

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DİZAYN EDİLEN BİYOFONKSİYONEL YÜZEYLER
ÜZERİNDE FARKLI MEMELİ HÜCRELERİNİN
ADEZYONUNUN İNCELENMESİ

Gizem OYMAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 21.08.2014

Bornova-İZMİR
2014

Gizem OYMAN tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “**Dizayn Edilen Biyofonksiyonel Yüzeyleer Üzerinde Farklı Memeli Hücrelerinin Adezyonunun İncelenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliđi ile E.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **21.08.2014** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

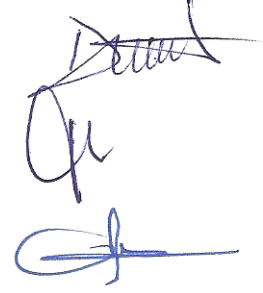
Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

Raportör Üye : Prof. Dr. Suna TİMUR

Üye : Doç. Dr. Metin AK

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Dizayn edilen biyofonksiyonel yüzeyler üzerinde farklı memeli hücrelerinin adezyonunun incelenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

21 / 08 /2014

İmzası



Adı-Soyadı

Gizem OYMAN

ÖZET**DİZAYN EDİLEN BİYOFONKSİYONEL YÜZEYLER ÜZERİNDE
FARKLI MEMELİ HÜCRELERİNİN ADEZYONUNUN
İNCELENMESİ**

OYMAN, Gizem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

Ağustos 2014, 47 sayfa

Bu çalışmada 3-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)anilin monomerinin ITO cam üzerinde elektropolimerizasyonu ve hücre kültürü uygulamaları için yüzey kaplama materyali olarak kullanımı test edildi. İletken polimer üzerindeki fonksiyonel gruplar sayesinde yüzeylerin arginilglisilaspartik asit (RGD) peptidi ile EDC kimyası kullanılarak post-modifikasyonu gerçekleştirildi. Yüzey karakterizasyonu amacıyla taramalı elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu, temas açısı ve yüzey iletkenlik ölçümleri gerçekleştirildi. Peptit-konjuge yüzeyler üzerinde maymun böbrek fibroblast benzeri epiteli hücreleri (Vero), insan nöroblastoması (SH-SY5Y) ve insan immortal deri keratinositi (HaCaT) gibi birçok farklı hücre hattının adezyon ve proliferasyonu izlenmiştir. Bu hücreler RGD-modifiye, polimer kaplı-ITO cam ve ticari polistiren yüzeyler üzerinde karşılaştırma amacıyla kültüre edildi. Verilere göre, bütün yüzeyler içerisinde hücre adezyonunu ve proliferasyonunu en iyi destekleyen ITO camların polimerle kaplanması sonrasında RGD ile modifiye edildiği yüzeylerdir. Hücre görüntüleme çalışmaları biyofonksiyonel hale getirilmiş yüzeyler üzerinde farklı mikroskop teknikleri ile 72 saate kadar gerçekleştirildi. Bu sebeple, geliştirilen yeni biyofonksiyonel yüzey ilaçların ve kimyasalların hücre canlılığı ve morfolojisi üzerindeki etkilerinin incelenebilmesi ve çip üzerinde hücre kültürü uygulamaları gibi ileriki çalışmalar için ümit vaat eden bir materyeldir.

Anahtar sözcükler: Fonksiyonel yüzeyler, İletken polimerler, Hücre adezyonu

ABSTRACT**INVESTIGATION OF DIFFERENT MAMMALIAN CELL
ADHESION ON DESIGNED BIOFUNCTIONAL SURFACES**

OYMAN, Gizem

MSc in Biotechnology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

August 2014, 47 pages

In this study, we report the electropolymerization of 3-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)aniline monomer on ITO glass and its use as a coating material for the cell culture applications. Functional groups on the conducting polymer backbone provide post-modification of the surface with arginylglycylaspartic acid (RGD) peptide via EDC Chemistry. Scanning electron microscopy, atomic force microscopy, contact angle and surface conductivity measurements of the modified surfaces were carried out for the surface characterization. The peptide conjugated surface was applied for adhesion and proliferation of several cell lines such as Monkey kidney epithelial cells (Vero), human neuroblastoma (SH-SY5Y), and human immortalized skin keratinocyte (HaCaT). These cells were cultured on RGD modified-, polymer coated-ITO glass as well as conventional polystyrene surfaces for the comparison. Data indicate that, the RGD modified surfaces after coating with polymers of ITO glass exhibited better cell adhesion and proliferation among all surfaces compared. Cell imaging studies up to 72 h were performed on these surfaces by different microscopy techniques. Therefore, the novel bio-functional substrate is a promising candidate for further studies such as monitoring the effects of drugs and chemicals on the cellular viability and morphology as well as cell-culture-on chip applications.

Key words: Functional surfaces, Conducting polymers, Cell adhesion

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle her konuda yanımda olan danışmanım Sayın Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL'a,

Tez çalışmalarım boyunca ihtiyacım olduğu her an, her konuda tereddütsüz yardımlarını sunan Sayın Prof. Dr. Suna TİMUR'a,

Tez çalışmam süresince zamanını ve fikirlerini paylaşan Prof. Dr. Hakan COŞKUNOL'a,

Çalışmanın polimer sentezi kısmında yardımlarını esirgemeyen, zamanını ve fikirlerini paylaşan Doç. Dr. Metin AK ve ekibine,

Laboratuvar çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen birlikte çalıştığımız, vakit geçirdiğimiz, paylaşımlarda bulunduğumuz tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Eğitimim için hayatımın her döneminde imkânlarını seferber eden, desteklerini bir an olsun esirgemeyen AİLEM'e,

Manevi desteğiyle sürekli yanımda olan Saltuk Mustafa EYRİLMEZ'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 14.FEN.023 no'lu proje kapsamında ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 113Z918 no'lu proje kapsamında desteklendi.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
1.1 Hücre Çipleri	1
1.2 Hücre-Çiplerinin Temel Bileşenleri	4
1.3 İletken Polimer Filmler	5
1.4 Biyofonksiyonel Yüzey Tasarımında Sıklıkla Kullanılan İletken Polimerler	7
1.3.1 Polipirol	7
1.3.2 Polianilin	7
1.3.3 Politiyofen	8
1.5 Biyomoleküllerin İletken Polimer Filmler Üzerine İmmobilizasyon Yöntemleri	9
1.6 Modifiye Yüzeyler Üzerinde Hücre Adezyonu	10

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.7 RGD Peptidi Aracılığıyla Hücre Adezyonu.....	12
2. MATERYAL VE METOT	16
2.1 Materyaller	16
2.2 Cihazlar	16
2.3 İletken Polimerin Sentezi	17
2.4 Biyofonksiyonel Yüzeylerin Hazırlanması	17
2.5 Yüzeylerin CV ve DPV ile Karakterizasyonu	19
2.6 Yüzeylerin SEM ile Karakterizasyonu	20
2.7 Yüzeylerin Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Karakterizasyonu	20
2.8 Yüzeyle Ait Temas Açısı Ölçümü	20
2.9 Yüzeylerde İletkenlik Ölçümü	21
2.10 Hücre Kültürü	21
2.11 Hücre Görüntülemesi	21
2.12 Image J Programı ile Hücre Sayısının Belirlenmesi	23
2.13 İstatiksel Analizler	23
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	24
3.1 Biyofonksiyonel Yüzeylerin Hazırlanması	24
3.2 Yüzeylerin CV ve DPV İle Karakterizasyonu	26
3.3 Yüzeyle Ait Temas Açısı Ölçümü	28
3.4 Yüzeylerde İletkenlik Ölçümü	28
3.5 Yüzeylerin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu	28
3.6 Yüzeylerin AFM ile Karakterizasyonu	29
3.7 Yüzeyler Üzerinde Hücre Adezyonu ve Proliferasyonu.....	31

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4. GENEL SONUÇLAR.....	39
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Hücre biyolojisi laboratuvarında kullanılabilecek bir lab-on-a chip sistemi.....	3
1.2 Polipirolün şematik gösterimi.	7
1.3 Polianilin şematik gösterimi.	8
1.4 Politiyofenin şematik gösterimi.	8
1.5 Geliştirilen immobilizasyon metotlarının şematik gösterimi.(A) Biyomoleküllerin elektrostatik etkileşimlerle polimer filmler üzerine fiziksel adsorpsiyonu. (B) Biyomolekül ve polimerize film arasında kovalent bağlama. (C) Çapraz bağlama ve direkt biyomoleküllerin elektropolimerizasyonu. (D) Biotin/avidin affinite sistemi tarafından verilen temel film ile biyomoleküllerin affinite etkileşimleri üzerinden bağlanması. (E) Bir polimer filmin elektrokimyasal büyümesi boyunca tutuklanması (Querghi et al., 2001).....	10
1.6 Fibroblastik L-hücrelerinin yumuşak ECM proteini kaplı kısımlardan sert ECM proteini kaplı kısımlara doğru yönelimi (Ladoux and Nicolas, 2012).....	11
1.7 ECM protein organizasyonlarının şematik gösterimi (Alberts et al., 2002).....	12
1.8 ECM proteinleriyle integrinlerin etkileşiminin şematik gösterimi (Alberts et al., 2002).....	13
1.9 İntegrin alt birimlerinin RGD peptidi ile etkileşiminin şematik gösterimi (Alberts et al., 2002).....	14
1.10 Hücre-yüzey etkileşimlerinin şematik gösterimi. (Alberts et al., 2002).....	15
2.1 SNS-mNH ₂ polimerinin yapısı.....	18

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.2 Biyofonksiyonel yüzeylerin hazırlanma aşamalarının şematik gösterimi.	19
2.3. Hücre sayısının Image J programı ile belirlenmesinin adım adım şematik gösterimi.	23
3.1 SNS-mNH ₂ monomerine ait a) ¹³ C-NMR ve b) ¹ H-NMR spektraları.....	25
3.2 İTO üzerinde SNS-mNH ₂ biriktirilmesine ilişkin grafik.....	26
3.3 a) Farklı tarama hızlarındaki döngüsel voltammogramlar. Ekli küçük resim pik akımının tarama hızına karşı olan grafiğini göstermektedir. b) İTO (Mavi), İTO/mSNS-NH ₂ (Kırmızı) ve İTO/SNS-mNH ₂ /RGD (Siyah) yüzeylerine ait diferansiyel puls voltammetrisi sonuçları.	27
3.4 a) İTO/mSNS-NH ₂ ve b) İTO/SNS-mNH ₂ /RGD yüzeylere ait SEM görüntüleri.	29
3.5 a) İTO/mSNS-NH ₂ ve b) İTO/SNS-mNH ₂ /RGD yüzeylere ait 3-D topografik AFM görüntüleri.....	30
3.6 Yüzeyler üzerindeki alan başına düşen hücre sayısının grafiksel gösterimi.....	32
3.7 Farklı yüzeylerin zamana bağlı hücre sayısı açısından karşılaştırılması.	33
3.8 İTO/SNS-mNH ₂ /RGD yüzeyler üzerinde Vero hücre morfolojisinin (a) 2-ve (b) 3-boyutlu topografik AFM yükseklik resimleri.	34
3.9 Vero hücre hattının a) PS, b) İTO/SNS-mNH ₂ , ve c) İTO/SNS-mNH ₂ /RGD yüzeyler üzerindeki proliferasyonu. (Aktin (Kırmızı) ve DAPI (yeşil)). Ölçek çubuğu 50 µm.	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.10 HaCaT hücre hattının a) PS, b) İTO/SNS-mNH ₂ , ve c) İTO/SNS-mNH ₂ /RGD yüzeyler üzerindeki proliferasyonu. (Aktin (Kırmızı) ve DAPİ (yeşil)). Ölçek çubuğu 50 µm.....	36
3.11 SH-SY5Y hücre hattının a) PS, b) İTO/SNS-mNH ₂ , ve c) İTO/SNS-mNH ₂ /RGD yüzeyler üzerindeki proliferasyonu. (Aktin (Kırmızı) ve DAPİ (yeşil)). Ölçek çubuğu 50 µm.....	36
3.12 Vero, HaCaT ve SH-SY5Y hücrelerinin PS, İTO/SNS-mNH ₂ ve İTO/SNS-mNH ₂ /RGD yüzeyler üzerindeki proliferasyonunun karşılaştırmalı olarak incelenmesi.	37
3.13 SH-SY5Y hücre hattının (a) İTO/SNS-mNH ₂ ve (b) İTO/SNS-mNH ₂ /RGD yüzeyler üzerindeki hücre proliferasyonuna ait SEM görüntüleri.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 İletken polimerlerin biyolojik uygulamaları.....	6
3.1 EDX analizi sonucunda yüzeylerin atomik özelliklerinin karşılaştırılması.	29
4.1 Literatürdeki benzer çalışmalar	40

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
CV	Döngüsel Voltammetri
DPV	Diferansiyel Puls Voltammetri
Vero	İnsan Fibroblast Benzeri Epitel Hücresi
HaCaT	İnsan İmmortal Deri Keratinosit Hücresi
SH-SY5Y	İnsan Nöroblastom Hücresi
ECM	Hücre Dışı Matriks
SNS-mNH ₂	3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin
RGD	Arginilglisilaspartik Asit
İTO	İndiyum Kalay Oksit
İTO/SNS-mNH ₂	İletken Polimer Kaplı Yüzey
İTO/SNS-mNH ₂ /RGD	RGD Modifiye Yüzey
PS	Polistiren Kaplı Yüzey
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
MTT	3-(4,5-Dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum Bromid
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)-karbodiimid

1. GİRİŞ

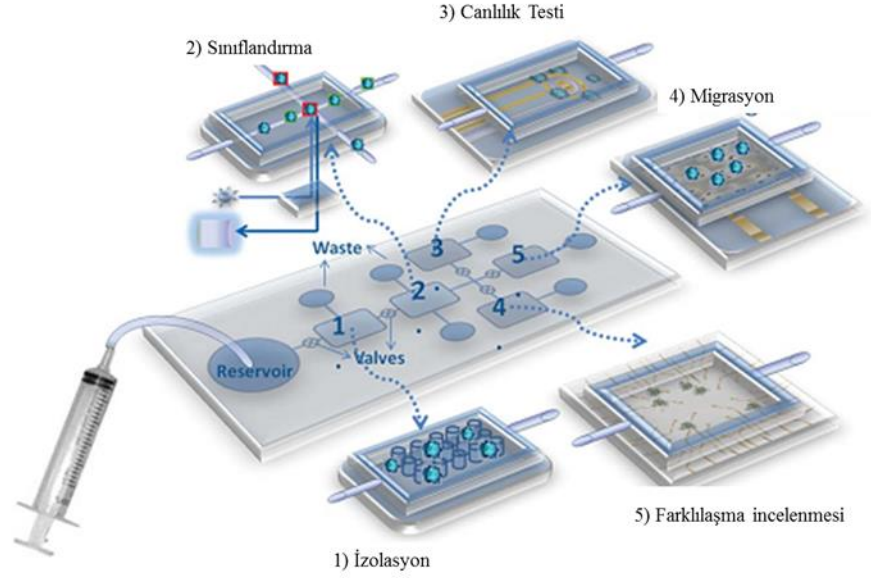
Yaşamın temelindeki mekanizmalar ve bu mekanizmalardaki düzensizliklerin yol açtığı hastalıklar biyoloji biliminin araştırmalarının ana hedefleridir. Fakat bütün organizmanın direkt incelenmesi çok zor ve hatta neredeyse imkânsızdır. Canlı organizmaların temel yapıtaşı olan hücre, komple doku, organ ve hatta hayvanları ve insanoğlunu içine olan bütün organizmalar hakkında çok önemli bilgiler vermektedir. Canlı hücrelerin bu karakteristik özellikleri ilaçların ve kimyasalların etkilerinin hızlıca gözlemlenebilmesini sağlayan *in vitro* testlerin geliştirilmesine imkân tanımaktadır. Bu açıdan, hücre kültürü hücresel mekanizmaların ve hücrelerin fizyolojik koşullardaki davranışlarının veya kimyasal uyarılara karşı verdikleri tepkilerin incelenmesini sağlayan ana araçtır. Hücre kültürü teknikleri neredeyse bir yüzyıldır değişme de, ölçek büyütmedeki zorluklardan ötürü modern çalışmalar için yetersiz kalmaktadır. Şimdiye kadar, ilaçların ve kimyasalların toksisitelerinin incelenmesi amacıyla hücresel cevapları ve hücre canlılığını test eden birçok farklı optik ve floresans metot geliştirilmiştir. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolyum bromid (MTT), tripan mavisi ve 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) gibi kimyasalları içerecek şekilde geliştirilen yöntemler hücre canlılığını belirlemede en çok kullanılan yöntemlerdir (Andersson and van den Berg, 2003). Fakat bu teknikler hücre canlılığını belirlemek amacıyla çeşitli sinyal hatalarına yol açabilecek optik kaynakları kullanmaktadırlar. Bu nedenle daha hassas ve duyarlı ölçümlerin yapılabilmesi için modern tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

1.1 Hücre Çipleri

Hassasiyeti artırma potansiyeli açısından, mikro-fabrikasyon teknolojisindeki ilerlemeler sensörlerin minyatürleştirilmesi ve entegrasyonunu gerçekleştirerek ucuz ve çalışması kolay araçların gelişmesini sağlamaktadır. Lab-on-a chip formatında dizayn edilen bu araçlar, hücre kültürü uygulamalarındaki birçok sınırlayıcı faktörün üstesinden gelme potansiyelleri açısından oldukça büyük öneme sahiptirler. Örneğin, birçok geleneksel hücre kültürü yöntemi canlı hücrelerin gerçek zamanlı olarak görüntülenmesini gerçekleştiremezken, hücresel

proseslerin anlık görüntülerini verebilmektedir. Biyolojik proseslerin dinamik doğası gereği, bu bilgide büyük bir kayba neden olmaktadır. Çünkü çoğu zaman biyolojik proseslerde yalnızca ana prosesin nasıl işlediğini bilmek yetmez, ara basamakların ve zaman skalasının belirlenmesi de oldukça önemlidir. Dahası, hücre kültürüne uygulanan lab on a chip teknolojisindeki ilerlemeler canlı hücrelerin katı-yüzeyler ve doğal hücre çevresinin biyokimyasal kompozisyonunun, mekanik özelliklerinin ve mikro yapının taklidini sağlayan üç boyutlu ortamlardaki hücre davranışını da ilerlemeyi mümkün kılmaktadır.

Geçmiş yıllarda, geleneksel metotların yerini mikro-üretim formatının alması, hücre kültürü tekniklerindeki analizlerin hassasiyetini ve birim zamanda incelenen örnek sayısını arttırarak maliyeti düşürmüştür. Hücre çipleri manipüle edilebilen, işlenebilen ve tekrarlanabilir bir şekilde analiz edilebilen minyatürize araçlardır. Bu araçların, kültür haznesi ve uygun güç çevirici ile birleşimi sonucu biyolojik olayların ölçülebilir sinyallere dönüşümü mümkün kılınmaktadır (Primiceri et al., 2013) (Şekil 1.1). Hücre-çipler optik tekniklerin dezavantajlarının üstesinden gelmesi ve elektrokimyasal sinyallerin kullanılmasıyla *in vitro* denemelerinin güvenilirliğini arttırmaları nedeniyle ümit vaat eden adaylardır. Şu ana dek canlı hücrelerin elektrokimyasal davranışlarını inceleyen elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), döngüsel voltammetri (CV), differansiyel puls voltammetri (DPV) gibi birçok farklı teknik kullanılmıştır. Bütün bu elektrokimyasal metotlar, yüksek hassasiyet ve doğrulukla hücre canlılığını belirlemede kullanılabilmektedirler (Hu et al., 2013; Q. Liu and Wang, 2009; Qu et al., 2014). Fakat bu sistemlerde çalışma elektrotu olarak genellikle altın, platin gibi ışığı geçirmeyen elektrotlar kullanılmaktadır. Bu elektrotlar canlı hücrelerdeki elektron transferini en hassas şekilde saptayabilecek olmalarına rağmen konfokal mikroskop, optik mikroskop gibi diğer önemli tekniklerle beraber kullanılmaları mümkün olmamaktadır. Fakat son yıllarda şeffaf iletken materyal, indiyum kalay oksit (İTO)-kaplı cam yüzeyler optik tekniklerle de uyum sağlayabilmeleri gibi avantajlarından dolayı çalışma elektrotu olarak kullanılmaya başlanmıştır.



Şekil 1.1 Hücre biyolojisi laboratuvarında kullanılabilecek bir lab-on-a chip sistemi (Primiceri et al., 2013).

Hücre çipleri sahip oldukları birçok avantajlarından dolayı son yıllarda oldukça popüler olmuşlardır (Rasooly and Herold, 2009):

- Minyatürleştirme ve çoklu analiz: Hücre çipleri kendiliğinden çoklu analizleri gerçekleştirebilme ve aynı anda birçok farklı etkiyi izleyebilme gibi avantajlarından dolayı tercih edilen güçlü lab-on-a chip platformlarıdır.
- Mikroçevrenin kontrolü: Mikroakışkan bileşenleri sıvı taşıma için entegre edilebilir ve deneysel koşulların standardizasyonu daha iyi sağlanır.
- Artan duyarlılık: Biyosensör alanındaki son gelişmeler sayesinde daha iyi sinyal iletiminin gerçekleştirilmesi duyarlılığı artırır.
- Sürekli akış ve gerçek zamanlı analiz: Hücre çipleri farklı zaman noktalarında gerçek zamanlı bilgi elde etmek için kullanılabilir, bu da canlı hücrelerdeki spesifik proseslerin dinamiği hakkında daha detaylı bilgi almamızı sağlar.

- Azaltılmış maliyet: Hücre çipleri küçük hacimli reaktifler ve hücrelerle çalışır. Birçok dedeksiyon tekniğinde kullanılan birleşiklerin oldukça pahalı olduğunu düşünürsek küçük hacimler maliyeti oldukça düşürmektedir.

Hücre-çipleri biyotıp, çevresel izleme ve ilaç tarama gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (Ona and Shibata, 2010). Özellikle, adezyon, yayılma, toksisite incelenmesi, hücre sayımı ve sınıflandırılması, migrasyon, sinyal mekanizmaları gibi hücre biyolojisinin farklı yönlerini izlemek için kullanılması yaygınlaşmaya başlamıştır (Wlodkowic and Cooper, 2010). Bu geniş aralıktaki uygulamalar bir hücre biyolojisi laboratuvarı için bütün gerekli sistemleri sağlamaktadır. Ayrıca, mikroakışkan sistemleri spesifik hücre çeşidinin izolasyonunu, kimyasal gradientlerin yaratılması ve üç boyutlu iskelelerin entegrasyonunu da sağlamaktadırlar (Krüger et al., 2002; Xiaolin Wang et al., 2011).

1.2 Hücre-Çiplerinin Temel Bileşenleri

Hücre çipleri kültür odacığı ve çevirici olmak üzere iki ana bileşenden oluşmaktadır. Hücrelerin büyütüldüğü kültür odacığının hücreler için kritik gereklilikleri sağlayacak şekilde dizayn edilmesi önemlidir. Bu sistemlerin, hücrelerin büyümesi için gerekli sinyallerin ve nutrientlerin iletimini sağlayacak özellikte olması gerekmektedir. Hücre biyolojisi çalışmalarının tekrarlanabilirliği açısından kültür odacıklarının standart koşullar sunması gerekmektedir. Camlar bu amaçla kullanılabilse de pahalı olmaları, sinyal iletimini sağlayamamaları ve biyoyumlu olmamaları nedeniyle çok tercih edilmemektedirler. Bu sebeple araştırmacılar biyoyumlu, hücre adezyonunu tetikleyici, hücre kültürü ortamına herhangi bir bileşik salgılamayan ve sterilizasyon prosedürlerinden etkilenmeyen materyallerin tasarımı üzerinde çalışmalar yapmaktadırlar.

Hücre çiplerinin ikinci bileşeni olan çeviriciler ise oldukça geniş bir çalışma alanına sahiptirler. Fiziksel ve kimyasal sinyallerin ölçülmesi prensibine dayanan birçok çevirici bulunmaktadır (optik, elektrik / elektrokimyasal veya mekanik).

1.3 İletken Polimerler

İletken polimerler biyokimyasal reaksiyonlar sonucu üretilen elektrik yükünü iletme yeteneklerinden dolayı birçok uygulamada oldukça yüksek verimle kullanılabilirler. Sahip oldukları yüksek elektriksel iletkenlik, geniş yüzey alanı, fonksiyonelleştirme gibi çok yönlü özellikler nedeniyle oldukça geniş kullanım potansiyeline sahiptirler (Guimard et. al., 2007).

İletken polimerler kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon üzerinden polimerleşirler (Heinze, 1990). Elektrokimyasal polimerizasyon, film morfolojisi ve kalınlığını daha iyi kontrol etme şansı sağladığı için genellikle daha çok tercih edilir. İletken polimerik filmler, elektrolit çözeltisi varlığında bulunan uygun monomerin anodik oksidasyonu (elektropolimerizasyonu) ile elektrot yüzeylerine birikirler. Potansiyodinamik (döngüsel voltammetri), galvonostatik (sabit akımda), potansiyostatik (sabit potansiyalde) gibi farklı elektrokimyasal yöntemler kullanılabilir (Wieckowski, 1999). Platin, altın, camsı karbon ve İTO kaplı camlar gibi çeşitli materyaller üzerinde biriktirebilmeleri mümkündür.

İletken polimerler birçok metal ve inorganik yarıiletken ile benzer elektriksel ve optik özelliklere sahip olmalarının yanı sıra geleneksel polimerlerin sahip olduğu kolay sentezlenip işlenebilme gibi birçok dikkat çekici özelliğe de sahiptirler. Bu benzersiz birleşim iletken polimerlerin mikroelektronik endüstrisinde, özellikle biyolojik uygulamalarda geniş bir kullanım alanı bulmasını sağlamıştır.

İletken polimerlerin biyomedikal uygulamaları 1980'li yılların ortalarında bu materyallerin biyolojik moleküllerle uyumlu olmalarının keşfiyle biyosensör alanında başlamıştır. 1990'ların ortalarında ise iletken polimerlerin elektriksel stimülasyonu ile hücresel aktiviteleri özellikle hücre adezyonu, migrasyonu, DNA sentezi ve protein üretimini içeren prosesleri düzenlemek için kullanılacakları gösterilmiştir (Foulds and Lowe, 1986; Umana and Waller, 1986). Birçok iletken polimer sahip oldukları biyoyumluluk, biyolojik moleküllerin tutuklanıp kontrollü salınımını gerçekleştirebilme yetenekleri, biyokimyasal reaksiyonlardaki yükü iletme potansiyelleri ve elektriksel, kimyasal, fiziksel ve diğer özelliklerinin

kolay bir şekilde değiştirilebilmesi gibi özelliklerinden dolayı oldukça geniş kullanım alanına sahiptirler. Bu benzersiz özellikler iletken polimerlerin biyosensörler, doku mühendisliği iskeleleri, nöral proplar, ilaç taşıma ve biyoiletme gibi birçok biyomedikal uygulamada kullanılır hale gelmesini sağlamıştır (Başkurt et. al., 2012; Cosnier and Holzinger, 2011; Gelmi, et. al., 2014; Joddar and Ito, 2011; Kanik, et. al., 2012; Ravichandran et .al., 2010) (Çizelge 1.1).

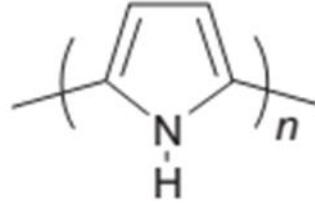
Çizelge 1.1 İletken polimerlerin biyolojik uygulamaları.

Uygulama	Uygulamanın tanımı	İletken polimerlerin avatajları	Kullanılan iletken polimerler
Doku mühendisliği	Doku yenilenmesini teşvik eden biyo-parçalanabilir iskeleler.	Biyouyumlu, iyi elektriksel iletkenlik, modifikasyonlara uyumlu.	Polipirol, Polianilin, ve politiyofen
Nöral proplar	Vücuda yerleřtirilebilir elektrotlar.	Biyouyumlu, iyi elektriksel iletkenlik, yüksek stabilite.	Polipirol
Biyosensörler	Hassas algılayıcılar olarak biyolojik molekülleri kullanan elektriksel çeviricilerle entegre sistemler.	Olası yüzey modifikasyonlarına uyumluluk, biyokimyasal reaksiyonlarda üretilen yükün etkin transferi.	Polipirol, Polianilin, politiyofen ve yeni sentez polimerler
İlaç taşıma	İlaçların depolanması ve kontrollü salınımını sağlayan araçlar	Kontrollü salınım.	Polipirol ve yeni sentez polimerler

1.4 Biyofonksiyonel Yüzey Tasarımında Sıklıkla Kullanılan İletken Polimerler

1.3.1 Polipirol

Pirol, elektro iletken polimerik yüzeylerin hazırlanması için kullanılan en yaygın monomerlerdendir (Şekil 1.2). Kolay bulunabilme, kimyasal stabilite ve polimerize olabilme gibi birçok avantaja sahiptir. Pirolun, işlenilebilirlik, fonksiyonellik ve fiziksel özellik gibi birçok özelliğini geliştirme amaçlı çeşitli türevleri kullanılmıştır (Ruggeri et. al., 1997; Wadhwa et .al., 2006). Türevlendirilmiş pirolun elektropolimerizasyonu ve çeşitli fonksiyonel gruplarla yüzey modifikasyonu; pirolu metal yüzeylerini kaplamada ve daha da ötesinde biyomoleküllerin immobilizasyonunda kullanılmasını sağlamıştır (Cosnier, 2005).



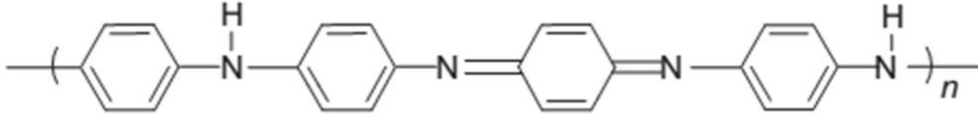
Şekil 1.2 Polipirolün şematik gösterimi.

Polipirol, memeli hücreleri üzerindeki etkisi ilk çalışılan iletken polimerlerden biridir (Wong et. al., 1994). Şimdiye dek, polipirolün endotel hücreler, nöronlar, fibroblastlar, keratinositler ve mezenkimal kök hücreler gibi birçok farklı hücre tipinin adezyon ve proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Ateh et. al.,2006; Gomez et. al., 2007; Song et. al., 2006; Stauffer and Cui, 2006; Xioadong Wang et al., 2004).

1.3.2 Polianilin

En önemli iletken polimerler arasında yer alan polianilinin, diğer polimerlere göre hızlı ve kolay hazırlanabilmesi, neme ve yükseltgenmeye karşı kararlı oluşu gibi avantajları mevcuttur (Şekil 1.3). Polianilinin biyoyumluluğunun,

iletkenliğinin ve mekanik özelliklerinin modifiye edilebilmesi için birçok farklı strateji geliştirilmiştir.

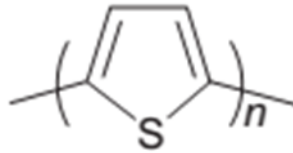


Şekil 1.3 Polianilin şematik gösterimi.

Polianilin doku mühendisliğindeki uygulamaları polipirol ve türevlerine göre daha yavaş geliyor olsa da son yıllarda yapılan çalışmalarda hücre büyümesini destekleyen biyofonksiyonel yüzeyler elde edilmiştir. Polianilin hücre uyumluluğu miyoblastlar ve fibroblastları içeren yalnızca birkaç hücre hattı üzerinde gösterilmiş olması bu polimerin sadece bir kısım hücre hattı için spesifik olduğunu düşündürmüştür (Bidez et al., 2006; Guo et al., 2007; C. Wang et al., 1999).

1.3.3 Politiyofen

Polipirol ve polianilin hala en çok çalışılan polimerler olsa da, politiyofen gibi polimerlerin de doku iskelesi ve biyosensör geliştirilmesi yönündeki kullanımları da geliştirilmeye başlamıştır. Bu polimerlerin ucuz olması ve yüksek elektriksel iletkenliğine sahip olmaları en önemli avantajlarıdır (Şekil 1.4). Bu polimerler üzerinde ise yumurtalık kanseri (Hela), nöron ve epitel hücrelerinin büyümesi test edilmiştir (Waugaman et. al., 2003).

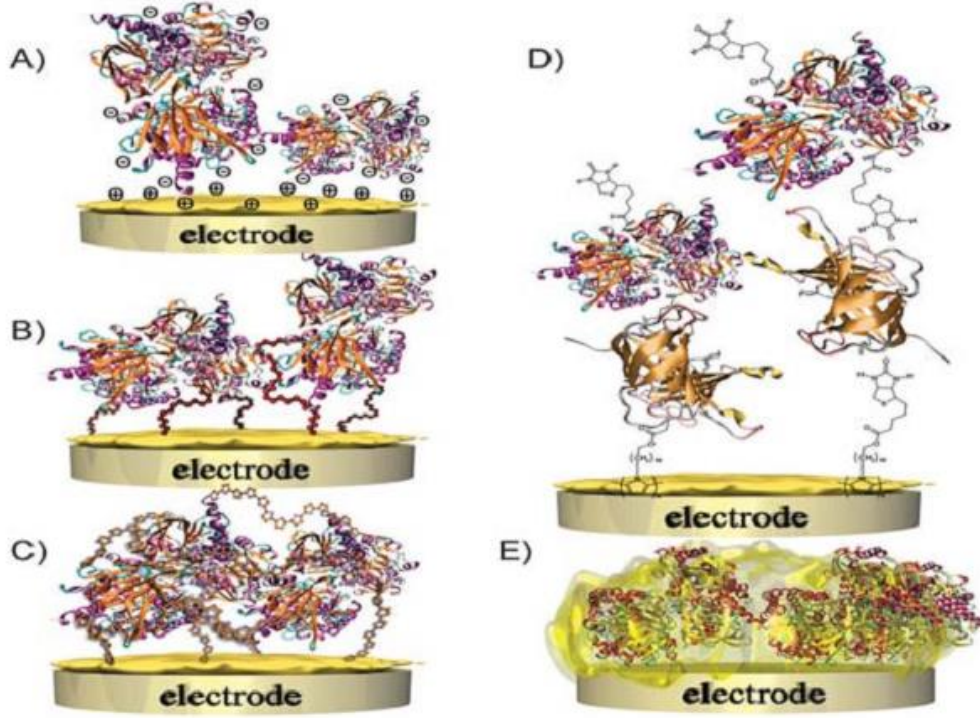


Şekil 1.4 Politiyofenin şematik gösterimi.

1.5 Biyomoleküllerin İletken Polimer Filmler Üzerine İmmobilizasyon Yöntemleri

Yüzeylerde, biyomolekül immobilizasyonu beş farklı metotla gerçekleştirilmektedir (Şekil 1.5) (Rusmini et. al., 2007):

- İlki monomer ve biyomolekül karışımı ile oluşturulan elektropolimerize olmuş filmde; biyomoleküllerin tutuklanmasıdır. Zamanla biyomoleküllerin yüzeyden kaybına neden olur ve bu sebeple yüksek biyomolekül konsantrasyonu gerektirir.
- İkincisi substrat yüzeylerinde spesifik gruplar oluşturarak biyomoleküllerin elektrostatik olarak bağlanmasıdır. Zamanla biyomolekül kaybı ve yüzeyler üzerinde rastgele biyomolekül oryantasyonu bu metodun dezavantajlarıdır.
- Üçüncüsü uç reaktif gruplar taşıyan ($-NH_2$, $-COOH$) filmlere biyomoleküllerin kovalent bir şekilde bağlanmasıdır. Kompleks bir immobilizasyon yöntemidir. Fakat bu yöntemde minimum biyomolekül kaybı ve biyomolekülün yüzeydeki oryantasyonunun kontrol edilebilmesinin sağlanabilmesi sebebiyle tercih edilmektedir.
- Bir diğer metot ise, çapraz bağlama ile biyomoleküllerin yüzeyler üzerine immobilize edilmesidir.
- Beşinci metot ise, biyotin/avidin afinite etkileşimi prensibine dayanan ve temel film ile biyomoleküllerin afinite etkileşimleri üzerinden bağlanması içeren metottur. Afinite moleküllerinden birinin ön-inkübasyonunu gerektirmesi nedeniyle zaman kaybına neden olur.

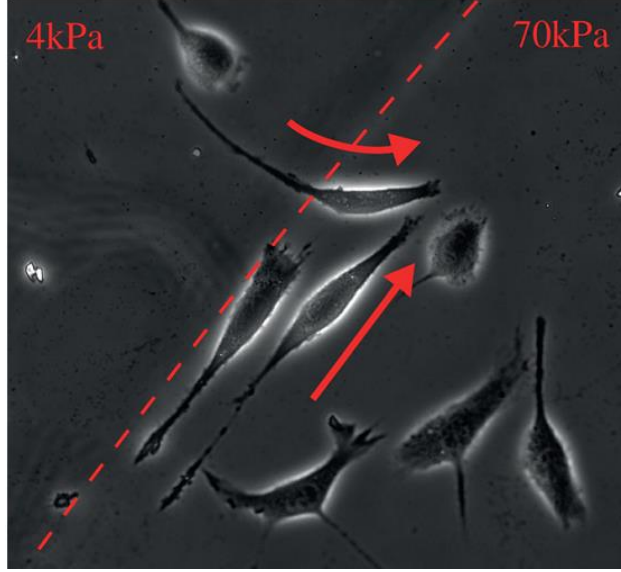


Şekil 1.5 Geliştirilen immobilizasyon metodlarının şematik gösterimi. (A) Biyomoleküllerin elektrostatik etkileşimlerle polimer filmler üzerine fiziksel adsorpsiyonu. (B) Biyomolekül ve polimerize film arasında kovalent bağlama. (C) Çapraz bağlama ve direkt biyomoleküllerin elektropolimerizasyonu. (D) Biotin/avidin affinite sistemi tarafından verilen temel film ile biyomoleküllerin affinite etkileşimleri üzerinden bağlanması. (E) Bir polimer filmin elektrokimyasal büyümesi boyunca tutuklanması (Querghi et al., 2001).

1.6 Modifiye Yüzeyler Üzerinde Hücre Adezyonu

Hücre temelli ölçüm sistemlerinin geliştirilebilmesi için hücrelerin, yüzeyler üzerinde tutunarak canlılığını devam ettirilebilmesi önemli bir unsurdur. Hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmış hücre fonksiyonu gibi birçok olaydan önce gerçekleşen adezyon doku mühendisliği, hücre çip sistemlerinin geliştirilmesi ve daha birçok alanda önemli bir adımdır (Sackmann and Smith, 2014; Wong et al., 1994). Adezyon hücre migrasyonu, sinyal iletimi, doku gelişimi ve tamiri gibi birçok kritik proseste rol oynar. Bu sebeple, ökaryotik hücrelerin yüzeyler üzerindeki adezyonu biyomateryal-hücre etkileşiminin en kritik noktasıdır. Hücre adezyonu biyomateryallerin yüzey özellikleri ile yakından ilgilidir. Hücrelerin adezyonu yüzeylerin sertliklerinden, topografik özelliklerinden ve yüklerinden etkilenmektedir (Chang and Wang, 2011; Joddar and Ito, 2011; Papenburg, Rodrigues et. al., 2010). Şekil 1.6'da da görüldüğü

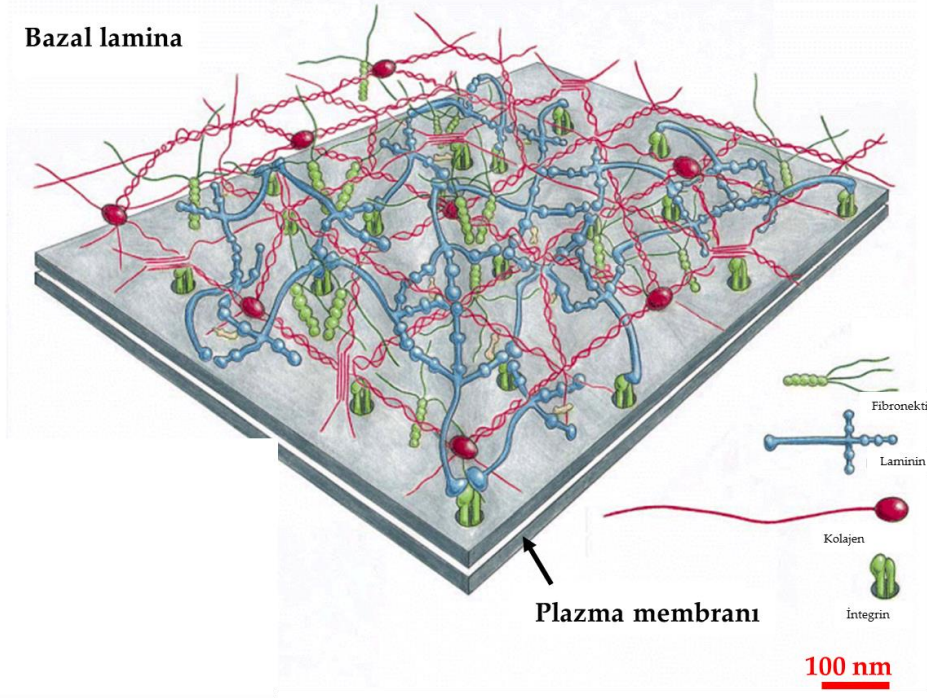
üzere, hücreler sert ve yumuşak kısımları içeren ECM proteinleriyle kaplı yüzeyler üzerinde büyütüldükleri zaman fibroblastik L hücreleri sert kısımda büyümeyi tercih etmişler ve o tarafa doğru yönelmişlerdir. Yüzeylerin sertliği hücrelerin adezyon ve proliferasyonunu etkilemiştir. Bu sebeple yüzeyin yapısal özelliklerinin hücre adezyonu ve proliferasyonu üzerindeki etkileri de araştırılmalıdır.



Şekil 1.6 Fibroblastik L-hücrelerinin yumuşak ECM proteini kaplı kısımlardan sert ECM proteini kaplı kısımlara doğru yönelimi (Ladoux and Nicolas, 2012).

Araştırmacılar doku mühendisliğinde ve çip sistemlerinde kullanılabilmesi amacıyla şimdiye dek birçok yüzey geliştirmişlerdir (Delaittre et. al., 2012; Low et. al., 2006; Mrksich, 2000). Geliştirilen bu yüzeyler, hücre adezyonunu ve dolayısıyla uzun süreli hücre kültürasyonunu gerçekleştirebilmek amacıyla fibronectin, laminin ve kolajen gibi hücre dışı matriks (ECM) (Şekil 1.7) proteinleriyle modifiye edilmektedirler. Bu proteinlerle modifiye edilen yüzeyler hücre adezyonunu arttırsa da doku mühendisliği ve çip uygulamalarında birçok dezavantajı vardır. Diğer organizmalardan izole edilip saflaştırılan bu proteinler doku mühendisliği uygulamalarında inflamasyon ve iltihap riski taşımaktadırlar. Ayrıca, bu proteinler proteolitik degradasyona uğramaları nedeniyle devamlı yenilenmelidirler. Bu sebepten ötürü uzun süreli uygulamalarda kullanım potansiyelleri bulunmamaktadır. Dahası, bu proteinlerin yüzeyler üzerindeki hücre adezyonunu destekleyecek şekilde uygun oryantasyonunu sağlamak oldukça

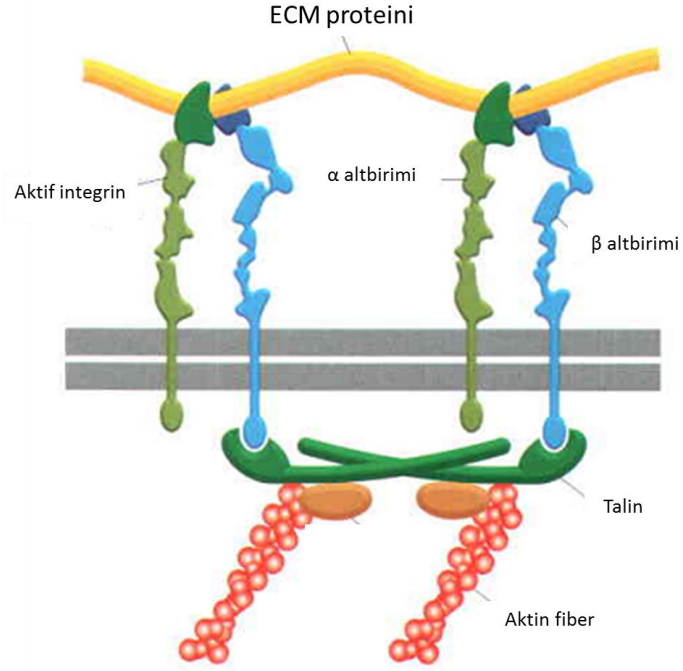
güçtür. (Geißler et al., 2000; D. Liu et. al., 2006). ECM proteinlerinin kontrol edilemeyen kalınlıkları, birçok hücre etkileşim motifi içermeleri ve proteolitik degradesyona uğrayabilmeleri gibi birçok dezavantajları vardır (D'Souza et. al., 1991; Fields et al., 1998; Iuliano et. al., 1993). Bu sebeple, kalınlıkları ve biyomoleküllerin yüzeydeki dağılımları kontrol edilebilen yüzeylerin tasarımı oldukça önem arz etmektedir.



Şekil 1.7 ECM protein organizasyonlarının şematik gösterimi (Alberts et al., 2002).

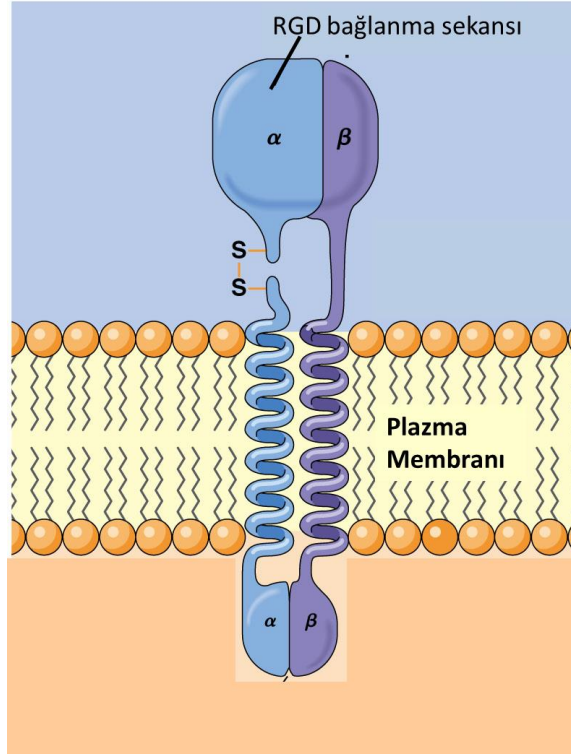
1.7 RGD Peptidi Aracılığıyla Hücre Adezyonu

Hücreler, komşu hücrelerle ve ECM ile olan ilişkilerini hücre adezyon reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirirler. ECM ile etkileşimi gerçekleştiren en önemli hücre reseptörleri integrinlerdir. İntegrinler embriyogenez, hücre farklılaşması, yara iyileşmesi gibi olaylarda görevlidirler. İntegrinler α ve β şeklinde isimlendirilen ve birbirine kovalent olarak bağlanan iki farklı alt birimden oluşan yapılardır. Şu ana kadar 18 α ve 8 β olmak üzere toplam 24 farklı heterodimer keşfedilmiştir. Bu alt birimlerin kombinasyonları integrinlerin ligand ve doku spesifikliğini belirler. İntegrinler, ECM bileşenleri ile spesifik aminoasit dizileri aracılığıyla etkileşirler (Şekil 1.8).



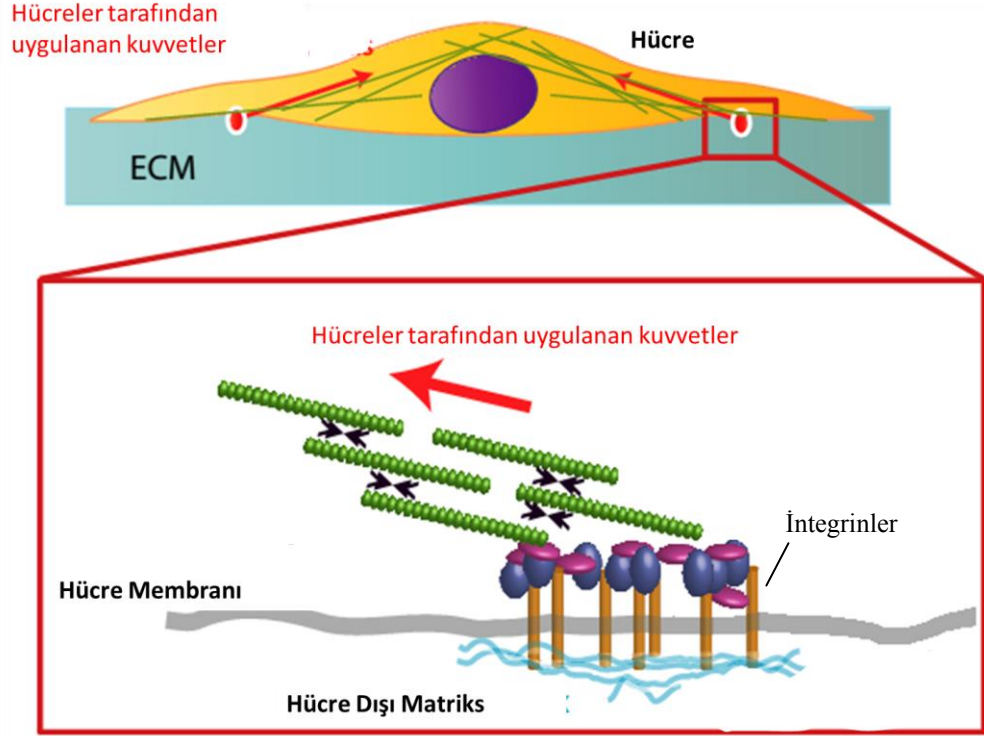
Şekil 1.8 ECM proteinleriyle integrinlerin etkileşiminin şematik gösterimi (Alberts et al., 2002).

ECM proteinlerinin integrinler aracılığıyla hücrelerle etkileştiği spesifik aminoasit dizisi RGD (R: Arginin, G: Glisin ve D: Aspartik asit)'dir (D'Souza et al., 1991) (Şekil 1.9). RGD peptidinin fibronektin, vitronektin, kolajen ve laminin gibi birçok proteinde bulunduğu bilinmektedir. 24 farklı integrin heterodimerinin yaklaşık yarısı ECM proteinleriyle RGD dizisi üzerinden etkileşmektedirler.



Şekil 1.9 İntegrin alt birimlerinin RGD peptidi ile etkileşiminin şematik gösterimi (Alberts et al., 2002).

İntegrinler aracılığıyla gerçekleşen hücre adezyonu, dört farklı prosesten meydana gelmektedir: hücre tutunması, hücre yayılması, aktin sitoskeleton organizasyonu ve yerel adezyon moleküllerinin oluşumu. İlk adım, hücrenin yüzeye tutunması ve integrin bağımlı etkileşimlerin gerçekleşmesidir. Ardından, hücre plazma membranı yüzey üzerinde yayılmaya başlar. Üçüncü olarak, hücrenin aktin fiber yapıları oluşur ve oluşan bu yapılar yüzeylere baskı uygulamaya başlar. Yüzeyler de bu baskıya ters yöndeki ve eşit büyüklükteki kuvveti hücrelere uygular (Alberts et al., 2002). Son olarak ise, aktin sitoskeleton yapıları ile ECM molekülleri arasındaki etkileşimlerin olduğu yerel adezyon yapıları oluşmaktadır (Şekil 1.10).



Şekil 1.10 Hücre-yüzey etkileşimlerinin şematik gösterimi. (Alberts et al., 2002)

Peptit modifiye polimer yüzeylerin medikal uygulamalardaki potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla yüzeyler üzerindeki hücre adezyonunun ve davranışlarının incelenmesi oldukça önemlidir. Özellikle son yıllarda hücrelerin yüzeylere tutunmasını, yayılmasını, sitoskeletal organizasyonlarını, proliferasyonlarını ve hareketlerini inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. RGD peptit dizisi yüzeylerdeki oryantasyonunun kontrol edilebilmesi, denatürasyon, enzimatik degradasyon ve sterilizasyondan etkilenmemesi gibi avantajlarında dolayı hücre adeziv yüzey tasarımında oldukça sık kullanılmaktadır (Hersel et. al., 2003). RGD peptit dizisi yalnızca yüzeyler üzerindeki hücre adezyonunu tetiklemekle kalmaz, hücre tipine spesifik yanıtlar da almamızı sağlar. RGD peptidi ile modifiye yüzeyler üzerinde hücre adezyonu zaman bağımlıdır. Yüzeyler üzerindeki hücre adezyonu ilk 4 saatte RGD modifikasyonundan çok etkilenmezken 72. saatten sonra oldukça arttığı gösterilmiştir. Bu sebeple, RGD bağımlı hücre adezyonu ve proliferasyonu çalışmalarında hücrelerin yüzeyler üzerindeki davranışını 72.saatten itibaren incelemek oldukça önemlidir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyaller

8 - 10 ohm / sq dirence ve 150-170 µm kalınlıĝa sahip İTO kaplı camlar (24 x 24 mm) Teknoma firmasından (Türkiye) alındı. RGD peptit, EDC [(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid], lityum perklorat (LiClO₄), sodyum perklorat (NaClO₄), etanol, izopropanol, aseton, Triton X-100, formaldehit (%37), DAPI (4, 6-diamino-2-phenilindol) Sigma'dan temin edildi. Asetonitril (ACN), fosfat tamponlama tuzu (PBS) (pH 7,4) 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,4 g/L Na₂HPO₄.2H₂O ve 0,2 g KH₂PO₄ (Merck) kullanılarak hazırlandı.

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), DMEM / Ham's F12 karışımı (F12), penisilin/streptomisin (P/S) (10000/10000 unit) ve 200 mM L-Glutamin Lonza'dan satın alındı. Fetal sıĝır serum (FBS) Biowest'ten satın alındı.

CytoPainter Phalloidin-iFluor 555 reaktifi Abcam'den satın alındı.

2.2 Cihazlar

Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılan araçlar ve gereçler aşağıda verildi: Döngüsel voltammetri (CV) ve diferansiyel puls voltammetrisi (DPV) ölçümleri PalmSens potansiyostat (The Netherlands) cihazı ile alındı. Ölçümler üçlü elektrot sistemi ile gerçekleştirildi. Çalışma elektrodu olarak İTO-camlar (Teknoma,Türkiye), karşıt elektrot olarak platin elektrot (Metrohm, İsviçre) ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrodu (Metrohm, İsviçre) kullanıldı.

Hücre sel görüntüleme amacıyla Olympus DC30 kamera ile entegre edilmiş CKX41 model inverted mikroskop kullanıldı.

Yüzey karakterizasyonu amacıyla Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizleri Veeco MultiMode V AS-130 ("J") model cihazı ile gerçekleştirildi. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri ise, Philips XL-30S FEG model

cihazı ile gerçekleştirildi. Modifikasyon öncesi ve modifikasyon aşamalarından sonra yüzeye ait hidrofilik ve hidrofobik özelliklerin incelenmesi amacıyla yüzeye ait temas açısı ölçümleri Attension Theta cihazıyla yapıldı. İletkenlik ölçümleri Keithley 2400 Source-meter cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

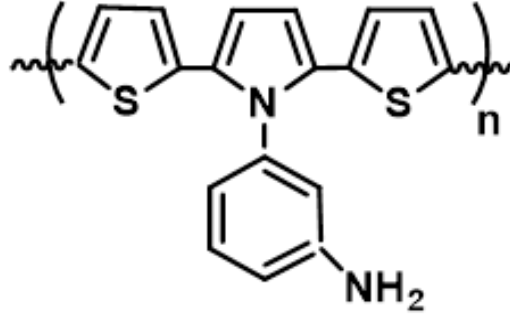
2.3 İletken Polimerin Sentezi

3-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-yl)anilin (SNS-mNH₂) iletken polimerinin sentezi Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden Doç. Dr. Metin AK ve ekibi tarafından gerçekleştirildi. Polimer propiyonik asitin katalitik miktarının varlığında 1,4-di(2-thienil)-1,4-bütandion ve benzen-1,3-diamin'den sentezlendi. Argon gaz girişi ve manyetik karıştırıcı ile entegre edilmiş yuvarlak altlı flasklar 1,4-di(2-tienil)-1,4-bütandion (0,4 M), benzen-1,3-diamin (0,5 M), propiyonik asit (0,4 M) ve tolüen ile yüklendi. Elde edilen karışım 24 saat boyunca argon gazı altında karıştırılıp akıtıldı. Toluenin uçurulmasının ardından kolon kromatografisinin (SiO₂ kolon) kullanılmasıyla istenilen bileşik elde edildi.

2.4 Biyofonksiyonel Yüzeylerin Hazırlanması

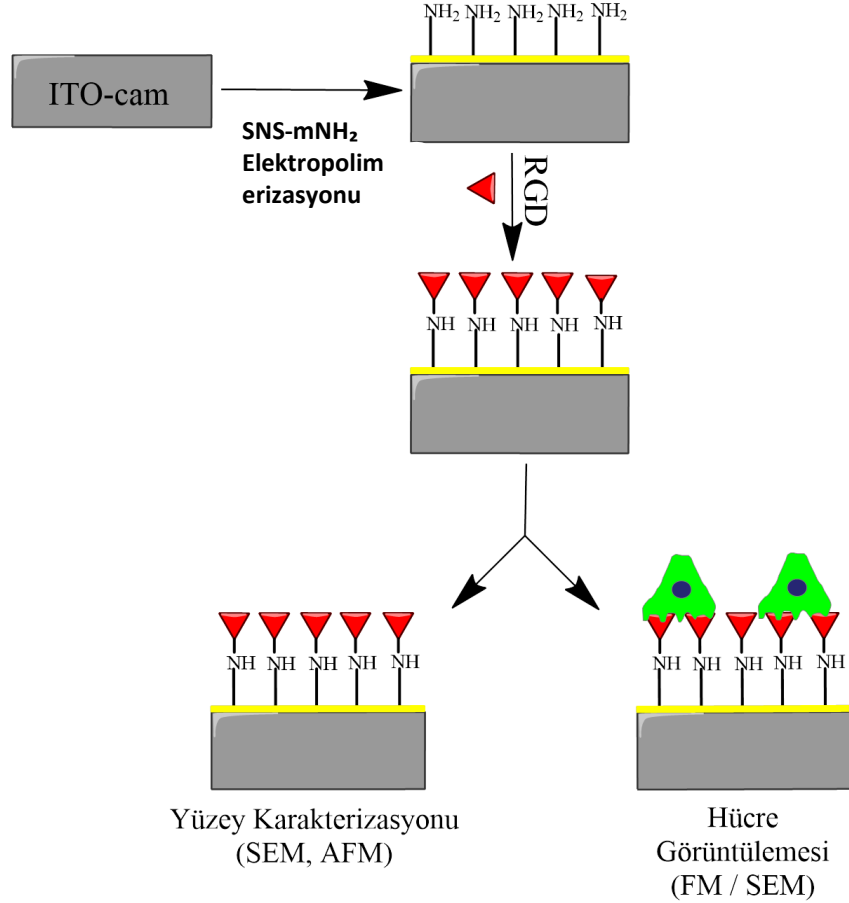
Çalışmada indiyum kalay oksit (İTO) kaplanmış camlar çalışma elektrotu olarak kullanıldı. İTO camlar sırasıyla aseton, izopropanol, etanol ve distile su içerisinde 4 dakika sonikasyon yapılarak temizlendi.

SNS-mNH₂ iletken polimeri (Şekil 2.1) İTO-cam üzerinde elektrokimyasal biriktirme işlemi ile oluşturuldu. 0,5 mg/mL SNS-mNH₂ monomeri, 0,1 M NaClO₄ ve 0,1 M LiClO₄ destekleyici elektrolitleri varlığında 10 mL ACN içinde çözüldü. Monomer, İTO yüzey üzerinde döngüsel voltammetri yöntemi ile biriktirildi. Döngüsel voltammetri -0,5 V ile +1,2 V aralığında 5, 10 ve 25 döngü olarak uygulandı ve döngü sayısı optimize edildi.



Şekil 2.1 SNS-mNH₂ polimerinin yapısı.

İletken polimer üzerindeki amino grupları kullanılarak RGD peptidinin kovalent bağlanması için EDC, çapraz bağlayıcısı kullanıldı. Bunun için 0,05 mg/mL RGD ile 0,2 M EDC pH 7,4 PBS tamponu içinde 15 dakika inkübe edilerek RGD üzerindeki karboksil grupları aktive edildi. Amino grubu içeren iletken polimer kaplı İTO-cam yüzeyler aktifleştirilmiş RGD ile kaplanarak gece boyu oda sıcaklığında tepkimeye bırakıldı. İTO-cam yüzeyleri tepkime sonrası bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılması için sırasıyla üç kere PBS ve üç kere distile su ile yıkandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Biyofonksiyonel yüzeylerin hazırlanma aşamalarının şematik gösterimi.

2.5 Yüzeylerin CV ve DPV ile Karakterizasyonu

İTO-cam yüzeyler üzerinde iletken polimerin yüzey özelliklerinin karakterizasyonu amacıyla 0,1 M NaClO₄ ve 0,1 M LiClO₄ destekleyici elektrolitleri varlığında döngüsel voltammetrik ölçümler gerçekleştirildi.

Hücre adezyonu için elde edilen en uygun yüzeyin belirlenebilmesi ve bu yüzeyin oluşturulma basamaklarının karakterize edilmesi amacıyla, herhangi bir modifikasyon yapılmamış İTO, iletken polimer kaplanmış İTO (İTO/SNS-mNH₂), iletken polimer/RGD kaplanmış İTO (İTO/SNS-mNH₂/RGD) yüzeylere diferansiyel puls voltammetrisi (DPV) uygulandı. Yüzeylerle 0,1 M KCl ve 5,0 mM K₄Fe(CN)₆ içeren 100 mM PBS tamponu içinde + 0,5 V ile - 0,3 V aralığında potansiyel aralığında DPV yöntemi kullanılarak ölçüm yapıldı, potansiyele karşı akım değerleri kaydedildi.

2.6 Yüzeylerin SEM ile Karakterizasyonu

İTO/SNS-mNH₂, İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeylerinin morfolojileri SEM ve enerji dağılımlı X-ışınım spektroskopisi (EDX) ile incelendi (Malzeme Araştırma Merkezi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü). Ölçümler 5,0 kV'de yapıldı. Analiz sonucunda yüzey morfolojisinin yanında, yüzeyde bulunan atomların karakterizasyonu da gerçekleştirildi.

2.7 Yüzeylerin Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Karakterizasyonu

AFM, atomik ya da moleküler düzeyde yüzey topolojisinin ölçülmesini ve yüksek çözünürlükte resimlerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Nanoskaladaki maddelerin boyut, şekil, rijitlik gibi çeşitli özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır. Tez kapsamında İTO-cam yüzeylerin modifikasyonu ve modifiye yüzeylerin hücre ile etkileşimi sonrası oluşan tabakaların üç boyutlu görüntüsü tapping modda AFM ile elde edildi (Merkez Laboratuvarı, Ortadoğu Teknik Üniversitesi).

2.8 Yüzele Ait Temas Açısı Ölçümü

Yüzele ait hidrofobik ve hidrofilik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan temas açısı ölçümünde, bir katı yüzeyi ile temastaki bir sıvı yüzeyin arasında oluşan açı ölçülür. Temas açısı adı verilen bu açının büyüklüğü, sıvının kendi molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri (kohezyon kuvvetleri) ile sıvı katı arası çekim kuvvetlerinin (adezyon kuvvetleri) göreceli büyüklüğüne bağlıdır. Büyük bir temas açısı sıvı katı çekim kuvvetlerinin azlığının (hidrofobik özellik), küçük bir temas açısı ise bu kuvvetlerin büyük olmasının (hidrofilik özellik) bir göstergesidir. Bu tez kapsamında ise, İTO/SNS-mNH₂ ve İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeylerde temas açısı ölçümü su damlasının yüzeyle yaptığı açının ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen beş farklı ölçüme ait ortalamalar ve standart sapmalar hesaplandı.

2.9 Yüzeylerde İletkenlik Ölçümü

Yüzeylerin RGD modifikasyonu öncesi ve sonrasındaki elektriksel iletkenlik değişimi “2-prob tekniği” ile ölçüldü.

2.10 Hücre Kültürü

Maymun böbrek epitel hücre hattı Vero (ATCC) ve HaCaT hücre hatları sırasıyla ATCC ve CLS'den satın alındı. Her iki hücre hattı da %10,0 fetal sığır serum (FBS) (Biowest) ve %1,0 PS içeren DMEM büyüme ortamı içinde ve %5,0 CO₂ içeren 37°C inkübatörde kültive edildi. İnsan nöroblastoma hücre hattında SH-SY5Y ile yapılan çalışmalarda ise yukarıdaki koşullardan farklı olarak DMEM yerine DMEM/F12 (Lonza) büyüme ortamı kullanıldı. Hücreler %80 doluluğa geldiklerinde tripsin muamelesi ile pasajlandı.

Bütün denemelerde sterilize edilmiş yüzeylere, genel hücre kültürü koşulları altında örnek başına $5,0 \times 10^4$ hücre olarak şekilde ekim yapıldı. Vero hücre adezyonuna polimer kalınlığının etkisi, yüzeyler üzerinde hücrelerin 24 saatlik inkübasyonunun ardından incelendi. Vero hücrelerinin zamana bağlı adezyon ve proliferasyonunu incelemek için ise, yüzeyler üzerinde hücreler farklı inkübasyon zamanları (4, 24, 48 and 72 saat) boyunca inkübe edildi.

Ayrıca, farklı hücre hatlarının modifiye yüzeyler üzerindeki davranışlarını karşılaştırmalı olarak inceleyebilmek için Vero, HaCaT ve SH-SY5Y hücreleri modifiye yüzeyler üzerinde 72 saat inkübe edildi. Her çalışmada geleneksel hücre kültürü materyali olan PS yüzeyler kontrol yüzey olarak kullanıldı. İnkübasyonların ardında hücreler bir sonraki kısımda açıklandığı şekilde fikse edildi, boyandı ve görüntüledi.

2.11 Hücre Görüntülemesi

Farklı şekillerde hazırlanmış ve farklı zaman dilimlerinde hücre kültivasyonu gerçekleştirilmiş modifiye yüzeyler mikroskopik inceleme ile karşılaştırıldı. Bunun için, modifiye yüzeyler belirtilen zaman dilimlerinin (4, 24, 48, 72 saat) sonunda hücre büyüme ortamının uzaklaşması için üç kere PBS ile

yıkandı. Daha sonra 37°C sıcaklıkta 1 saat formaldehit (%3,7) ile inkübe edilerek hücreler yüzeylere fikse edildi. Fiksasyon sonrasında formaldehitin uzaklaştırılması için üç kere PBS ile yıkama yapıldı. Fikse edilmiş hücrelerin çekirdek boyaması için DAPI kullanıldı. Boyaların hücre porlarından geçirgenliğini sağlamak amacıyla yüzeyler üzerindeki hücreler oda sıcaklığında 4 dakika %0,1 Triton X-100 ile muamele edildi ve ardından PBS ile 3 defa yıkandı. Hücreler DAPI karışımı (1,0 mL PBS + 2,0 µL DAPI stok çözeltisi) ile 5 dakika muamele edilerek boyandı ve boyanın uzaklaştırılması için PBS ile üç kere yıkama gerçekleştirildi. DAPI ile boyanan hücreler floresans mikroskop ile görüntülenerek, hücre sayısı ImageJ (NIH) programı kullanılarak hesaplandı.

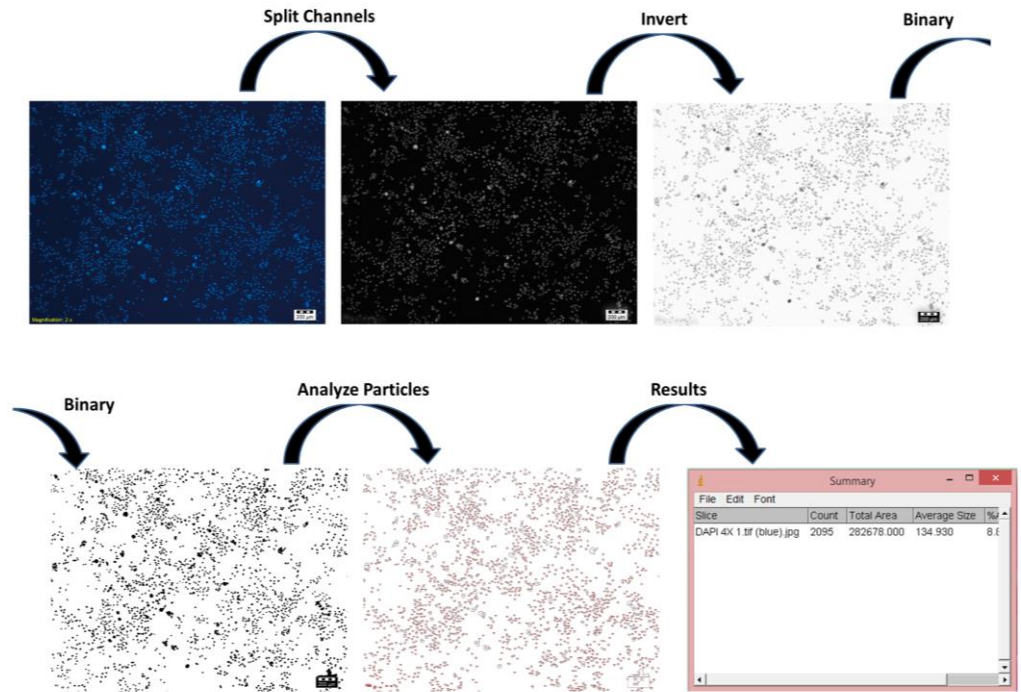
Modifiye yüzeyler üzerindeki hücrelerin aktin filamentlerinin boyanması için ise, CytoPainter Phalloidin-iFluor 555 reaktifi kullanıldı. Yukarıdaki şekilde gerçekleştirilen geçirgenlik işleminin ardından aktin boyaması 60 dakikada gerçekleştirildi ve boyanın uzaklaştırılması için PBS ile üç kere yıkama yapıldı. Boyamanın ardından hücreler floresans mikroskop ile görüntüledi. Her bir yüzey üzerindeki üç farklı bölgeden 4X büyütmeyle çekilen görüntüler daha büyük bir alanı temsil ettiği için yüzey üzerindeki hücre sayısını belirlemede kullanıldı. Hücre morfolojisini göstermek için kullanılan aktin filamentlerin boyamasına ait görüntüler 20X objektif kullanılarak çekildi.

Hücrelere ait SEM ve AFM analizleri için ise, modifiye yüzeyler üzerinde 72 saat inkübe edilen hücreler 1 saat formaldehit (%3,7) ile fikse edildi ve 24 saat kurumaya bırakıldı. Ardından görüntüleri alındı. SEM görüntüleri 5 kV'de İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde elde edildi. AFM görüntüleri ise Ortadoğu Teknik Üniversitesi Malzeme Araştırma Merkezi'nde tapping modda yapılan yüzey taraması sonucunda elde edildi.

Aksi belirtilmediği sürece bütün denemeler ortam sıcaklığında (25°C) gerçekleştirildi.

2.12 Image J Programı ile Hücre Sayısının Belirlenmesi

Hücre canlılığını belirlemede en sık kullanılan yöntemlerden biri de DAPI boyaması ile hücre sayısının belirlenmesidir. DAPI ile çekirdekleri boyanan hücrelerin sayısını gözle saymak oldukça yüksek bir hata payı oluşturmaktadır. Bu çalışmada üzerindeki DAPI boyaması ile çekirdekleri boyanan hücrelerin sayısının belirlenmesi için, hata payını oldukça azaltan Image J (NIH) programı kullanılmıştır. Image J analiz basamakları şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Hücre sayısının Image J programı ile belirlenmesinin adım adım şematik gösterimi.

2.13 İstatiksel Analizler

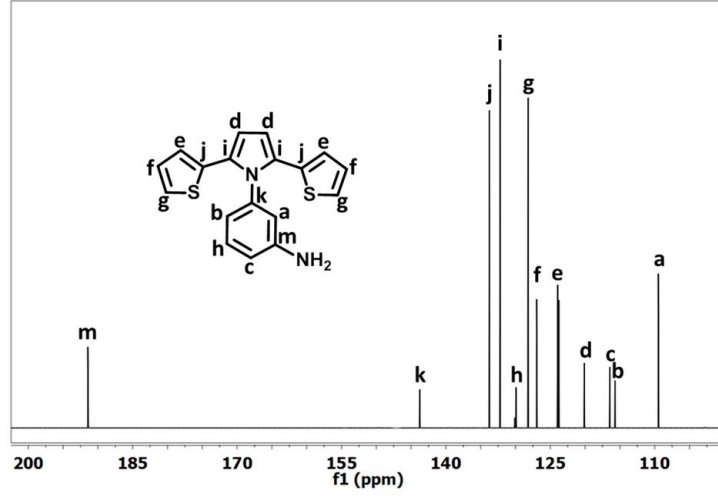
GraphPad Prism versiyon 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA) grafikleri ve istatistiksel analizleri elde etmek için kullanıldı. Non-parametrik Mann-Whitney U testi farklı yüzeyler üzerindeki yüzey alanı başına düşen göreceli hücre sayısını karşılaştırmak amacıyla kullanıldı. İstatistiksel farklılıklar $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ ve $p \leq 0.001$ değerleri için sırasıyla *, **, ve *** ile gösterildi.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

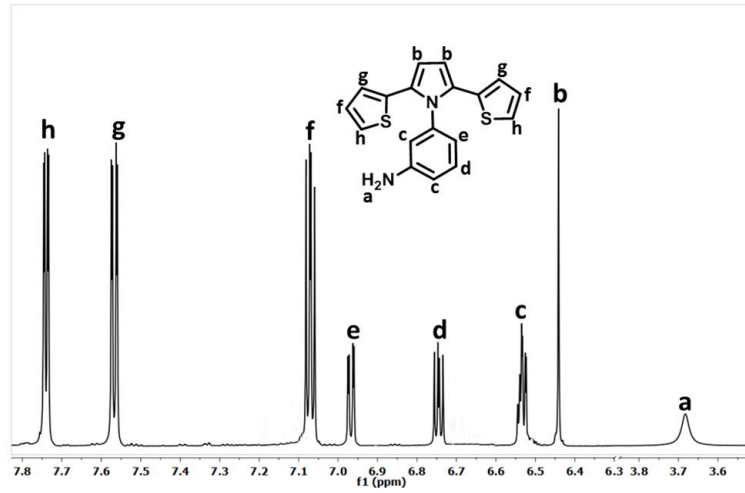
3.1 Biyofonksiyonel Yüzeylerin Hazırlanması

Sentezlenen SNS-mNH₂ iletken polimerinin kimyasal yapısı ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektraları alınarak karakterize edildi. ¹³C-NMR spektroskopisindeki SNS-mNH₂ polimerine ait karakteristik pikler: ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 191,46 / 143,77 / 133,74 / 132,18 / 129,94 / 128,20 / 126,97 / 123,79 / 120,11 / 116,43 / 115,70 / 109,48 şeklinde bulundu (Şekil 3.1a). ¹H-NMR spektroskopisindeki SNS-mNH₂ polimerine ait karakteristik pikler: C₁₈H₁₄N₂S₂, δH (CDCl₃): 3,68 (s, 2H, H_a), 6,44 (dd, 2H, H_b), 6,53 (m, 2H, H_c), 6,74 (dd, 2H, H_d), 6,97 (dd, 2H, H_e), 7,07 (m, 2H, H_f), 7,57 (dd, 2H, H_g), 7,74 (dd, 2H, H_h) olarak bulundu (Şekil 3.1b).

a)



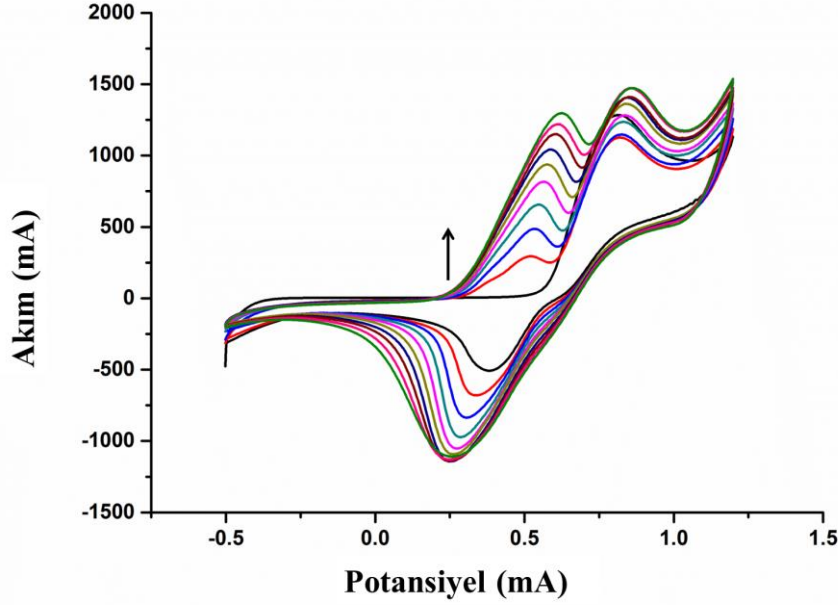
b)



Şekil 3.1 SNS-mNH₂ monomerine ait a) ¹³C-NMR ve b) ¹H-NMR spektraları.

Poli-(SNS-mNH₂) film, yüzeyler üzerinde elektrokimyasal polimerizasyon ile biriktirildi. Polimere ait döngüsel voltammogramın ilk döngüsünde (Şekil 3.2), monomer +0,8 V'da radikal katyonuna oksitlenir. Monomer oksidasyonunun ardından, elektrot yüzeyinde oligomerlerin oluşumu gerçekleşir. Oligomerler belirli bir uzunluğa ulaştıkları zaman zincirin uzamaya devam ettiği İTO yüzeyinde çökellerler. Bu da katodik doğrultudaki tarama sırasında polimerin indirgenmesine karşılık gelen pik (+0,4 V) ile gözlemlendi. İkinci pozitif tarama monomerin oksidasyon pikinden daha düşük bir potansiyelde, polimer kaynaklı

bir oksidasyon piki (+0,5 V) verir. Bunun dışında, her bir taramada monomer oksidasyon pikine ait akım değerlerinde artışlar gözlemlendi. Pik akım değerlerinin elektrot yüzey alanıyla doğru orantılı olması sebebiyle pik akım değerlerindeki artış yüzey üzerinde biriken polimerin alan artışıyla yorumlanabilmektedir.



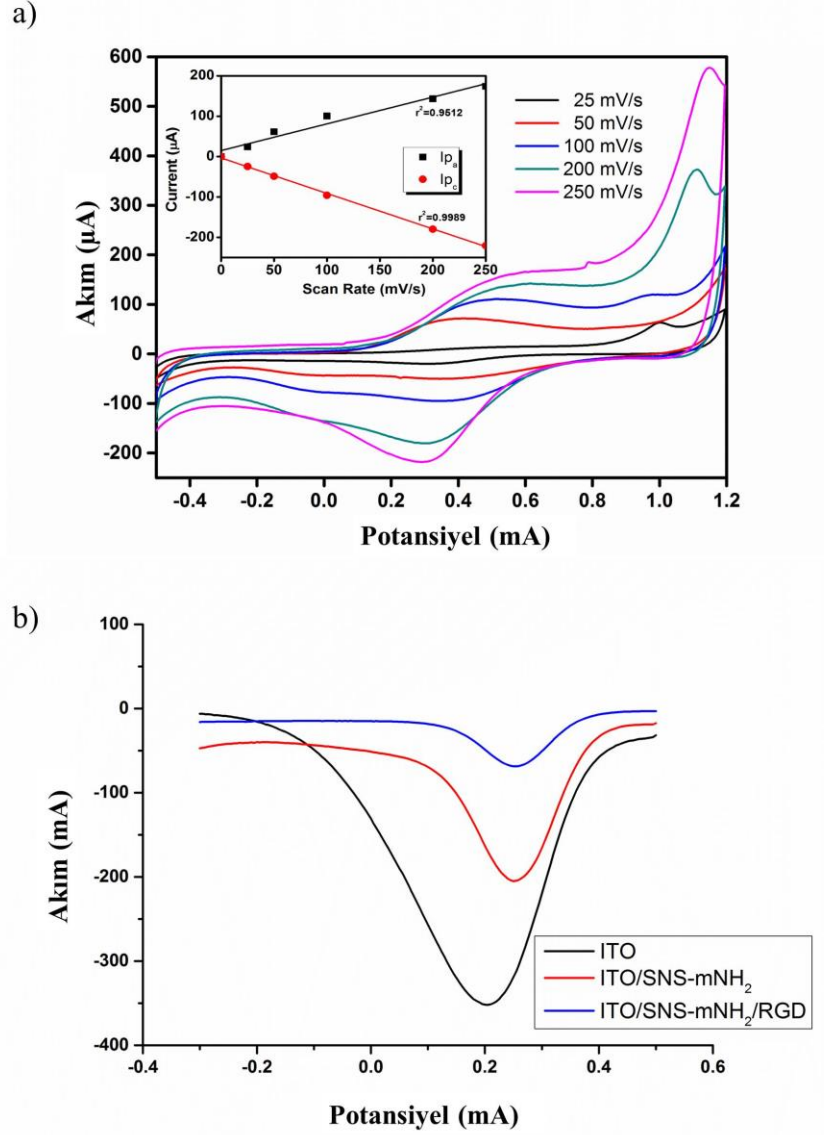
Şekil 3.2 İTO üzerinde SNS-mNH₂ biriktirilmesine ilişkin grafik.

3.2 Yüzeylerin CV ve DPV İle Karakterizasyonu

İletken polimer kaplı elektrotların yüzey karakterizasyonu amacıyla polimer kaplı yüzeyler üzerinde monomer içermeyen elektrolit çözeltisi içerisinde 25, 50, 100, 200 ve 250 mVs⁻¹ tarama hızlarında döngüsel voltametri uygulandı. Tarama hızlarıyla doğru orantılı olarak artan akım, polimer filminin elektro-aktif ve yüzeye tutulumunun iyi olduğunu gösterdi (Şekil 3.3a).

Şekil 3.3b' de şematik olarak gösterilen yüzeylerin oluşturma aşamalarına dair farklılıkların belirlenmesi amacıyla ilk olarak diferansiyel puls voltammetrisi yöntemi kullanıldı. İTO, İTO/SNS-mNH₂, İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeylerine ait DPV sonuçlarına göre redoks ajanı olarak kullanılan K₃Fe(CN)₆ indirgenmesine ait akım değerleri her modifikasyon aşamasında değişti. Pik akım değerleri İTO yüzey için (-0,359 mA; ΔE_{pC} = 0,20 V) iken, SNS-mNH₂-kaplı yüzey için (-0,2

mA; $\Delta E_{PC} = 0,2$ V) ve RGD modifiye yüzey için (-0,07 mA; $\Delta E_{PC} = 0,3$ V) olarak bulunmuştur. Bu azalmanın nedeni, modifikasyon sonrası artan yüzey kalınlığıdır. Yüzeyler, modifikasyondan sonra daha düşük elektrokimyasal özellikler sergileseler de, daha önce hücre adezyonu için uygun olmayan yapı, memeli hücresi yetiştirilebilecek şekilde modifiye edildi.



Şekil 3.3 a) Farklı tarama hızlarındaki döngüsel voltammogramlar. Ekli küçük resim pik akımının tarama hızına karşı olan grafiğini göstermektedir. b) İTO (Mavi), İTO/mSNS-NH₂ (Kırmızı) ve İTO/mSNS-NH₂/RGD (Siyah) yüzeylerine ait diferansiyel puls voltammetrisi sonuçları.

3.3 Yüzezlere Ait Temas Açısı Ölçümü

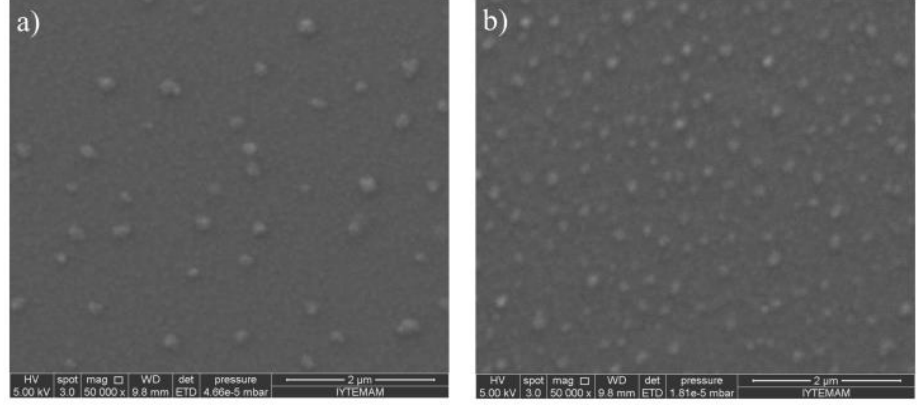
RGD peptit dizisinin yüzezlere immobilizasyonunun ardından yüzezlereki hidrofobiklikğin değişimini belirlemek için temas açısı ölçümleri gerçekleştirildi. RGD'nin hidrofilik doğası gereği yüzey temas açısı polimer kaplı yüzey için $83,6^\circ \pm 1,1^\circ$ iken RGD immobilizasyonundan sonra $78,9^\circ \pm 0,9^\circ$ olarak ölçüldü. Elde edilen bu sonuç yüzey modifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve modifikasyon sonrası yüzeyin daha hidrofilik bir hale geldiğini göstermektedir.

3.4 Yüzezlere İletkenlik Ölçümü

Her bir modifikasyon adımının yüzezlere iletkenliğine etkileri 2-prob ölçümü tekniği ile araştırıldı. Bu teknik ile ilk adımda yüzezlereki özdirenç hesaplandı. Bulunan özdirenç değerlerinden yüzezlere ait iletkenlik değerleri bulundu. ITO, ITO/SNS-mNH₂ ve ITO/SNS-mNH₂/RGD modifiye yüzezlere iletkenliği sırasıyla $3,0 \times 10^3$, $1,0 \times 10^3$ ve $0,9 \times 10^3$ ($\Omega \text{ cm}$)⁻¹ olarak ölçüldü. Yüzey iletkenliğinin modifikasyon adımlarından sonra korunduğu gösterildi.

3.5 Yüzezlere Taramalı Elektron Mikroskopu ile Karakterizasyonu

Yüzezlere arasındaki morfolojik farklılığın belirlenmesi için gerçekleştirilen SEM analizinde, SNS-mNH₂ polimerinin RGD peptidi ile modifikasyon sonucunda yüzey 3 boyutlu yapısında değişimler gözlemlendi (Şekil 3.4). Modifikasyon sonrası oluşan pürüzlü yapı RGD peptidinin kovalent immobilizasyonunun başarılı ile gerçekleştiğini gösterdi.



Şekil 3.4 a) İTO/mSNS-NH₂ ve b) İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeylere ait SEM görüntüleri.

Yüzeylerde bulunan atomik değişimlerin saptanması için gerçekleştirilen EDX analizleri, yüzey modifikasyonu sonrasında indiyum elementinin azaldığını, karbon elementinin ise arttığını göstermektedir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. EDX analizi sonucunda yüzeylerin atomik özelliklerinin karşılaştırılması.

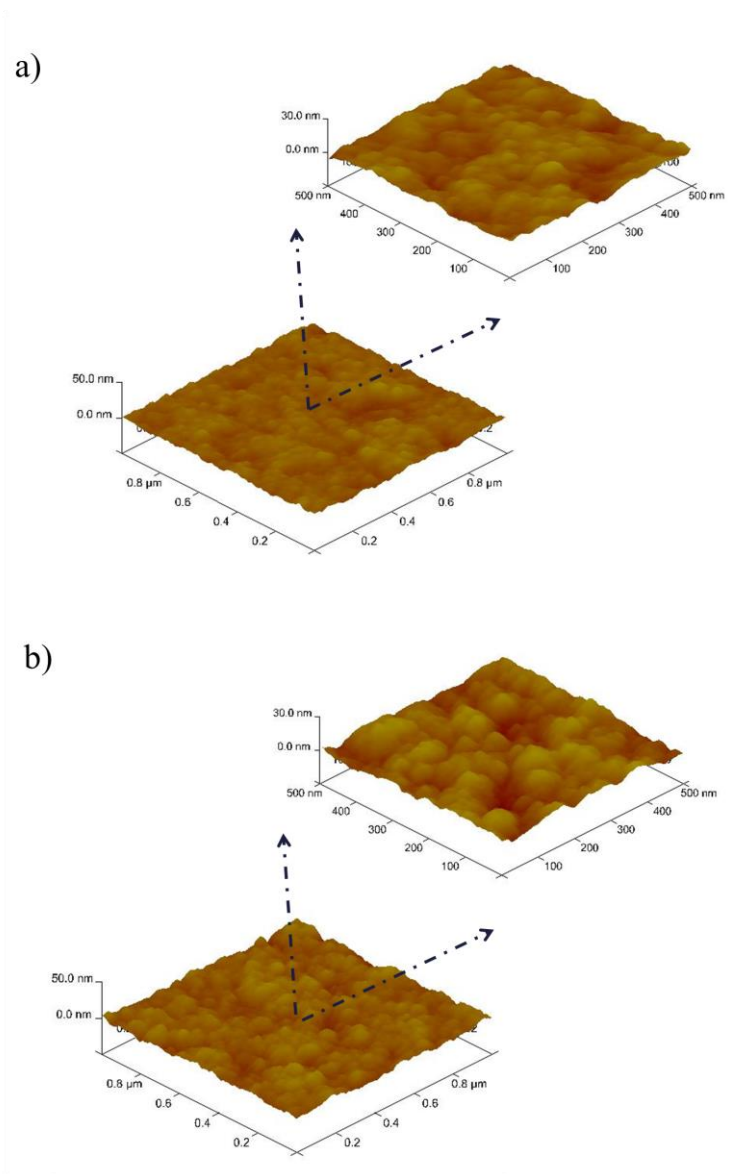
		Karbon	Azot	Oksijen	Sülfür
SNS-mNH₂ kaplı yüzey	Wt %	8,7	5,6	21,2	1,2
	Atomik %	23,7	13,1	43,2	1,2
RGD modifiye yüzey	Wt %	12,0	6,0	19,6	1,1
	Atomik %	26,6	15,0	42,5	1,2

3.6 Yüzeylerin AFM ile Karakterizasyonu

AFM yüzeylerin morfolojik özellikleri hakkında detaylı bilgi vermektedir. Şekil 3.4 modifiye yüzeylerin topografisini göstermektedir. Polimer modifiye yüzeyler düz ve pürüzsüz iken (Şekil 3.5a), RGD immobilizasyonu sonrasında pürüzlü ve üç boyutlu bir yüzey olarak gözlemlendi (Şekil 3.5b). Yüzey pürüzlülüğü

değerleri polimer kaplı yüzey ve RGD modifiye yüzey için sırasıyla 1,8 nm ve 2,2 nm olarak bulundu.

Artan yüzey pürüzlülüğü açısından, AFM ve SEM analizleriyle birbirleriyle tutarlı sonuçlar verdi. Literatürdeki verileri göre, artan yüzey pürüzlülüğü hücre adezyonu ve proliferasyonu üzerinde hücre çeşidine bağlı olarak etki göstermektedir (Chung et. al., 2003; De Bartolo et al., 2008; Luo et al., 2012). Bu yüzden, farklı hücre hatlarının yüzeyler üzerindeki morfolojilerinin incelenmesi biyofonksiyonel yüzey tasarımında oldukça önemlidir.

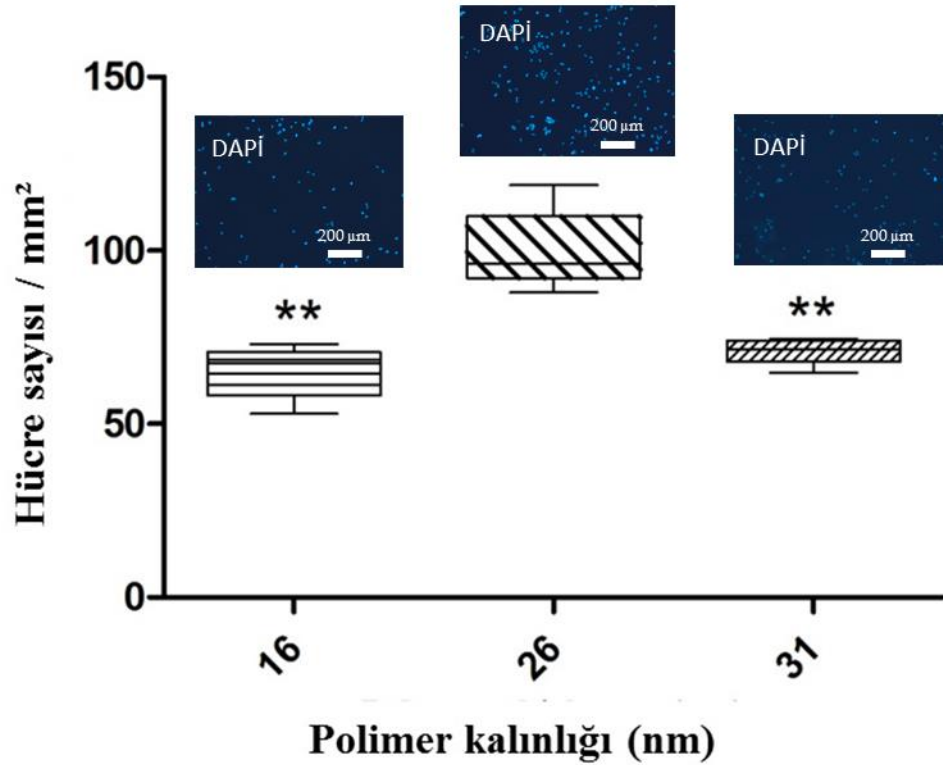


Şekil 3.5 a) İTO/mSNS-NH₂ ve b) İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeylere ait 3-D topografik AFM görüntüleri.

3.7 Yüzeyler Üzerinde Hücre Adezyonu ve Proliferasyonu

Yüzey Kalınlığının Hücre Adezyonuna Etkisi

Yüzeylerdeki iletken polimer kalınlığı elektropolimerizasyon sırasında döngü sayısının değiştirilmesiyle kontrol edilebilmektedir (Guler et. al., 2014). Yüzeylerde iletken polimer kaplı filmin kalınlığının hücre adezyonuna etkisinin belirlenmesi için, elektropolimerizasyon potansiyeli -0,5 V ile +1,2 V aralığında 5, 10 ve 25 döngü olarak uygulandı. Belirtilen döngü sayılarıyla hazırlanan polimer kaplı yüzeylerin kalınlıkları, ilgili elektropolimerizasyonun son döngüsündeki akım değerlerinin μm birimine çevrilmesiyle hesaplandı ($45 \mu\text{C} = 1 \mu\text{m}$). SNS- mNH_2 polimerinin film kalınlığı 5, 10 ve 25 döngü sayıları için sırasıyla $16 \pm 2,1$, $26 \pm 5,1$, $31 \pm 0,7$ nm olarak hesaplandı. Her bir yüzey, aynı koşullarda üzerlerinde tutunan ve canlılığını devam ettiren hücre sayısına göre değerlendirildi. 26 nm kalınlığındaki polimer yüzeylerin hücre adezyonunda en etkin yüzeyler olduğu görüldü (Şekil 3.6). Ayrıca, 31 nm kalınlığındaki yüzeylerde azalan hücre adezyonunun yanı sıra homojen film yapısının bozulduğu ve defektler oluştuğu gözlemlendi.

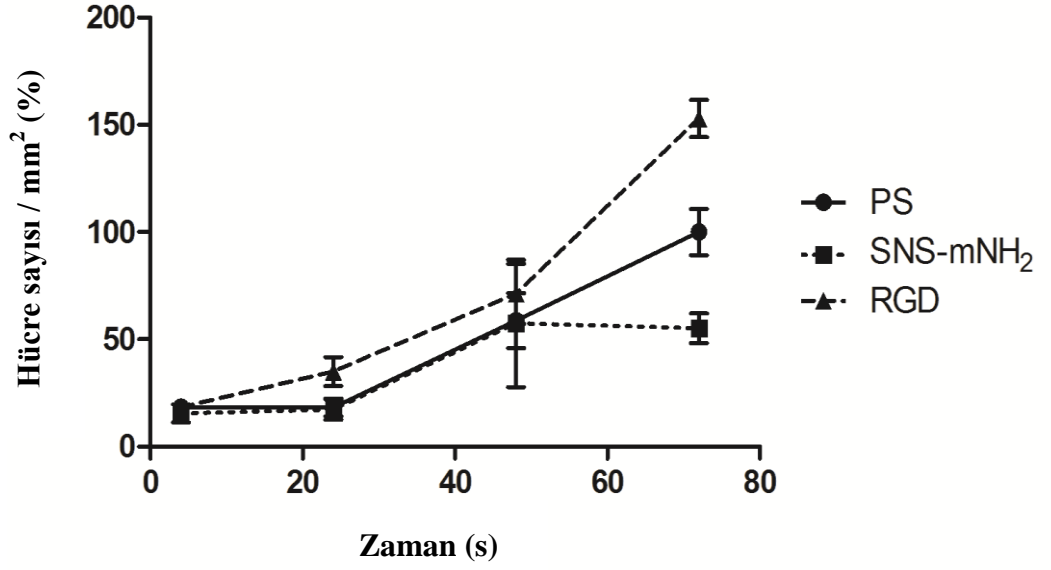


Şekil 3.6 Yüzeyler üzerindeki alan başına düşen hücre sayısının grafiksel gösterimi.

Vero hücrelerinin modifiye yüzeyler üzerinde zamana bağlı hücre adezyonu ve proliferasyonu

26 nm kalınlığındaki polimer ile kaplı yüzeylerin hücre adezyonu açısından en uygun yüzey olduğunun belirlenmesinin ardından İTO/mSNS-NH₂ ve İTO/SNS-mNH₂/RGD modifikasyonu uygulanmış yüzeyler ile memeli hücre kültürasyonunda yaygın olarak kullanılan polistiren (PS) yüzeyler hücre adezyonuna olan etkileri bakımından karşılaştırıldı.

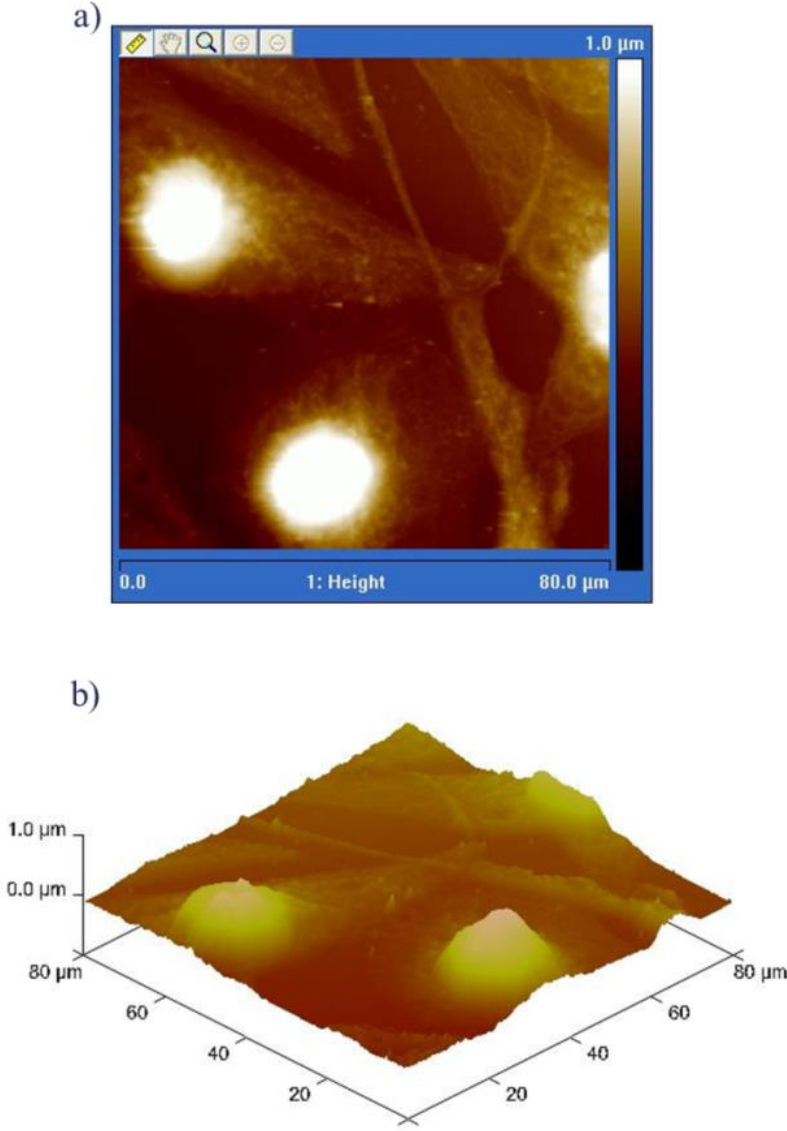
İlk adezyon için gereken 4 saatlik sürede yüzeyler arasında hücre sayısı bakımından bir farklanma gözlenmedi. RMF iletken polimeri ile kaplı yüzeyin 24 ve 48 saatlik hücre adezyonu için polistiren ile benzer adeziv özellikler gösterdiği fakat 72 saatlik adezyonda hücre canlılığı olumsuz etkisi olduğu belirlendi. RGD peptidinin varlığında ise hücre canlılığı geleneksel polistiren yüzeye göre 24.saatten itibaren artış gözlemlendi (Şekil 3.7). Yüzeyler arasındaki farklanma 72.saatte en belirgin olarak gözlemlendi. 72.saatte RGD peptidi ile modifiye edilmiş yüzeylerde maksimum hücre sayısı gözlemlendi. RGD peptit modifiye yüzeyler üzerindeki hücre adezyonunun zamana bağlı olması nedeniyle 72.saatte en fazla hücre adezyonunun ve proliferasyonunun gözlenmesi literatürdeki verilerle uyumludur. 72.saatten sonra yüzeyler tamamen hücre ile kaplandığı için analize devam edilmedi.



Şekil 3.7 Farklı yüzeylerin zamana bağlı hücre sayısı açısından karşılaştırılması.

Vero hücre proliferasyonunun AFM ile görüntülenmesi

72. saatte proliferasyon farklanmasının en belirgin olması nedeniyle Vero hücrelerinin bu saatte yüzeyler üzerindeki morfolojileri AFM ile incelendi. Yüzeyler üzerinde fikse olmuş proliferasyon hücrelerinin AFM görüntüsü Şekil 3.8 'de görülmektedir. RGD modifiye yüzeyler üzerinde hücrelerin sağlıklı oldukları ve oldukça iyi bir şekilde yayıldıkları gözlemlendi.

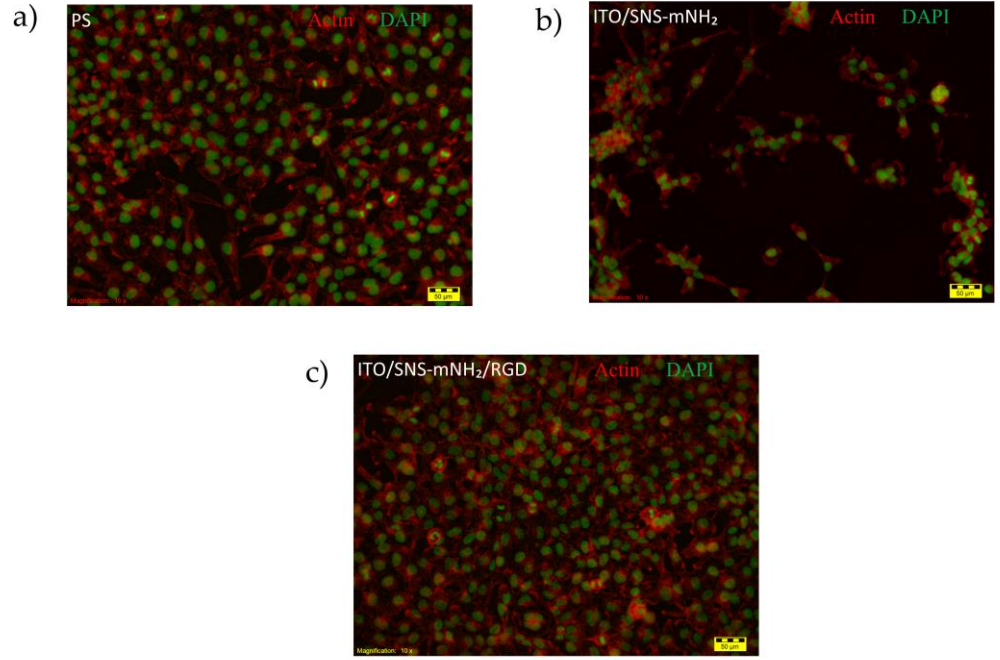


Şekil 3.8 İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeyler üzerinde Vero hücre morfolojisinin (a) 2-ve (b) 3-boyutlu topografik AFM yükseklik resimleri.

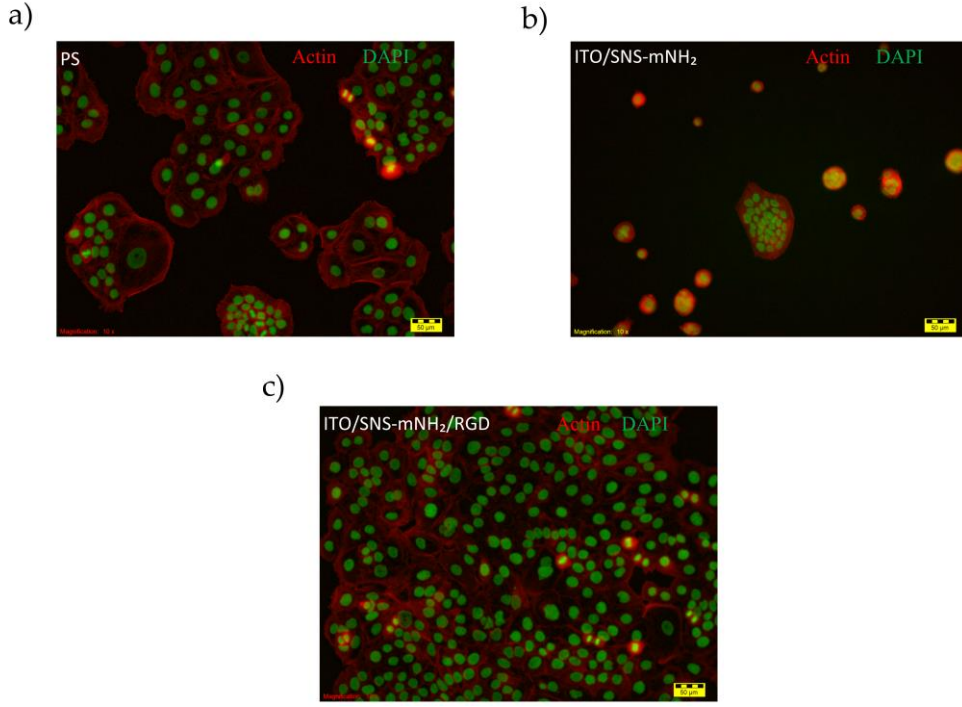
Farklı memeli hücrelerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi

Hazırlanan ve Vero hücreleri ile uyumlulukları test edilen yüzeylerin farklı hücrelerin proliferasyonunun üzerine etkisi karşılaştırmalı olarak incelendi. Vero, HaCaT ve SH-SY5Y hücrelerinin yüzeyler üzerindeki 72 saat inkübasyonunun ardından proliferasyonları karşılaştırıldı. Bütün hücre hatlarının RGD modifiye yüzeyler üzerinde polimer kaplı yüzeyler üzerindekiinden daha fazla sayıda oldukları gözlemlendi (Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11). Vero (Şekil 3.9) ve HaCaT (Şekil 3.10) hücre hatları polimer kaplı yüzeyler üzerinde yayılamadıkları

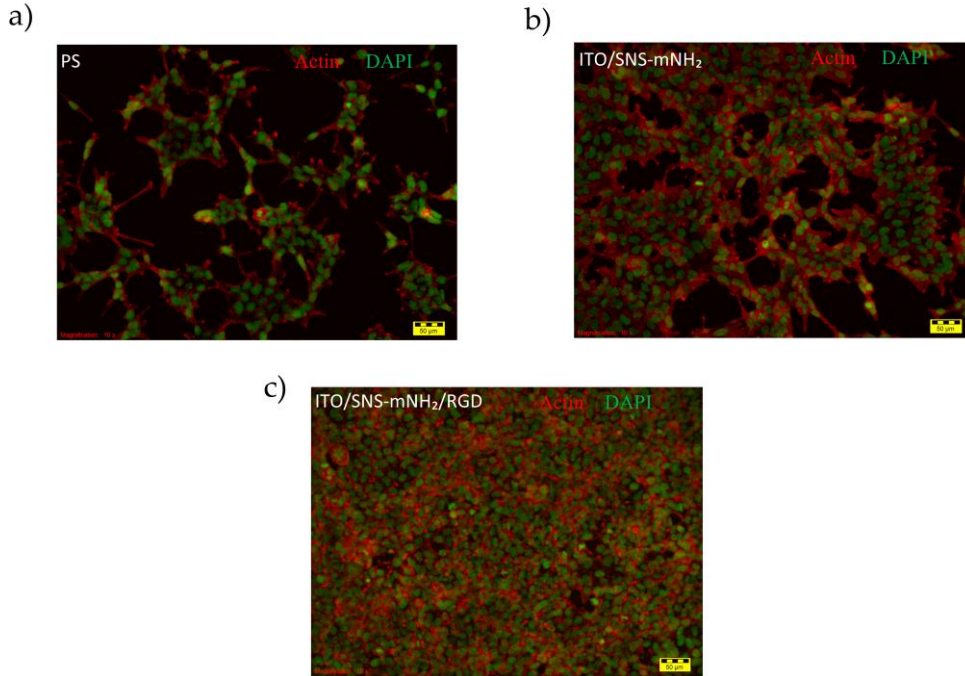
halde, fonksiyonel yüzey üzerinde yayılıp aktin fibrillerinin oluşturdukları gözlemlendi. RGD modifiye yüzeyler üzerindeki hücre yayılması hücrelerin yüzeyler üzerindeki RGD motifi ile etkileştiklerini göstermektedir. SH-SY5Y hücre hattı (Şekil 3.11) ise oldukça agresif bir hücre hattı olmasından dolayı, hem polimer kaplı hem de RGD modifiye yüzeyler üzerinde maksimum proliferasyon gösterdi.



Şekil 3.9 Vero hücre hattının a) PS, b) İTO/SNS-mNH₂, ve c) İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeyler üzerindeki proliferasyonu. (Aktin (Kırmızı) ve DAPI (yeşil)). Ölçek çubuğu 50 μm.

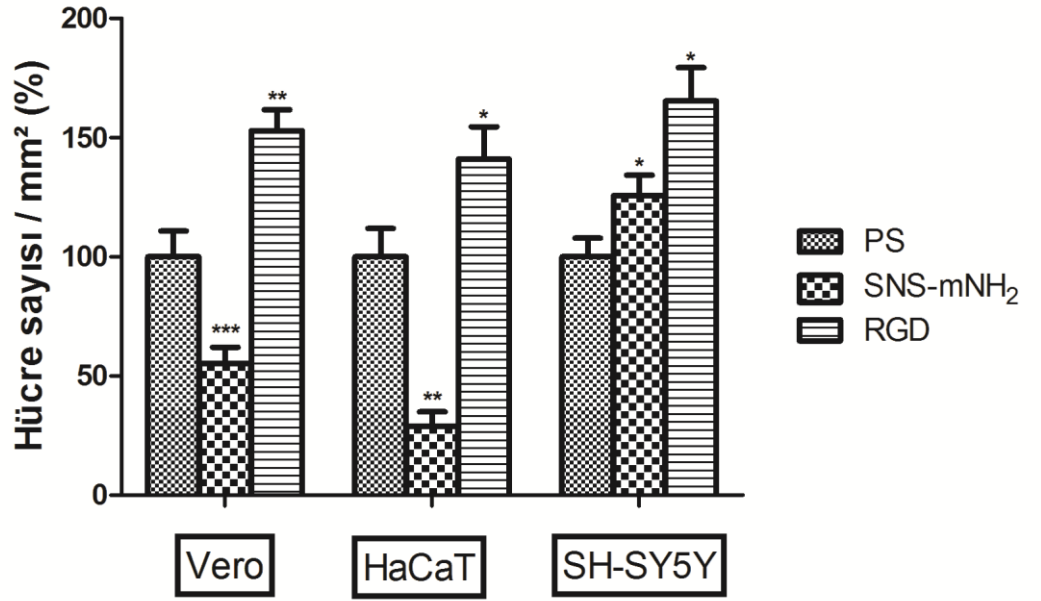


Şekil 3.10 HaCaT hücre hattının a) PS, b) İTO/SNS-mNH₂, ve c) İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeyler üzerindeki proliferasyonu. (Aktin (Kırmızı) ve DAPI (yeşil)). Ölçek çubuğu 50 μm.



Şekil 3.11 SH-SY5Y hücre hattının a) PS, b) İTO/SNS-mNH₂, ve c) İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeyler üzerindeki proliferasyonu. (Aktin (Kırmızı) ve DAPI (yeşil)). Ölçek çubuğu 50 μm.

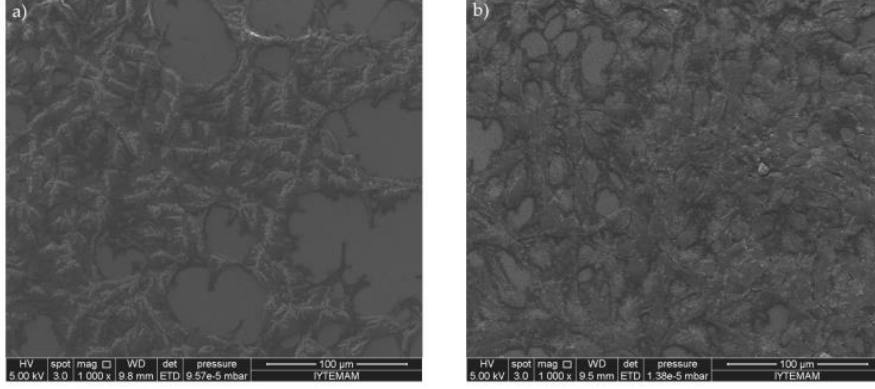
Farklı hücre hatlarının yüzeyler üzerindeki mm^2 başına ortalama hücre sayısının karşılaştırmalı olarak incelenmesine ait grafik şekil 3.12’de gösterildi. Yıldızlar farklı hücre hatları için modifiye yüzeylerin PS yüzeylere karşı farklılıklarını göstermektedir. Bütün hücre hatlarında İTO/SNS- mNH_2 /RGD yüzeyler üzerinde en fazla hücre sayısı gözlemlenmiştir. SH-SY5Y hücre hattı ise oldukça agresif bir hücre hattı olmasından dolayı, hem polimer kaplı hem de RGD modifiye yüzeyler üzerinde maksimum proliferasyon gözlemlendi.



Şekil 3.12 Vero, HaCaT ve SH-SY5Y hücrelerinin PS, İTO/SNS- mNH_2 ve İTO/SNS- mNH_2 /RGD yüzeyler üzerindeki proliferasyonunun karşılaştırmalı olarak incelenmesi.

SH-SY5Y hücre hattının proliferasyonunun SEM ile incelenmesi

SH-SY5Y hücre hattının polimer kaplı ve RGD modifiye yüzeyler üzerindeki proliferasyon davranışı SEM ile gösterildi. (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 SH-SY5Y hücre hattının (a) İTO/SNS-mNH₂ ve (b) İTO/SNS-mNH₂/RGD yüzeyler üzerindeki hücre proliferasyonuna ait SEM görüntüleri.

Floresan mikroskobu sonuçlarıyla uyumlu olarak, 72 saat inkübasyonunun ardından SH-SY5Y hücre hattı iki yüzey üzerinde de proliferasyon gösterirken RGD-modifiye yüzeyler üzerinde hücre sayısının ve yayılımının polimer kaplı yüzeylere göre daha fazla olduğu gözlemlendi.

4. GENEL SONUÇLAR

Tez projesi kapsamında elektroaktif yüzeyler tasarlanmış, karakterize edildi ve bu yüzeylerin farklı hücre hatları (Vero, HaCaT, SH-SY5Y) ile *in vitro* uygulamaları gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan yüzeyler hücre adezyonunu ve proliferasyonunu teşvik edici olması sebebiyle üzerinde uzun süreli hücre kültivasyonuna imkân vermektedir. Hazırlanan bu platform hem optik hem de elektrokimyasal ölçümler için kullanılmaya uygundur. Böylece, gerek hücre morfolojisinin izlenebildiği ve yarı nicel analizlerin yapılabildiği gerekse elektrokimyasal impedans spektroskopisi gibi yüzeye bağlı hücrelerin hassas olarak ölçülebildiği yeni yöntemlerin geliştirilmesi için kullanılabilir.

Literatürdeki benzer amaçlarla hazırlanan yüzeylerde ticari olarak üretilen polianilin, polipirol ve politiyofen gibi polimerlerin kullanımına yönelik çalışmalar vardır (Çizelge 4.1). Fakat yeni sentezlenmiş bir iletken polimerle hazırlanan ve hücre adezyonunu destekleyen bir yüzey bulunmamaktadır. Elde edilen modifiye yüzeyler, kısa sürede ve düşük maliyet ile hazırlanabilmektedir. Bu da, yüzeylerin yüksek ürün hacimli (high throughput) sistemlerde kullanılabilir olması bakımından avantajlıdır.

Çizelge 4.1 Literatürdeki benzer çalışmalar.

Kullanılan Polimer	Kullanılan Biyomoleküller	Hücre Tipi	Referanslar
Polipirol	Laminin, Fibronektin, Kolajen, Poly-L-lizin, Hyaluronik asit, RGD	Kortikal astrositler, osteoblastlar, fibroblastlar v.b.	(Schmidt et. al.,1997, Kotwal and Schmidt, 2001, Collier et. al., 2000, Stauffer and Cui, 2006, Lee et. al., 2006)
Polianilin	Kolajen, gelatin	Meme kanseri hücreleri, kardiyak miyoblastlar v.b.	(Bidez et al., 2006, Li et. al., 2006)
Politiyofen	Laminin, Fibronektin	Nöronlar, epitel hücreleri	(Breukers et al., 2010; D.-F. Li et al., 2008)

Bu proje kapsamında optik analizlerde kullanılmış olan yüzeylerin, daha sonraki aşamalarda elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile birleştirilmesi, hücre-çip sistemlerinde kullanılması, minyatürize edilerek çoklu analize uygun hale getirilmesi ya da akışkan sistemler ile entegrasyonu ile otomatize edilmesi mümkündür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.,** 2002, *Molecular Biology of the Cell, Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix*, 1132-1235 pp.
- Andersson, H., and van den Berg, A.,** 2003, Microfluidic devices for cellomics: a review, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 92(3), 315-325 pp.
- Ateh, D. D., Vadgama, P., and Navsaria, H. A.,** 2006, Culture of human keratinocytes on polypyrrole-based conducting polymers, *Tissue Engineering*, 12(4), 645-655 pp.
- Başkurt, E., Ekiz, F., Demirkol, D. O., Timur, S., and Toppare, L.,** 2012, A conducting polymer with benzothiadiazole unit: Cell based biosensing applications and adhesion properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 97, 13-18 pp.
- Bidez, P. R., Li, S., MacDiarmid, A. G., Venancio, E. C., Wei, Y., and Lelkes, P. I.,** 2006, Polyaniline, an electroactive polymer, supports adhesion and proliferation of cardiac myoblasts, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(1-2), 199-212 pp.
- Breukers, R., Gilmore, K. J., Kita, M., Wagner, K., Higgins, M., Moulton, S., and Wallace, G.,** 2010, Creating conductive structures for cell growth: growth and alignment of myogenic cell types on polythiophenes, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95(1), 256-268 pp.
- Chang, H.-I., and Wang, Y.,** 2011, Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds, *Regenerative Medicine and Tissue Engineering—Cells and Biomaterials*, InTech: Rijeka, Croatia, 569-588 pp.
- Chung, T. W., Liu, D. Z., Wang, S. Y., and Wang, S. S.,** 2003, Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale, *Biomaterials*, 24(25), 4655-4661 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Collier, J. H., Camp, J. P., Hudson, T. W., and Schmidt, C. E.**, 2000, Synthesis and characterization of polypyrrole–hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications, *Journal of biomedical materials research*, 50(4), 574-584 pp.
- Cosnier, S.**, 2005, Affinity biosensors based on electropolymerized films, *Electroanalysis*, 17(19), 1701-1715 pp.
- Cosnier, S., and Holzinger, M.**, 2011, Electrosynthesized polymers for biosensing, *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2146-2156 pp.
- D'Souza, S. E., Ginsberg, M. H., and Plow, E. F.**, 1991, Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif, *Trends Biochem Sci*, 16(7), 246-250 pp.
- De Bartolo, L., Rende, M., Morelli, S., Giusi, G., Salerno, S., Piscioneri, A., and Drioli, E.**, 2008, Influence of membrane surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus, *Journal of Membrane Science*, 325(1), 139-149 pp.
- Delaittre, G., Greiner, A. M., Pauloehrl, T., Bastmeyer, M., and Barner-Kowollik, C.**, 2012, Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs, *Soft Matter*, 8(28), 7323-7347 pp.
- Fields, G. B., Lauer, J. L., Dori, Y., Forns, P., Yu, Y. C., and Tirrell, M.**, 1998, Proteinlike molecular architecture: Biomaterial applications for inducing cellular receptor binding and signal transduction, *Biopolymers - Peptide Science Section*, 47(2), 143-151 pp.
- Foulds, N. C., and Lowe, C. R.**, 1986, Enzyme entrapment in electrically conducting polymers. Immobilisation of glucose oxidase in polypyrrole and its application in amperometric glucose sensors, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 82(4), 1259-1264 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Geißler, U., Hempel, U., Wolf, C., Scharnweber, D., Worch, H., and Wenzel, K. W.**, 2000, Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts, *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(4), 752-760 pp.
- Gelmi, A., Ljunggren, M. K., Rafat, M., and Jager, E. W. H.**, 2014, Influence of conductive polymer doping on the viability of cardiac progenitor cells, *Journal of Materials Chemistry B*, 2(24), 3860-3867 pp.
- Gomez, N., Lee, J. Y., Nickels, J. D., and Schmidt, C. E.**, 2007, Micropatterned polypyrrole: a combination of electrical and topographical characteristics for the stimulation of cells, *Advanced Functional Materials*, 17(10), 1645-1653 pp.
- Guimard, N. K., Gomez, N., and Schmidt, C. E.**, 2007, Conducting polymers in biomedical engineering, *Progress in Polymer Science*, 32(8-9), 876-921 pp.
- Guler, E., Soyleyici, H. C., Demirkol, D. O., Ak, M., and Timur, S.**, 2014, A novel functional conducting polymer as an immobilization platform, *Materials Science and Engineering: C*, 40, 148-156 pp.
- Guo, Y., Li, M., Mylonakis, A., Han, J., MacDiarmid, A. G., Chen, X., Wei, Y.**, 2007, Electroactive oligoaniline-containing self-assembled monolayers for tissue engineering applications, *Biomacromolecules*, 8(10), 3025-3034.
- Heinze, J.**, 1990, Electronically conducting polymers, *Electrochemistry IV: Springer*, 1-47 pp.
- Hersel, U., Dahmen, C., and Kessler, H.**, 2003, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, *Biomaterials*, 24(24), 4385-4415pp.
- Hu, C., Yang, D.-P., Wang, Z., Yu, L., Zhang, J., and Jia, N.**, 2013, Improved EIS performance of an electrochemical cytosensor using three-dimensional architecture Au@ BSA as sensing layer, *Analytical Chemistry*, 85(10), 5200-5206 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Iuliano, D. J., Saavedra, S. S., and Truskey, G. A.,** 1993, Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion, *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(8), 1103-1113 pp.
- Joddar, B., and Ito, Y.,** 2011, Biological modifications of materials surfaces with proteins for regenerative medicine, *Journal of Materials Chemistry*, 21(36), 13737-13755 pp.
- Kanik, F. E., Rende, E., Timur, S., and Toppare, L.,** 2012, A novel functional conducting polymer: synthesis and application to biomolecule immobilization, *Journal of Materials Chemistry*, 22(42), 22517-22525 pp.
- Kotwal, A., and Schmidt, C. E.,** 2001, Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials, *Biomaterials*, 22(10), 1055-1064 pp.
- Krüger, J., Singh, K., O'Neill, A., Jackson, C., Morrison, A., and O'Brien, P.,** 2002, Development of a microfluidic device for fluorescence activated cell sorting, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 12(4), 486 pp.
- Ladoux, B., and Nicolas, A.,** 2012, Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on Progress in Physics*, 75(11), 116601 pp.
- Lee, J.-W., Serna, F., Nickels, J., and Schmidt, C. E.,** 2006, Carboxylic acid-functionalized conductive polypyrrole as a bioactive platform for cell adhesion, *Biomacromolecules*, 7(6), 1692-1695 pp.
- Li, D.-F., Wang, H.-J., Fu, J.-X., Wang, W., Jia, X.-S., and Wang, J.-Y.,** 2008, Preparation of a hydrophobic polythiophene film to improve protein adsorption and proliferation of PC 12 cells, *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(51), 16290-16299 pp.
- Li, M., Guo, Y., Wei, Y., MacDiarmid, A. G., and Lelkes, P. I.,** 2006, Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 27(13), 2705-2715 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, D., Che Abdullah, C. A., Sear, R. P., and Keddie, J. L.,** 2010, Cell adhesion on nanopatterned fibronectin substrates, *Soft Matter*, 6(21), 5408-5416 pp.
- Liu, Q., and Wang, P.,** 2009, *Cell-Based Biosensors: Principles and Applications*, Artech House.
- Low, S. P., Williams, K. A., Canham, L. T., and Voelcker, N. H.,** 2006, Evaluation of mammalian cell adhesion on surface-modified porous silicon, *Biomaterials*, 27(26), 4538-4546 pp.
- Luo, C., Li, L., Li, J., Yang, G., Ding, S., Zhi, W., and Zhou, S.,** 2012, Modulating cellular behaviors through surface nanoroughness, *Journal of Materials Chemistry*, 22(31), 15654-15664 pp.
- Mrksich, M.,** 2000, A surface chemistry approach to studying cell adhesion, *Chem. Soc. Rev.*, 29(4), 267-273 pp.
- Ona, T., and Shibata, J.,** 2010, Advanced dynamic monitoring of cellular status using label-free and non-invasive cell-based sensing technology for the prediction of anticancer drug efficacy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(6), 2505-2533 pp.
- Papenburg, B. J., and Rodrigues, E. D.,** Wessling, M., and Stamatialis, D., 2010, Insights into the role of material surface topography and wettability on cell-material interactions, *Soft Matter*, 6(18), 4377-4388 pp.
- Primiceri, E., Chiriaco, M. S., Rinaldi, R., and Maruccio, G.,** 2013, Cell chips as new tools for cell biology—results, perspectives and opportunities, *Lab on a Chip*, 13(19), 3789-3802 pp.
- Qu, L., Xu, J., Tan, X., Liu, Z., Xu, L., and Peng, R.,** 2014, Dual-Aptamer Modification Generates a Unique Interface for Highly Sensitive and Specific Electrochemical Detection of Tumor Cells, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6(10), 7309-15 pp.
- Rasooly, A., and Herold, K. E.,** 2009, *Biosensors and Biodetection*: Springer.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ravichandran, R., Sundarrajan, S., Venugopal, J. R., Mukherjee, S., and Ramakrishna, S.,** 2010, Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering, *J R Soc Interface*, 7 Suppl 5, S559-579 pp.
- Ruggeri, G., Bianchi, M., Puncioni, G., and Ciardelli, F.,** 1997,. Molecular control of electric conductivity and structural properties of polymers of pyrrole derivatives, *Pure and Applied Chemistry*, 69(1), 143-150 pp.
- Rusmini, F., Zhong, Z., and Feijen, J.,** 2007, Protein immobilization strategies for protein biochips, *Biomacromolecules*, 8(6), 1775-1789 pp.
- Sackmann, E., and Smith, A.-S.,** 2014, Physics of cell adhesion: some lessons from cell-mimetic systems, *Soft Matter*, 10(11), 1644-1659 pp.
- Schmidt, C. E., Shastri, V. R., Vacanti, J. P., and Langer, R.,** 1997, Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 8948-8953 pp.
- Song, H.-K., Toste, B., Ahmann, K., Hoffman-Kim, D., and Palmore, G.,** 2006, Micropatterns of positive guidance cues anchored to polypyrrole doped with polyglutamic acid: a new platform for characterizing neurite extension in complex environments, *Biomaterials*, 27(3), 473-484 pp.
- Stauffer, W. R., and Cui, X. T.,** 2006, Polypyrrole doped with 2 peptide sequences from laminin, *Biomaterials*, 27(11), 2405-2413 pp.
- Umana, M., and Waller, J.,** 1986, Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/polypyrrole system, *Analytical Chemistry*, 58(14), 2979-2983 pp.
- Wadhwa, R., Lagenaur, C. F., and Cui, X. T.,** 2006, Electrochemically controlled release of dexamethasone from conducting polymer polypyrrole coated electrode, *Journal of Controlled Release*, 110(3), 531-541 pp.
- Wang, C., Dong, Y., Sengothi, K., Tan, K., and Kang, E.,** 1999, In-vivo tissue response to polyaniline, *Synthetic Metals*, 102(1), 1313-1314 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, X., Chen, S., Kong, M., Wang, Z., Costa, K. D., Li, R. A., and Sun, D.,** 2011, Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies, *Lab on a Chip*, 11(21), 3656-3662 pp.
- Wang, X., Gu, X., Yuan, C., Chen, S., Zhang, P., Zhang, T., and Chen, G.,** 2004, Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 68(3), 411-422 pp.
- Waugaman, M., Sannigrahi, B., McGeady, P., and Khan, I. M,** 2003, Synthesis, characterization and biocompatibility studies of oligosiloxane modified polythiophenes, *European Polymer Journal*, 39(7), 1405-1412 pp.
- Werner, C., Pompe, T., and Salchert, K.,** 2006, Modulating extracellular matrix at interfaces of polymeric materials, *Polymers for Regenerative Medicine: Springer*, 63-93 pp.
- Wieckowski, A.,** 1999, *Interfacial Electrochemistry: Theory: Experiment, and Applications: CRC Press* pp.
- Wlodkowic, D., and Cooper, J. M,** 2010, Tumors on chips: oncology meets microfluidics, *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(5), 556-567 pp.
- Wong, J. Y., Langer, R., and Ingber, D. E.,** 1994, Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3201-3204 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Ad/Soyad : Gizem OYMAN

Doğum Yeri/Tarihi : İZMİR/09.08.1988

Uyruğu : T.C

Cinsiyet : Kadın

Medeni Hal : Bekar

Adres : Manavkuyu Mah. 275/6 Sok. No:14 Kat:1 Da:5
Bayraklı/İZMİR

E-mail : gizemoyman@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2007-2011)

Yüksek Lisans: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Programı (2011-2013) (Ege Üniversitesi'ne yatay geçiş)

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2013-2014) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nden yatay geçiş)