüle edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Katkılandırılan citreohybridonol molekülünün hücre canlılığına etkisi ve nörovasküler oluşuma katkısı üzerinde durulmuştur. Elde edilen bulgular sonucunda sağlıklı hücreye citreohybridonol molekülünün olumsuz bir etkisi gerçekleşmemiştir. Ancak HUVEC hücrelerinin canlılığındaki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Citreohybridonol molekülü, nöroblastom hücresinde 4. günden itibaren 20-40-80 μM oranındaki artan katkı miktarıyla doğru orantılı olacak şekilde hücre canlılığının azalmasına neden olmuştur. Bu verileri doğrulamak amacıyla immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Boyamalar sonucu konfokal mikroskop ile elde edilen görüntüler incelendiğinde hücre canlılığındaki artış ve azalma net bir şekilde görülmüştür.

6. ÖNERİLER

Yapılan çalışma sonunda tasarlanan cihazın, fotomaskelerin de kullanılmasıyla birbiriyle ilişkili iki farklı hücre tipinin ko-kültürlenmesini ve sisteme dışarıdan bir maddenin etkisini gözlemek için olanak sağladığını gördük. Bu veriler doğrultusunda düşünüldüğünde ileriki çalışmalarda;

- İki tip sağlıklı hücre üzerinde çalışmalar yapılarak molekülün nörovasküler etkileri incelenebilir.
- Citreohybridonol molekülünün SH-SY5Y üzerindeki sitotoksik etkisine bakıldığında molekülün, hangi yolak üzerinde apoptotik bir etki gösterdiği ile ilgili analizler yapılabilir.
- Daha fazla hücre hattı ve farklı güvenilir sitotoksosite analizleri ile ileri araştırmalar yapılabilir.
- Farklı yoğunluklarda JelMA kullanılarak enkapsülasyon yapılabilir.
- Citreohybridonol molekülünün nanoenkapsülasyonu üzerine çalışılabilir.
- Citreohybridonol molekülünün JelMA ile kimyasal birleşiminin nasıl gerçekleştiği ile ilgili veriler elde edilebilir.
- Farklı fotomaske tasarımları kullanılarak üç veya dört hücrenin ko-kültürlenmesi sağlanabilir.
- Bazı hastalıkların in-vitro modellenmesi yapılabilir. Örneğin istemli kas hareketinden sorumlu sinir hücrelerinin hasarından kaynaklı ALS hastalığını modellemek amacıyla kas ve sinir hücreleri ko-kültür edilebilir.
- Modellemesi yapılan hastalıkların tanı ve tedavisinde çeşitli moleküllerin, ilaçların test edilmesi sağlanabilir.

REFERANSLAR

- [1] Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*, 6(2), 105–121.
- [2] Aksöz, E. (2018). Nöroinflamasyonun epileptogenezdeki rolü ve antiepileptojenik tedavide nöroinflamasyona yönelik hedefler. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*, (8).
- [3] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell*.
- [4] Alvarez, K., & Nakajima, H. (2009). Metallic scaffolds for bone regeneration. *Materials*, 2(3), 790–832.
- [5] Asghari, F., Samiei, M., Adibkia, K., Akbarzadeh, A., & Davaran, S. (2017). Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(2), 185–192.
- [6] B.L, S., T.C, O., & A, P. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 34(4–5), 147–230.
- [7] Bhatia, S. N., Yarmush, M. L., & Toner, M. (1997). Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: Hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34(2), 189–199.
- [8] Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K., & Roveri, N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22, 763–768.
- [9] Boddolla, S., & Thodeti, S. (2018). A review on characterization techniques of nanomaterials. *International Journal of Engineering, Science and Mathematics*, 7(1), 169–175.
- [10] Brossard, J., Bernstein, M. L., & Lemieux, B. (1996). Neuroblastoma: An enigmatic disease. *British Medical Bulletin*, 52(4), 787–801.
- [11] Burdick, J. A., Chung, C., Jia, X., Randolph, M. A., & Langer, R. (2005). Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules*, 6(1), 386–391.
- [12] Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252–26.
- [13] Cha, C., Oh, J., Kim, K., Qiu, Y., Joh, M., Shin, S. R., ... Khademhosseini, A. (2014). Microfluidics-assisted fabrication of gelatin-silica core-shell microgels for injectable tissue constructs. *Biomacromolecules*, 15(1), 283–290.
- [14] Chien, H. W., Tsai, W. B., & Jiang, S. (2012). Direct cell encapsulation in biodegradable and functionalizable carboxybetaine hydrogels. *Biomaterials*, 33(23), 5706–5712.
- [15] Cho, K., Kim, D., Yoon, S., Min, W., Jun, S., Hak, J., ... Oh, H. (2016). Neurochemistry international anti-neuroinflammatory effects of

- citreo hybridonol involving TLR4- MyD88-mediated inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways in. *Neurochemistry International*, 95, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.12.010>
- [16] De Vries, H. E., Kuiper, J., De Boer, A. G., Van Berkel, T. J. C., & Breimer, D. D. (1997). The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacological reviews*, 49(2), 143–155.
- [17] Domard, A., & Domard, M. (2002). Chitosan: Structure-properties relationship and biomedical applications. İçinde D. Severian (Ed.), *Polimeric Biomaterials* (Second, C. 6, s. 103). New York: Marcel Dekker, Inc.
- [18] Dorozhkin, S. V. (2009). Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*, 2(2), 399–498.
- [19] Duygu, D., Baykal, T., Açıkgöz, I., & Yıldız, K. (2009). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. *Gazi University Journal of Science*, 22(3), 117–121.
- [20] Ersoy, F., & Sokullu, E. (2019). A compartmental 3D scaffold fabrication and alignment device for neurovascular co-culture and tri-culture. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 1–22.
- [21] Fairbanks, B. D., Schwartz, M. P., Bowmana, C. N., & Anseth, K. S. (2009). Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*, 30(35), 6702–6707.
- [22] Félétou M. (2011). Introduction. İçinde *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*.
- [23] Feynman, R. (1959). Conclusion : “ Plenty of Room at the Bottom ”. *Engineering and Science* 22–36, (December).
- [24] Fisher, J. P., Mikos, A. G., Bronzino, J. D., & Peterson, D. R. (2012). *Tissue engineering: principles and practices*. <https://doi.org/10.1201/b13978>
- [25] Fishman, A. P. (1982). Endothelium: A distributed organ of diverse capabilities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 401(1), 1–8.
- [26] Florey, L. (1966). The endothelial cell. *British Medical Journal*, 2, 487–490.
- [27] Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Sato, K., Harada, H., Hiraoka, M., ... Kawakami, K. (2014). Combination of hybrid peptide with biodegradable gelatin hydrogel for controlled release and enhancement of anti-tumor activity in vivo. *Journal of Controlled Release*, 176(1), 1–7.
- [28] Goers, L., Freemont, P., & Polizzi, K. M. (2014). Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *Journal of The Royal Society*, 11, 46–53. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0065>
- [29] Gümüşderelioğlu, M. (2007). Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji. *Science*, 1–15.
- [30] Gür, H., Özen, F., Akalin, E., & Arslan, B. (2018). Cytotoxicity, total phenolic and flavonoid contents of Momordica Charantia extract in Neuroblastoma cells. *The Journal of Neurobehavioral Sciences*, 5(January).
- [31] Gürkan, U. A., Fan, Y., Xu, F., Erkmen, B., Urkac, E. S., Parlakgul, G., ... Demirci, U. (2013). Simple precision creation of digitally specified, spatially heterogeneous, engineered tissue architectures. *Advanced Materials*, 25(8), 1192–1198.
- [32] Halstenberg, S., Panitch, A., Rizzi, S., Hall, H., & Hubbell, J. A. (2002).

- Biologically engineered protein-graft-poly(ethylene glycol) hydrogels: A cell adhesive and plasmin-degradable biosynthetic material for tissue repair. *Biomacromolecules*, 3(4), 710–723.
- [33] Hamilton, S. K., Bloodworth, N. C., Massad, C. S., Hammoudi, T. M., Suri, S., Yang, P. J., ... Temenoff, J. S. (2013). Development of 3-D Hydrogel Culture Systems With On-Demand Cell Separation. *Biotechnol J.*, 8(4), 485–495.
- [34] Hitchcock, S. A., & Pennington, L. D. (2006). Structure-brain exposure relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(26), 7559–7583.
- [35] Hoare, T. R., & Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993–2007.
- [36] Hoque, M. E., Nuge, T., Yeow, T. K., Nordin, N., & Prasad, R. G. S. V. (2014). *Gelatin Based Scaffolds for Tissue Engineering—A Review*. 9(1).
- [37] Huang, J. (2014). Ceramic biomaterials for tissue engineering. A. R. Boccaccini & P. X. Ma (Ed.), *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers Second Edition*.
- [38] Hubbell, J. A. (1996). Hydrogel systems for barriers and local drug delivery in the control of wound healing. *Journal of Controlled Release*, 39(2–3), 305–313. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00162-X](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00162-X)
- [39] Inoue, S. (2006). Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. J. B. Pawley (Ed.), *In Handbook of biological confocal microscopy* (ss. 20–42). Madison, USA: Springer.
- [40] Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T. N., & Penttinen, R. (2009). *Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy*. 61(2), 198–223.
- [41] Joshi, M., Bhattacharyya, A., & Ali, S. W. (2008). Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 33(3), 304–317.
- [42] Khademhosseini, A., May, M. H., & Sefton, M. V. (2006). Conformal Coating of Mammalian Cells Immobilized onto Magnetically Driven Beads. *Tissue Engineering*, 11(11–12), 1797–1806.
- [43] Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*.
- [44] Kim, I. S., Jeong, Y. II, & Kim, S. H. (2000). Self-assembled hydrogel nanoparticles composed of dextran and poly(ethyleneglycol) macromer. *International Journal of Pharmaceutics*, 205(1–2), 109–116.
- [45] Kim, Y. H., Furuya, H., & Tabata, Y. (2014). Enhancement of bone regeneration by dual release of a macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma from gelatin hydrogels. *Biomaterials*, 35(1), 214–224.
- [46] Kirkpatrick, C. J., Fuchs, S., & Unger, R. E. (2011). Co-culture systems for vascularization - Learning from nature. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4), 291–299.
- [47] Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J. W. P., Malda, J., & Melchels, F. P. W. (2018). Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends Biotechnol*, 34(5), 394–407. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.002>
- [48] Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol.*, 1078, 9–21.
- [49] Kurecic, M., Sfiligoj-Smole, M., & Stana-Kleinschek, K. (2012). Uv

- Polymerization of Poly (N-Isopropylacrylamide) Hydrogel. *Materials and Technology*, 46(1), 87–91.
- [50] Kwak, B. S., Choi, W., Jeon, J. won, Won, J. I., Sung, G. Y., Kim, B., & Sung, J. H. (2018). In vitro 3D skin model using gelatin methacrylate hydrogel. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 66, 254–261.
- [51] Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). *Tissue Engineering*. 260(5110), 1–102.
- [52] Lanza, R., Langer, R., & Vacanti, J. (2007). *Principles of Tissue Engineering*.
- [53] Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications Sophie. *Chemical Reviews*, 108, 2064–2110.
- [54] Lawrence, T. S., Beers, W. H., & Gilula, N. B. (1978). Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature*, 272(5653), 501–506.
- [55] Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev.*, 101(7), 1869–1879.
- [56] Lee, Y., Lee, J. M., Bae, P. K., Chung, I. Y., Chung, B. H., & Chung, B. G. (2015). Photo-crosslinkable hydrogel-based 3D microfluidic culture device. *Electrophoresis*, 36(7–8), 994–1001. <https://doi.org/10.1002/elps.201400465>
- [57] Li, J., & Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12).
- [58] Li, W. W., Talcott, K. E., Zhai, A. W., Kruger, E. A., & Li, V. W. (2005). The role of therapeutic angiogenesis in tissue repair and regeneration. *Advances in skin & wound care*, 18(9), 491–500.
- [59] Lien, S. M., Ko, L. Y., & Huang, T. J. (2009). Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5(2), 670–679.
- [60] Lin, C. H., Su, J. J. M., Lee, S. Y., & Lin, Y. M. (2018). Stiffness modification of photopolymerizable gelatin-methacrylate hydrogels influences endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(10), 2099–2111.
- [61] Liveri, V. T. (2006). Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems Vincenzo. İçinde D. J. Lockwood (Ed.), *Nanostructure Science and Technology*. Springer.
- [62] Matassi, F., Nistri, L., Paez, D. C., & Innocenti, M. (2011). New biomaterials for bone regeneration Mini-review. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 8(1), 21–24.
- [63] Mettlen, M., Chen, P.-H., Srinivasan, S., Danuser, G., & Schmid, L. S. (2018). Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis Marcel. *Annu Rev Biochem.*, 87, 871–896.
- [64] Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*, 196(3), 430–443.
- [65] Miller, J. C., Serrato, R. M., Represas-Cardenas, J. M., & Kundahl, G. A. (2005). the Handbook of Nanotechnology. İçinde *Analysis*.
- [66] Mironi-Harpaz, I., Wang, D. Y., Venkatraman, S., & Seliktar, D. (2012). Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomaterialia*, 8(5), 1838–1848.
- [67] Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying

- nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934.
- [68] Nguyen, K. T., & West, J. L. (2002). Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23, 4307–4314.
- [69] Nichol, J. W., Koshy, S. T., Bae, H., Hwang, C. M., Yamanlar, S., & Khademhosseini, A. (2010). Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, 31(21), 5536–5544.
- [70] Özkaya, F. C., Ebrahim, W., Klopotoski, M., Liu, Z., Janiak, C., & Proksch, P. (2018). Isolation and X-ray structure analysis of citreohydrin from marine-derived *Penicillium atrovirens*. *Natural Product Research*, 32(7), 840–843. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1311893>
- [71] Pajouhesh, H., & Lenz, G. R. (2005). Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx*, 2(4), 541–553. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.4.541>
- [72] Panneerselvam, S., & Choi, S. (2014). Nanoinformatics: Emerging databases and available tools. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 7158–7182.
- [73] Park, J., & Lakes, R. S. (2007). Polymeric Implant Materials. İçinde *Biomaterials An Introduction Third Edition* (C. 1952, ss. 173–205).
- [74] Peiffer, R. W. (1993). *Photopolymerization Fundamentals and Applications* (Chapter 1; W. Bowman, Christopher; Scranton, Alec, B.; Peiffer, Robert, ed.). American Chemical Society.
- [75] Pérez, C. M., Panitch, A., & Chmielewski, J. (2011). A collagen peptide-based physical hydrogel for cell encapsulation. *Macromolecular Bioscience*, 11(10), 1426–1431.
- [76] Pries, A. R., & Kuebler, W. M. (2004). Handbook of Experimental Pharmacology: Introduction. İçinde S. Moncada & A. Higgs (Ed.), *The Vascular Endothelium I* (C. 176, ss. 1–40).
- [77] Puckert, C., Tomaskovic-Crook, E., Gambhir, S., Wallace, G. G., Crook, J. M., & Higgins, M. J. (2017). Electro-mechano responsive properties of gelatin methacrylate (GelMA) hydrogel on conducting polymer electrodes quantified using atomic force microscopy. *Soft Matter*, 13(27), 4761–4772.
- [78] Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 33(6), 362–369.
- [79] Richards, D. M., & Endres, R. G. (2014). The mechanism of phagocytosis: Two stages of engulfment. *Biophysical Journal*, 107(7), 1542–1553.
- [80] Saçak, M. (1998). Polimer Kimyasına Giriş. İçinde *A.Ü.F.F. Döner Sermaye İşletmesi Yayınları*. Anak.
- [81] Saini Komal. (2017). Preparation method, properties and crosslinking of hydrogel: a review. *Pharma Tutor*, 5(1), 27–36.
- [82] Schmid, G. (2008). The Nature of Nanotechnology. İçinde G. Schmid (Ed.), *Nanotechnology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [83] Shastri, P., Basu, A., & Rajadhyaksha, M. S. (2001). Neuroblastoma Cell Lines- A Versatile in Vzro Model in Neurobiology. *International Journal of Neuroscience*, 108(42006), 109–126.
- [84] Srivastava, S., Gorham, S. D., & Courtney, J. M. (1990). The attachment and growth of an established cell line on collagen, chemically modified collagen, and collagen composite surfaces. *Biomaterials*, 11(3), 162–168.
- [85] Tanigucci, N. (1974). On the Basic Concept of Nanotechnology. *Proceedings of*

the International Conference on Production Engineering. Tokyo.

- [86] Tekeli, Özgür, S., & Emerk, K. (2007). Endotel progenitor hücreler. *Marmara Medical Journal*, 20(1), 59–65.
- [87] Tibbitt, M. W., & Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4), 655–663.
- [88] Tiwari, J. N., Tiwari, R. N., & Kim, K. S. (2012). Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57(4), 724–803.
- [89] Van Den Bulcke, A. I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E. H., Cornelissen, M., & Berghmans, H. (2000). Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules*, 1(1), 31–38.
- [90] Wolde, A. ten. (1998). *Nanotechnology Towards a molecular construction kit*.
- [91] Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., & Chua, C.-K. (2001). The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679–689.
- [92] Yazır, Y., & Dalçık, H. (2012). An Important Method in the Investigation of Vascular Pathologies: Endothelial Cell Culture. *Kosuyolu Kalp Dergisi*, 15(3), 137–142.
- [93] Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M. M., Tamayol, A., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 73, 254–271.
- [94] Zhao, J., & Stenzel, M. H. (2018). Entry of nanoparticles into cells: The importance of nanoparticle properties. *Polymer Chemistry*, 9(3), 259–272.
- [95] Zhu, J., & Marchant, R. (2012). Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*, 8(5), 607–626.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: İrem POLAT

Doğum Tarihi: 27.03.1995

Uyruk: Türk

Eğitim:

Dokuz Eylül Üniversitesi

Mühendislik Fakültesi

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği

Lisans Derecesi
(2013-2017)

Ortalama: 3,23 GPA

Bitirme Tezi: Kalsiyum Fosfat Kaplamaların
Kemik Oluşum Özelliklerine Etkisi

Lise

(2009-2013)

Düzce Arsal Anadolu Lisesi